

KOÇ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**PEDİATRİK MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNDE OTOfAJİNİN ROLÜNÜN
İNCELENMESİ VE TERAPÖTİK BİR HEDEF OLARAK BELİRLENMESİ**

İrem Yenidogan

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatih Erbey ve Prof. Dr. Devrim Gözüaçık

Jüri Üyeleri:

Ünvan / Ad-Soyad:

İmza:

Başkan

Profesör Fatih Erbey

Üye (Danışman) Profesör Fatih Erbey

Üye

Profesör Çiğdem Arıkan

Üye

Profesör Devrim Gözüaçık

Üye

Profesör Tuğba Gürsoy

ONAY

Bu tez çalışması, xx.xx.xxxx tarihinde Anabilim Dalı Başkanı tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Ad-Soyad/ İmza

Prof. Tuğba Gürsoy

Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim Dalı Başkanı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İmza

Adı Soyadı

TEŞEKKÜR SAYFASI

ÖZET

PEDİATRİK MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNDE OTOfAJİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ VE TERAPÖTİK BİR HEDEF OLARAK BELİRLENMESİ

İrem Yenidoğın

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

02.05.2023

ÖZET

Giriş: Çocukluk çağı beyin tümörleri, kanser ilişkili ölümlerin en sık nedenlerinden biridir ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. Pediatrik yüksek dereceli glial tümörler, kötü prognoz ve kısa yaşam süresi ile karakterize olup etkin tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, pediatrik yüksek dereceli glial tümörlerde mevcut tedavi seçeneklerinin yetersiz kalması nedeniyle otofaji yolağının terapötik bir hedef olarak araştırılmasıdır. Erişkin yüksek dereceli glial tümörlerle karşılaştırılarak, otofaji yolağının pediatrik yüksek dereceli glial tümörlerdeki rolü incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Tüm deneyler pediatrik ve erişkin yüksek dereceli glial tümör hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Protein analizi western blot, DNA düzeyinin incelenmesi qPCR, hücrelerin canlılık özelliği MTT, infiltrasyon ve invazyon özellikleri kuyucuk ve çizik deneyleri, metabolizma analizi seahorse tekniği ile incelenmiştir.

Bulgular: Pediatrik yüksek dereceli glial tümör hücrelerinde otofaji aktivasyonunun erişkine kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda otofaji inhibisyonunun tümör hücrelerinin kemoterapi hassasiyetini arttırabildiği bunun yanı sıra infiltrasyon ve mitokondri bağımlı oksidatif fosforilasyon özelliğini baskıladığı ortaya konmuştur.

Sonuç: Bu çalışma, pediatrik yüksek dereceli glial tümörlerde otofaji yolağının terapötik bir hedef olarak araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Daha fazla araştırma, bu tümörlerin tedavisinde otofaji yolağına yönelik yeni tedavi seçenekleri geliştirilmesine yardımcı olabilir.

vii

ABSTRACT

Thesis Title

İrem Yenidogan

Department of Pediatrics

May 2, 2023

Introduction: Childhood brain tumors are one of the most common causes of cancer-related deaths and treatment options are limited. Pediatric high-grade glial tumors are characterized by poor prognosis and short survival time, and effective treatment options are needed.

Objective: The aim of this study is to investigate the role of the autophagy pathway as a therapeutic target in pediatric high-grade glial tumors, due to the insufficient current treatment options. The role of the autophagy pathway in pediatric high-grade glial tumors was examined by comparing it with adult high-grade glial tumors.

Method: All experiments were conducted on pediatric and adult high-grade glioma cells. Protein analysis was done using Western blot, DNA level examination using qPCR, cell viability using MTT assay, infiltration and invasion properties using boyden chamber and scratch assays, and metabolism analysis was performed using the Seahorse technique.

Findings: Autophagy activation was higher in pediatric high-grade glial tumor cells than in adults. Additionally, it was revealed that autophagy inhibition can increase tumor cells' chemotherapy sensitivity and suppress infiltration and mitochondrial-dependent oxidative phosphorylation characteristics.

Conclusion: This study demonstrates the need to investigate the autophagy pathway as a therapeutic target in pediatric high-grade glial tumors. Further research may help develop new treatment options targeting the autophagy pathway for these tumors.

viii

İÇİNDEKİLER

Tez Onayı iii

Beyan iv

İthaf v

Teşekkür vi

Özet vii

İngilizce Özet (Abstract) viii

İçindekiler ix

Tablo Listesi x

Şekil Listesi xi

Kısaltmalar xii

1. GİRİŞ 13

2. GENEL BİLGİLER.....20

1. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri-Epidemiyoloji Ve Etiyoloji.....	20
2. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri – Klinik Bulgular.....	21
3. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Histomoleküler Özellikleri Ve Yeni Sınıflandırma.....	25
4. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri – Radyolojik Özellikler.....	37
5. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri – Tedavi Yaklaşımları.....	39
6. Otofaji Ve Kanser	43
A. Otofaji..	43
B. Kanserde Otofaji.....	44
7. Pediatrik Beyin Tümörleri ve Otofaji Yolağı İle İlişkileri.....	48
7.A. Pediatrik Embriyonal Tümörler.....	48
7.A.a. Medulloblastom.....	48
7.A.b. Atipik Teratoid/Rabdoid Tümör.....	52
7.B. Pediatrik Gliomlar, Glionöronal ve Nöronal Tümörler.	54
7.B.a. Ependimom.	54
7.B.b. Pediatrik Diffüz Glial Tümörler.....	55
7.B.b-1. Pediatrik Tip Diffüz Düşük Dereceli Gliomalar, İyi Sınırlı Astrositik Gliomalar, Glionöronal ve Nöronal Tümörler.....	58
7.B.b-2. Pediatrik Tip Diffüz Yüksek Dereceli Gliomalar.....	61

3. GEREÇ VE YÖNTEM..65

1. Hücre

Hatları.....	65
1.A. SF188..	67
1.B. SF8628..	67
1.C. U87.....	68
1.D. LN2291.....	68

2. Primer Kültür..	68
3. Reaktifler..	69
4. Hücre Kültürü.....	70
5. Otofaji İndüksiyonu ve İnhibisyon.....	70
6. Protein izolasyonu ve Western blot analizi.....	71
7.MTT.....	72
8.Klonlama ve Lentiviral Üretimi.....	72
9. Knock-down.....	74
10. Göç Deneyi.	74
11.Çizik Deneyi.....	74
12. Seahorse.....	75
13. İstatistik Analizleri.....	75
4. BULGULAR.....	77
1.Migrasyon, İnvazyon ve İnfiltrasyon Özellikleri	91
2.Otofajinin Hücrelerdeki Metabolizma Üzerine Etkisi..	95
5. TARTIŞMA.....	98
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	106
7. KAYNAKLAR	107
8. EKLER (Etik Kurul Onayı)	

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Çocuklarda MSS Tümörlerinin Dağılımı; Yaş ve Sıklık Bilgileri¹.....14

Tablo-2: 2021 Dünya Sağlık Örgütü Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması¹.....31

x

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: A: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren Protein Düzeyi.....77

B: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren Protein Düzeyi.....77

Şekil-2: A-B-C: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren DNA Düzeyi.....79

D-E: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren DNA Düzeyi.....79

Şekil-3: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Siklofodfamid Yanıtı.....80

C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Siklofodfamid Yanıtı.....80

Şekil-4: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Karboplatin Yanıtı.....81

C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Karboplatin Yanıtı.....81

Şekil-5: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Temozolomid Yanıtı.....	82
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Temozolomid Yanıtı.....	82
Şekil-6: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Etoposid Yanıtı.....	83
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Etoposid Yanıtı.....	83
Şekil-7: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Vinkristin Yanıtı..	84
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Vinkristin Yanıtı.....	84
Şekil-8: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Klorokin Yanıtı..	85
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Klorokin Yanıtı..	85
Şekil-9: A: Artan Temozolomid ve Vinkristin Dozlarında Erişkin Glial Tümör Hücrelerindeki Otofaji Aktivasyonu..	87
B ve C: Artan Temozolomid ve Vinkristin Dozlarında Pediatrik Glial Tümör Hücrelerindeki Otofaji Aktivasyonu.....	87
Şekil-10: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin CRISPR/CAS9 Sistemi ile Otofaji İnhibisyonunun Yapılması.....	88
Şekil-11: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Temozolomid ve Vinkristin Tedavilerine Klorokin Kombinasyonu Yapıldığında Yanıtı.....	89
Şekil-12: A: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Temozolomid Yanıtları	90
B: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Temozolomid Yanıtları..	90
Şekil-13: A: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Vinkristin Yanıtları..	91
B: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Vinkristin Yanıtları	

.....	90
Şekil-14: A: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Şekilsel Gösterilmesi..	93
B: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Grafik Gösterimi.	93
Şekil-15: A: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnfiltrasyon Özelliğinin Şekilsel Gösterilmesi..	94
B: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnfiltrasyon Özelliğinin Grafik Gösterimi..	94
Şekil-16: A: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Medikal Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Şekilsel Gösterilmesi..	95
B: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Medikal Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Grafik Gösterimi.....	95
Şekil-17: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında 3 Boyutlu Görüntülerindeki Değişiklikler..	96
Şekil-18: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Kök Hücre Belirteç Düzeylerinde Oluşan Değişiklikler..	97
Şekil-19: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Metabolizma Düzeyinde Oluşan Değişiklikler..	98
Şekil-20: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Metabolizma Düzeyinde Oluşan Değişiklikler..	98
Şekil-21: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Mitokondrial DNA Düzeyinde Oluşan Değişiklikler.....	99

KISALTMALAR

ACVR1: İnsan aktivin reseptör A-1

AKT : Protein Kinaz B

ALK : Anaplastik Lenfoma Kinaz

AT/RT : Atipik Teratoid Rabdoid Tümör

ATRX: ATP Bağımlı Helikaz

BRAF-V600E : v-Raf Mürin Sarkom Viral Onkogen Homolog

CDKN2A/CDKN2B: Siklin Bağımlı Kinaz

DIPG: Diffüz İntrinsik Pontin Glioma

EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

ETMR: Embriyonel tümör çok katmanlı rozetli

EZH1: EZH İnhibitor Protein

H3: histon 3

HDAC: histon deasetilaz

HSF1: Sıcaklık Şok Transkripsiyon Faktörü

IDH: izositrat Dehidrogenaz

IGF2: İnsülin benzeri büyüme faktörü

MAPK: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

MB: Medulloblastom

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

mTOR: rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi

MYB: my elo blastosis (MYB)

MYBL1: MYB proto-oncogene like 1 (*MYBL1*)

MYCN: V-myc Myelocytomatosis Virüs İlişkili Onkogen

NF1: Nörofibrinomatosis tip-1

NF-kB : Nuklear Faktör Kappa B

NTRK : Nörotrofik Tirozin Reseptör Kinaz

P53: Tümör Protein 53

PDDDG: Pediatrik Diffüz Düşük Dereceli Gliomalar

PDYDG: Pediatrik Diffüz Yüksek Dereceli Gliomalar

PI3-K: fosfoinozitol-3 kinaz

PI3P : Fosfatidil İnositol-3 Fosfat

PRDM6: PR Bölgesi Çinko Parmak Protein-6

PTEN: Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu

RELA : V-rel Avian Retikuloendoteliyozis Viral Onkogen Homolog A

ROS1: Proto-onkogen Tirozin-Protein Kinaz

SHH : Sonic Hedgehog

SNCAIP : Sinüklein Alfa Etkileşimli Proteinin

RTK : Reseptör Tirozin Kinaz

TERT : Telomeraz Ters Transkriptaz

TPR: Transloke başlangıç bölgesi

YAP1: Yes-1 İlişkili Transkripsiyonel Regülatör (*YAP1*)

WNT : Wingless İlişkili Entegrasyon Yolu

ZFTA: Çinko Parmak Translokasyon İlişkili

1. GİRİŞ

Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörleri, beyin ve medulla spinalis tümörlerinden oluşur. Pediatrik vakalarda MSS'ne ait tümörlerin %95'i beyin tümörleridir. MSS tümörleri %16,2 sıklık ile lösemileri ardından ikinci sıklıkta görülen tümör grubunu oluşturur. 15 yaşın altında ise en sık solid tümördür^{2,3}. Alt grupları ve sıklıkları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo-1: Çocuklarda MSS Tümörlerinin Dağılımı; Yaş ve Sıklık Bilgileri¹

Yaş Aralığı	WHO Sınıfı	Tümör Tipi	Yaklaşık Sıklık
0-4 yaş	I	Pilsitik Astrositom	2.2/100,000
0-4 yaş	I	Subependimal Dev Hücreli Astrositom	0.3-0.6/100,000
0-4 yaş	I	Desmoplastik İnfanıl Ganglioglioma	0.2-0.3/100,000

Yaş Aralığı	WHO Sınıfı	Tümör Tipi	Yaklaşık Sıklık
0-4 yaş	IV	Medulloblastom	0.7/100,000
0-4 yaş	IV	Ependimoblastom	<0.1/100,000
5-9 yaş	I	Pilsitik Astrositom	1.5/100,000
5-9 yaş	II	Diffüz Astrositom	0.3/100,000
5-9 yaş	IV	Medulloblastom	0.2-0.3/100,000
10-14 yaş	I	Pilsitik Astrositom	1.6/100,000
10-14 yaş	II	Diffüz Astrositom	0.5/100,000

Yaş Aralığı	WHO Sınıfı	Tümör Tipi	Yaklaşık Sıklık
10-14 yaş	III	Anaplastik Astrositom	0.1/100,000
10-14 yaş	IV	Medulloblastom	0.5/100,000
15-19 yaş	I	Pilsitik Astrositom	1.7/100,000
15-19 yaş	II	Diffüz Astrositom	0.4/100,000
15-19 yaş	III	Anaplastik Astrositom	0.2/100,000
15-19 yaş	IV	Glioblastom	1.1/100,000
15-19 yaş	IV	Medulloblastom	0.4/100,000

Not: Bu tablo WHO 2021 klasifikasyonuna göre yapılmıştır¹. Bu sıklık oranları yaklaşıktır ve kaynak ve bölgeye göre değişebilir. Ayrıca, genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve genel sağlık gibi birçok faktöre bağlı olarak bireysel vakalar değişebilir.

MSS tümörlerinde tedavi primer olarak cerrahi olup kemoterapi ve radyoterapi diğer seçeneklerdir. Pediatrik MSS tümörleri çocukluk çağında gerçekleşen kanser sebepli ölümlerin başında gelmektedir⁴. Hastalığın kendisinin yanında tedavilerin neden olduğu ve diğer kanserlere oranla çok daha sık görülen uzun dönemli morbidite büyük sorun oluşturmaktadır. Primer tümörün cerrahi olarak çıkarılması birinci basamak tedavi yaklaşımı olsa da tümörün kritik beyin yapılarına yakınlığı göz önünde bulundurulduğunda tatmin edici cerrahi çoğu zaman çocuk hastalar için mümkün olmamaktadır. Diğer tedavi seçenekleri, radyoterapi ve kemoterapi olup, bu seçeneklerinin etkisi ve kullanımı çocuk hastalar için erişkine kıyasla oldukça sınırlıdır. Ayrıca bu tedavi seçeneklerinin hayat kalitesini ve gelişim basamaklarını olumsuz etkileyen uzun dönem ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bunlar çoğunlukla; ikincil malignite, endokrin bozukluk, işitme kaybı, bilişsel bozukluk, motor kayıp ve nöbet gibi nörolojik semptomlardır⁵. Tüm bunlar göz önüne alındığında nöroşirurjiyen, nöropatolog, nöroonkolog, nöroradyolog, radyasyon onkoloğu, nörolog, oftalmolog ve psikiyatristlerin bulunduğu multidisipliner tedavi yaklaşımı oldukça önemlidir⁶.

MSS tümörleri hem klinik hem biyolojik davranış paterni oldukça heterojen olan bir tümör grubudur. Beyindeki farklı hücre tiplerinden köken alsa da, %60-70'i glial hücrelerden kaynaklanır ve genelde MSS dışına metastaz eğilimi göstermez.

Son 20 yıldaki gelişmeler ile MSS tümörlerinin sınıflandırmasında tümörün genotipik ve fenotipik özelliklerinin esas belirleyici olduğu görülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2021 yılı MSS tümörleri sınıflaması ile moleküler ve epigenetik özellikler pediatrik beyin tümörlerinin tanısında en belirleyici

faktörlerden biri haline geldi. Çocuklardaki MSS tümörlerinin derin ve çok katmanlı moleküler analizi tümör ve alt grubunun kesin tanısıyla birlikte hastaya özgü prognozun objektif parametreler ile ortaya konmasını sağladı. Erişkin ve çocuk beyin tümörleri mikroskop altında benzer gözüke de tümör yerinin, histolojik özelliklerin ve moleküler temelin bütüncül güncel yaklaşımı birbirini tamamlayan yapboz parçaları gibi, çocuk ve erişkin beyin tümörlerinin arasındaki farkları ve tümörün karakteristik özelliklerini belirgin bir şekilde ortaya koydu.

Pediyatrik MSS tümörleri konvansiyonel ve yenilikçi terapilere oldukça dirençli olup yüksek morbidite ve mortalite ile karakterizedir. Hastaların yaşam ömrünü uzatmak, tedavi direncinin üstesinden gelmek ve yan etkileri azaltmak adına pediyatrik beyin tümörleri (PBT)'nin heterojen biyolojisi mutlaka moleküler ve genetik analizler ile açığa çıkarılmalıdır.

Klinikteki tedavi yanıtlarına baktığımızda çocukluk çağı MSS tümörlerinin kemoterapi ajanlarına erişkin hastalara kıyasla daha dirençli olduğunu görmekteyiz^{4,7}. Tüm bunlar çocuk hastalarda kemoterapi alanında yeni ajanlara duyulan ihtiyacı gözler önüne sermektedir. Tümör profilini inceleyen güncel moleküler çalışmalar pediyatrik beyin tümörlerinin erişkin tümörlerinden tamamen farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu yayınlar konunun uzmanlarının dikkatini çekerek DSÖ'nün yeni bir sınıflama oluşturmasını sağlamıştır. Bu yeni sınıflama ile yaşa ve moleküler temellere özgü yeni bir yaklaşım oluşturulmuştur. Bu yenilikçi ve özgün yaklaşım PBT'de hedef tedaviler geliştirmeyi amaçlayan moleküler çalışmalar için standardize bir rehber oluşmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalar çocukluk çağı MSS tümörlerinin genetik ve epigenetik programlarının ve bu programların kontrol ettiği hücrel sinyal yollarının farklı olduğunu ortaya koymaktadır⁷. Bu bağlamda, PBT'lerinin güncel sınıflamasında ve tedavi yaklaşımında sıklıkla başvuru histopatolojik bakış açısının yanı sıra, özgün genetik mutasyonların ve moleküler yolların araştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Tüm bu moleküler gelişmeler şimdiden yüz güldürücü sonuçlar ortaya çıkarmaya başlamıştır, örneğin histon deasetilaz (*HDAC*), rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (*mTOR*) ve fosfoinozit-3 kinaz (*PI3-K*) inhibitörlerinin hem *in vitro* hem klinik çalışmalar ile anlamlı oranda yaşamda kalmayı arttırabileceği gösterilmiştir⁸⁻¹⁰. Çalışmalardaki hedef yollar genelde hücredeki kritik noktalara dahil olup, transkripsiyon, translasyon, protein sentezi, proliferasyon, hücrenin stres yanıtı ve sinyallerinde etkili olmaktadır.

Otofaji; hücrenin stres karşısında oluşturduğu bir yanıt mekanizması olup tüm bu hedef yolların kesiştiği bir fenomen olarak ortaya çıkmaktadır. Otofaji mekanizması uzun süredir hücrede yer alan protein ve protein agregatlarının, fonksiyonunu kaybetmiş organellerin çift membran içerisinde degradasyonunu ve sonuç olarak lizozom ile yaptığı füzyonun ardından sitoplazma içerisine geri dönüşümünü sağlar. Fizyolojik koşullar altında, otofaji hücre homeostazının korunmasını sağlayarak, organellerin (endoplazmik retikulum, mitokondri, peroksizom, vb) işlevlerini doğru şekilde yürütmesini sağlar. Yaşlanma, kanser, metabolik hastalık, nörodejeneratif hastalıklar ve miyopatiler gibi fizyolojik olmayan birçok durum da otofaji mekanizması ile ilişkilidir.

Kanser mekanizmasında otofaji yolağı hem uyarıcı hem de baskılayıcı olarak iki farklı yönde rol oynamaktadır¹¹. Ayrıca otofaji, kanserin farklı basamaklarında bambaşka roller üstlenir. Bazı kanser çeşitlerinde tedavi direnci ile doğrudan ilişkilendirilirken, diğerlerinde tedavi direncini yenmek için avantaj sağlayan bir mekanizma olarak karşımıza çıkabilmektedir^{11,12}.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar otofaji yolağının beyin tümörlerinin ortaya çıkması, proliferasyonu, angiogenezi, invazyonu ve tedavi direnci ile ilişkili olduğunu gösterdi⁷⁻¹⁰. Son çalışmalar *in vitro* ve *in vivo* beyin tümörü modellerinde otofaji yolağının modülasyonunun tümörün oluşmasını, progresyonunu ve infiltrasyonunu engelleyebildiğini göstermiştir¹³⁻¹⁵. Tüm bunlara rağmen,

PBT’de otofaji yolağının durumu hakkında oldukça az çalışma bulunmaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*), tümör protein 53 (*P53*), protein kinaz B (*AKT*), protein tirozin fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*) ve nörofibromatozis tip-1 (*NF1*) gibi pediatrik MSS tümörlerinde sıkça rastladığımız moleküler değişikliklerin otofaji yolağında da etkin modülatörler olarak rol oynadığı bilinmektedir¹⁶. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda pediatrik MSS tümörlerinde de otofajinin indükleyici etkisi sorgulanmalı, incelenmeli ve acil tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyan bu hastalık grubu için muhtemel etkin bir hedef olup olmadığı ortaya konulmalıdır. Bu çalışma ile tüm tedavi seçeneklerine dirençli olabilen, pediatrik yüksek dereceli gliomalarda otofaji yolağının moleküler düzeyde incelenmesi ve potansiyel bir hedef olarak ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, yetişkin ve pediatrik glioma hücre hatlarında otofajinin rolü, ilaç ve Crispr/Cas9 gen düzenleme (gene editing) yaklaşımları kullanılarak incelendi. Otofajinin genetik olarak veya ilaçla baskılanmasının, klasik kemoterapi ajanlarının tedavi başarısı üzerine etkileri ve tümör hücrelerinin davranış şekillerinde yarattığı farklılıklar araştırıldı. Böylece erişkin ve pediatrik tümörlerinin davranış şekillerinde otofajinin rolü, karşılaştırmalı olarak incelendi.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri-Epidemiyoloji Ve Etiyoloji

MSS tümörleri çocukluk çağında en sık görülen ikinci kanser grubu olup, tüm çocukluk çağı malignitelerinin yaklaşık %20 kadarını oluşturur¹⁷. Türkiye’de Pediatrik Kanser Kayıtlarına göre çocukluk çağı malignitelerinin %15.5’ini MSS tümörleri oluşturmaktadır¹⁸. Çocukluk çağı MSS tümörlerinin yaklaşık %60-70’i glial hücrelerden kaynaklanır ve MSS dışına metastaz yapma eğiliminde değildir. MSS tümörleri insidansı hayatın ilk 10 yılında ve geç erişkin dönem olmak üzere 2 kez zirve

yapar. İlk 10 yaşta görülen MSS tümörleri erkek cinsiyeti ve beyaz ırkı daha çok etkilemektedir. İlk 2 yaşta supratentorial tümörler daha sık görülmekteyken, 2 yaş üzeri grupta infratentorial tümörler daha sık görülmektedir. Adölesan ve erişkin dönemde ise yine supratentorial tümörler daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüksek dereceli gliomlar erişkinlerde daha sık gözlenirken, medulloblastom, supratentoryal primitif nöroektodermal tümörler ve pinealoblastoma genelde ilk 10 yaş içerisinde gözlenmektedir^{19,20}.

PBT ve kalıtsal hastalıkların birlikteliklerine bakıldığında, çocuk hastaların %10'undan azında Cowden sendromu, kalıtsal retinoblastom, Li Fraumeni sendromu, nörofibramatozis tip1, nörofibramatosiz tip2, Gorlin sendromu, Rubinstein-Taybi sendromu, tuberoskleroz, Turcot sendromu, von Hippel-Lindeau sendromu ve Rabdoid tümör yatkınlık sendromu gibi nadir görülen sendromlar bildirilmiştir²¹.

MSS tümör etiyolojisinde etkisi kanıtlanmış faktörlerden biri de iyonize radyasyondur. Menenjiom, gliom ve sinir kılıfı tümörü sıklığının iyonize radyasyon tedavisi sonrası anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. Özellikle kalıtsal kanser sendromu olan (Nörofibramatozis tip1, Li-Fraumeni sendromu, Gorlin sendromu) kişilerin radyoterapi duyarlılığı ve buna bağlı MSS tümörü geliştirme ihtimali daha yüksektir²². Bağışıklık sisteminin doğuştan (Wiskott-Aldrich sendromu, ataksi-telanjektazi) veya edinsel bozukluklarında (organ nakli sonrası), MSS lenfoması riskinin arttığı gösterilmiştir²².

2.Pediatric Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri – Klinik Bulgular

Pediatric MSS tümörlerine ait semptomlar hastanın yaşına, kitlenin bulunduğu yere, boyutuna, büyüme şekline ve tümörün köken aldığı primer hücre tipine, histopatolojik özelliklerine bağlıdır. Hızlı büyüyen tümörler erken semptom verdikleri için küçük boyutta tanı alırken yavaş büyüyen tümörler

diğer anatomik yapılarda bası etkisi oluşturma kadar sessizce ilerler, büyük kitle oluşturur ve hastalar kafa içi basıncı (KİB) artışının özelliklerini gösterene kadar tanı almazlar.

PBT’de en sık rastladığımız semptomlar KİB artışının sonucu oluşan bulgular ve fokal nörolojik defisittir. Tümörün basısına bağlı olarak ortaya çıkan KİB artışı nonkominikan hidrosefaliye yol açar ve hastada özgünlük göstermeyen sessizce ilerleyen, lokalizasyon göstermeyen bir tablo meydana getirir. Küçük çocuklarda huzursuzluk, daha büyük çocuklarda ise akademik başarıda düşüklük, yorgunluk, uykusuzluk olarak kendini gösterir. Sabah saatlerinde daha ağırlaşan baş ağrısı, kusma atakları, yürüme ve dengede bozulma, hemiparezi, kraniyal sinir paralizisi ve görme bozuklukları ile hastalar başvurabilirler^{22,23}. KİB artışı ilk semptom ise kitlenin anatomik lokalizasyonu büyük ihtimalle ventrikül ve derin orta hat yapılarıdır. Artmış KİB’e bağlı hızlı klinik kötüleşme ender olarak görülür, böyle bir durumda posterior fossa tümörleri akla getirilmelidir²³.

MSS tümörlerinin neden olduğu baş ağrıları diğer etiyolojilere bağlı baş ağrılarından çok daha şiddetli bir şekilde ortaya çıkar. Ağrının şiddeti hastanın pozisyonu ile değişkenlik gösterir, hasta yatarken baş ağrısı kötüleşir ve bu durum pratikte ‘uykudan uyandırma’, ‘sabah uyandığında çok şiddetli olma’ cümleleri ile ifade edilir. Hastaların kusma atakları sonrasında rahatlaması oldukça tipiktir, ancak ağrı progrese olur ve diğer tüm ağrılardan ‘farklı’ olarak betimlenecek hale gelir. Bazen ağrının başlangıcından aylar sonra hastalarda papilödem, strabismus ya da güçsüzlük gibi nörolojik bulgular gelişebilir^{24,25}.

Tümörün büyümesine kafatasının uyum sağladığı süt çocukluğu döneminde, semptomlar çok sessiz ve sinsi ilerleyebilir. Huzursuzluk, iştahsızlık, büyüme gelişmede gecikme ve gerileme olarak spesifik olmayan bulgular görülebilir. Bu hastalar fundoskopik olarak değerlendirilse bile muayenede papil ödemin eşlik etmediği optik solukluk görülebilir²⁵.

Dorsal orta beyinde oluşan KİB artışı Parinaud Sendromuna neden olur ve hastalarda tipik olarak yukarı bakış kısıtlılığı ve ışık refleksinin bozulduğu büyük pupiller gözlenir. Bilateral dışa nistagmus ile birlikte ortaya çıkan konverjan bakış sonucunda göz kürelerinin retraksiyonu oluşabilir. Dördüncü kraniyal sinir tutulumuna bağlı olarak göz küresi yukarı ve laterale deviye olabilir. Bu hasta grubunda kompanzasyon için baş sağlam gözün tarafındaki omuza doğru eğilir^{23,25}.

Hasta KİB artışından bağımsız nöbet, ataksi, görme bozukluğu, kraniyal sinir tutulumu, motor kayıp ile başvuruyor ise tümör büyük ihtimalle serebral hemisfer, beyin sapı veya serebellum gibi parankimal yapılardan kaynaklanıyordur²⁶. Posterior fossa lokalizasyonu gösteren beyin tümörlerinde serebellar herniasyon gelişebilir. Bu tablonun başlangıcında hastalarda ense sertliği ve baş eğme şeklinde ortaya çıkan servikal kök irritasyonu görülebilir. Çevreye ilgisizlik gibi bilişsel semptomlar, altıncı kraniyal sinir basısına bağlı horizontal diplopi gibi bulgular da KİB artışı sonucu ortaya çıkabilir²⁷.

Tümörün lokalizasyonu açısından uyarıcı semptomlar da bulunmaktadır. Örneğin hemiparezi, hemisensoriyel kayıp, hiperrefleksi, nöbet ve görme bozukluğu ilk başta supratentorial beyin tümörlerini düşündürmektedir. Tek gözde görme kaybı, bir ışık kaynağını bir gözden diğer göze hareket ettirirken pupilla boyutunda paradoksik artış, optik sinir yolağında bulunan tümörler için karakteristiktir. Sarkaç tipi nistagmus, baş sallama ve eğme üçlüsü olarak tariflenen spasmus mutans tablosu ise süt çocuklarının kiazmatik tümörleri için spesifik bir klinikidir²⁸.

Tümör lokalizasyonuna bağlı oluşan semptomlara göre tümörün alt tipi hakkında da fikir edinilebilir. Hipofizde yer alan germ hücreli tümör ve kraniofarenjioma görme bozukluğu, hipotalamik disfonksiyon ile gelebilir. Optik yolakta yer alan glial tümörler görme kaybına yol açabilir. Koroid pleksus tümörü ve suependimal dev hücreli astrositoma gibi ventrikülleri kaplayan tümörler obstruktif

hidrosefali tablosuna yol açarak KİB artışı ilişkili semptomlara yol açabilirler. Diffüz astrositom, diffüz yüksek dereceli orta hat gliomaları (DIPG), germ hücreli tümörler thalamus ile ilişkili parezi, parestezi, ağrı ve psikomotor yavaşlama yapabilirler. Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör, ganglioglioma, temporal lob ilişkili nöbetler ile karşımıza çıkabilirler. Medulloblastoma , pilositik astrositoma ve ependimomalar posterior fossada görülürken ataksi, görme bozukluğu, parezi ve kraniyal sinir tutulumu oluşturabilirler. Yüksek ve düşük dereceli glial tümörler, germinoma, medullablastoma, atipik teratoid rabdoid tümör beyin sapı tutulumu yapabilir ve buna bağlı kraniyal sinir defisitleri, Parinaud sendromu ile karşımıza çıkabilirler²⁹.

Nöbet çocukluk çağı beyin tümörlerinin ender bir bulgusudur. Nöbet bulgusu olan çocukların yaklaşık %1-3'nde beyin tümörü saptanırken, beyin tümörü olan çocuklarda tanı ve sonraki tedavi süreci dahil olacak şekilde %24-35'nde nöbet gözlenir. Nöbetin status epileptikus şeklinde ortaya çıkması, postiktal döneme ait paralizinin normalden uzun olması, medikal tedavilere yanıtızsız olması ve fokal bulguların eşlik etmesi, tümör ile ilgili olma olasılığını artırır^{30,31}. Nöbetlerin çoğu, tanıda veya tedavi sırasında ortaya çıkmaktadır. Lokalizasyon temel belirleyici olup, serebral korteks ilişkili tümörler genelde nöbet ile ilişkili iken, infratentorial olan tümörler daha ender olarak nöbet ilişkilidirler. Özellikle temporal korteks ile ilişkili tümörlerde %60-83 oranında nöbet görülmektedir³².

Supratentorial kitlelerin bilişsel etkisi oldukça sessiz ilerleyebilir, davranışsal sorunlar kitle büyürken gözden kaçabilir. Benzer şekilde sinsi bir ilerleyiş süt çocuklarının hipotalamik kitlelerine bağlı oluşan büyüme gelişme geriliği, zayıflama, paradoksik öfori ve iştah artışı gibi semptomlar ile de görülebilir⁵.

Serebelluma ait kitleler ataksi, sakarlık, el yazısında, koşmada ve konuşmada bozulma ile ilişkilidir. Serebellar hemisfer tümörleri nystagmus ve apendiküler asimetri, orta hat serebellar patolojiler ise dengesizlik ile karşımıza gelebilir.

Diplopi, dışa bakış kısıtlılığı, içe bakış felci yada gözün i e bakamaması, fasiyal yada işitme sinir bozuklukları gibi kraniyal sinir tutulumunu düşündüren bulgular beyin sapı tümörlerinde ortaya çıkabilir. Yüzde güçsüzlük, kornea refleks kaybı ve işitme kaybı bulguları serebellopontin tümörler için tipiktir⁵.

Beyin tümörlerine ait bazı semptomlar lokalizasyon ile ilişkisizdir. Karakter değişikliği, kilo kaybı veya artışı, erken veya geç puberte, uykuya meyil, kusma tüm lokalizasyonlara ait kitlelerde ortaya çıkabilir.

Primer MSS tümörlerinin %15'nde tanı anında yayılım vardır ve leptomeningeal tutulum kötü prognoz ile ilişkilidir. Özellikle medullablastoma ve ependiomamada görülen medulla spinalis tutulumuna bağlı sırt ağrısı, bağırsak ve mesane disfonksiyonu, ekstremitelerde güçsüzlük ve duyu kaybı meydana gelebilir³³.

3. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Histomolek ler  zellikleri Ve Yeni Sınıflandırma

MSS tümörleri 1979 yılından 2016 yılına dek histopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. 2016 yılında ilk kez moleküler değişikliklerin tanımlamalar içinde yer aldığı 'entegre tanı' sistemine ge ilmiştir³⁴. Bu radikal yaklaşım ile tanı ve tedavi algoritmalarında büyük değişiklikler yapılmış olup, hastaya özgün yaklaşım olanaklı hale gelmiştir. MSS tümörlerinde yapılan moleküler çalışmalar 2016 güncellenmesinden sonra hız kazanmış ve güncel sonuçların sınıflandırmaya dahil olabilmesi adına yeni

güncelleme için gereksinim ortaya çıkmıştır. O zamandan günümüze toplam yedi adet ingilizce ismi ‘C-IMPACT NOW’ olan yazı yayınlanmış bu makaleler 2021 sınıflamasına rehberlik etmiştir³⁵⁻⁴¹. DSÖ 2021 güncellemesi geleneksel yaklaşımları ortadan kaldırarak histopatolojik ve moleküler özelliklerin kombinasyonunu isimlendirmede vurgulayıcı bir şekilde bir araya getirdi⁴². Çocukluk çağı MSS tümörleri sınıflandırması 2021 güncellemesinden önce erişkinlerle birlikte yapılmış olup bu yaklaşım pediatrik MSS tümörlerinin kendine has özelliklerinin gölgede kalmasına neden olmaktaydı. Ancak son güncelleme erişkinlerle aynı histopatolojik terminolojiyi kullanan bu yaklaşımı değiştirmiştir. Derecelendirmede Roma rakamları (I, II, III) yerine Arap rakamları (1, 2, 3, 4) kullanılmış, her tümör tipinde ‘esas’ ve ‘istenilen’ tanı kriterleri ayrı ayrı tanımlanmıştır. Aynı tümör tipine ait olan farklı dereceler tek bir tümör tipi altında gruplandırılmış, oluşturulan 22 yeni başlık ve 14 majör değişiklik ile glioblastom terminolojisi başta olmak üzere birçok tümör tipinde kavramsal değişiklik yapılmıştır. Glioblastom tanımının izositrat dehidrogenaz (*IDH*) ve histon 3 (*H3*) mutasyonu göstermeyen erişkin diffüz glial tümör grubuna özgü olduğu belirtilmiştir. Glial tümör başlığı altında ‘pediatrik tip diffüz’ glial tümörler, ‘erişkin tip diffüz’ glial tümörlerden ayrılmıştır.

Bu yenilikçi yaklaşım maaliyeti arttırmış ve ileri seviye sağlık hizmetini tanı için zorunlu hale getirmiştir. Güncelleme sonrasında moleküler analiz çoğu tümör tanımlaması için gerekli hale gelmiş, hatta bazı tümör tipleri sadece metilasyon analizi sonrası tanısını alabilecek şekilde gruplandırılmıştır. Tüm bu değişim tanı için spesifik incelemeleri zorunlu hale getirmiştir.

PBT’nin bazı tipleri 2021 güncellemesi ile ilk defa erişkin beyin tümörlerinden ayrı bir grup olarak betimlenmiştir. Çocukluk çağı glial ve glionöronal tümörler; pediatrik tip diffüz gliomlar (pediatrik tip diffüz düşük dereceli gliomlar ve pediatrik tip diffüz yüksek dereceli gliomlar), iyi sınırlı astrositik gliomlar ve glionöronal ve nöronal tümörler olarak 3 grupta tanımlanmıştır.

Pediyatrik diffüz gliomlar erişkine benzer şekilde infiltratif büyüme paterni gösterir ancak  ocuk hastalarda, erişkin hastalarda çok sık rastlanan *IDH*, telomeraz ters transkriptaz (*TERT*) ya da *EGFR* mutasyonların yerine, mitojen aktive edici protein kinaz (*MAPK*) yolağı proteinlerini ve histon proteinlerini kodlayan genlerin mutasyonları g r l r^{43,44}. Pediyatrik diffüz gliomalar; histomolek ler özelliklerine göre düşük ve yüksek dereceli olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar.

Tüm pediyatrik diffüz düşük dereceli gliomalar (PDDDG) artmış mitoz sayısı, nekroz ve mikrovasküler proliferasyon içermemektedir. Bu grup çoğunlukla *MAPK* yolağına ait moleküler değişiklikler içermektedir. PDDDG'lar *my elo blastosis (MYB)* veya *MYB proto-oncogene like 1 (MYBL1)* değişimli diffüz astrositom, anjiosentrik, genç yaşın polimorf düşük dereceli nöroepitelyal tümörü, *MAPK* yolağı değişimi gösteren diffüz düşük dereceli gliom olarak alt gruplara ayrılır. Genç yaşın polimorf düşük dereceli nöroepitelyal tümörü ve *MAPK* yolağı değişimi gösteren düşük dereceli gliom ilk defa 2021 güncellemesi ile sınıflandırmaya dahil olmuştur. *MYB* veya *MYBL1* değişimli diffüz astrositom, genellikle uzun süreli epilepsi ile ilişkili olup yüksek dereceye ilerleme göstermez. *MAPK* yolağı değişimi gösteren diffüz düşük dereceli gliom ise herhangi bir gruba ait olmayan radyolojisi, kliniği ve prognozu müphem olan gruptur. PDDDG oldukça nadir ve yavaş ilerleyen bir tümör grubu olup, progresyonsuz sağ kalım süresi tüm kemoterapi seçenekleri için benzerdir⁴⁵.

 yi sınırlı astrositik gliomlar çoğunlukla astrositiktir ancak bazı alt grupları astrositikten çok ependimal tip tümörlerdir. Genelde düşük dereceli olmakla birlikte yüksek derece ve agresif davranış şekli gösteren tümörler de bu grupta yer alabilir.

Pediyatrik tip yüksek dereceli glial tümörler kötü klinik seyir ile karakterizedir. Moleküler olarak H3.1, H3.2 H3.3 histon proteinlerini kodlayan genlerde ve n rotofik tirozin reseptör kinaz (*NTRK*), anaplastik lenfoma kinaz (*ALK*), *proto-onkogen tirozin-protein kinaz (ROS1)* gibi reseptör tirozin

kinaz (RTK) genlerinde mutasyon saptanmaktadır⁴⁶. Alt grupları; diffüz orta hat gliomu (K27 mutant, EGFR mutant), difüz hemisferik gliom (g34 mutant), diffüz pediatrik tip yüksek dereceli gliomu; IDH ve H3 *WT* ve infantile tip hemisferik gliomdur (*ALK*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*, veya *MET* moleküler değişiklikler ile).

‘Diffüz orta hat gliomu, *H3K27* değişimli’ (derece 4); H3.1, H3.2, H3.3 kodlayan genlerin 28. pozisyonundaki lizin-metionin dönüşümü sonucu MSS orta hattında, kötü prognozla karakterize bir tümör grubu olarak ortaya çıkar. Bu grupta yer alan bazı tümörlerde ise *H3* gen mutasyonu bulunmayıp, EZH inhibitör protein (*EZH1*) geni yüksek ekspresyonu saptanmıştır. Bu genetik değişikliklere ek olarak *MAPK* yolağı, ATP bağımlı helikaz (*ATRX*) ve *TP53* mutasyonları da görülebilmektedir. *EGFR* mutasyonları içeren bitalamik diffüz orta hat gliomu da 2021 güncellemesinde bu grupta yer almaktadır^{44,47,48}.

Genç erişkin ve çocuklarda, serebral hemisfer lokalizasyonunda ortaya çıkan diffüz hemisferik gliom, H3 G34 mutant, derece 4 olarak sınıflandırılır ve histolojik olarak primitif ya da embriyonal tümör benzeri özellikler taşır. Bu tümör grubunda genelde *ATRX* ve *OLIG2* negatifliği ve *P53* protein pozitifliği gözlenmektedir⁴⁹.

İnfanil tip hemisferik gliom, klinik ve histolojik olarak oldukça heterojen bir gruptur. Lokalizasyon olarak serebral hemisfer tutulumu gösteren oldukça büyük kitlelerdir ve morfolojik olarak iyi sınırlı ve desmoplastik özellik gösterebilir. Genetik olarak *NTRK*, *ALK*, *ROS1*, *MET* gibi RTK genlerinin füzyonları ile karakterizedir. Yüksek dereceli olmakla birlikte kesin derecesi klinik belirsizliklerinden dolayı belirtilmemiştir^{50,51}.

Diffüz pediatrik tip yüksek dereceli gliom, H3 ve IDH mutant olmayan grubu için geçmişte kullanılan glioblastoma terminolojisi terkedilmiştir. Bu tümör grubu moleküler olarak oldukça heterojen

olsa da bir kısmında *PDGFRA*, *EGFR* veya *TERT* genlerinde değişim saptanırken, alt tiplendirmesi metilasyon profiline göre yapılmaktadır⁵².

İyi sınırlı astrositik gliomalar önceki sınıflandırmalarda “diğer astrositik tümörler” ve “diğer gliomlar” gruplarına dahil olan tümörler için yeni oluşturulan terminolojidir. Diğer tümör gruplarından infiltratif yerine itici büyüme şekli göstermesi ile ayrılır. Altı farklı alt grup içermektedir; astroblastoma MN1 değişimli, kordoid glioma, pilomiksoid alt grubunu içeren pilositik astrositoma, pleomorfik ksantoastrositoma, subependimal dev hücreli astrositoma, piloid özellikleri olan yüksek dereceli astrositoma^{11,42,53-56}. Yeni sınıflama ile metilasyon profili oluşturulması, piloid özellikler içeren yüksek dereceli astrositoma ve diffüz leptomeningeal glionöronal tümör gibi birçok tümör tipinin yorumlanması için zorunlu hale gelmiştir^{35,37}.

Pilositik astrositom (PA), derece 1, tümörleri sıklıkla posterior fossada ortaya çıkarak yavaş büyüyen kitleler olup çocuk hastalarda en sık görülen MSS tümörüdür. Histopatolojik olarak saçsı (piloid) uzantılara sahip astrositik hücreler, Rosenthal lifleri ve eozinofilik granüler cisimcikler ile karakterize olurlar. Görüntülemelerde, mural nodule sahip kistik bir kitle olarak ortaya çıkarlar. Vakaların %60’ında *BRAF-KIAA1549* mutasyonu görülürken, kalan kısımda BRAF mutasyonları ya da MAPK yolağı diğer genlerinde moleküler değişiklikler görülmektedir⁵⁷⁻⁵⁹.

Pilomiksoid astrositom; alt tipi derece 2 ya da 3’e tekabül eder, spesifik olarak erken yaş, hipotalamus veya kiazma optikumdan çıkma eğilimi gösterir. Monomorfik yapıları, anjiosentrik ve diffüz miksoid özellikleri ve lokal nüks ihtimallerinin daha yüksek olması ile diğerlerinden ayrılırlar⁶⁰. Moleküler olarak, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog (*BRAF-V600E*), siklin bağımlı kinaz (*CDKN2A/CDKN2B*) ve *TERT* gen değişiklikleri gözlenir.

Anaplastik özellik gösteren, *ATRX*, *CDKN2A/B* ve *H3K27M* genlerinde moleküler değişiklik pilositik tümörler, PA'ların genelinden farklı olarak kötü seyir gösterir ve takiplerinin bu göz önünde bulundurularak yapılması gerekir⁶¹⁻⁶³.

Astroblastom, *MNI* değişimli, grubunun derecesi belirsiz olup özgün histolojik bulguları, “astroblastik” psödorozet, anjiosentrik dizilim, vasküler hiyalinizasyon göstermeleri ve GFAP, OLIG2, EMA, D240 pozitif boyanmalarıdır.

Pediyatrik glionöronal ve nöronal tümörler genelde iyi huylu seyir gösterir ve cerrahi sonrası ek tedaviye ihtiyaç duymazlar. Bu tümör grubu için supratentorial ve kortikal yerleşim tipik olmakla birlikte moleküler olarak sıklıkla MAPK yolağına ait değişimler tespit edilmiştir. Papiller glionöronal tümör, rozet oluşturan glionöronal tümör ve difüz leptomeningeal glionöronal tümör gibi alt grupları bulunmaktadır.

Sınıflandırma en büyük ve radikal değişiklikleri gliomlar için yapsa da diğer tümör tipleri için de yenilikler barındırmaktadır. Ependimomlar çinko parmak translokasyon ilişkili (*ZFTA*) füzyonu ve grup Yes-1 ilişkili transkripsiyonel regülatör (*YAPI*) füzyonu içeren supratentorial ependimomlar, posterior fossa ependimomları Posterior Fossa- A ve Posterior Fossa- B olarak ayrılırken, spinal ependimomlar *V-myc Myelocytomatosis* Virüs ilişkili Onkogen (*MYCN*) amplifikasyonuna göre betimlenmiştir^{64,65}. 2016 sınıflaması ile wingless ilişkili entegrasyon (*WNT*) yolağı aktiveleşen, *sonic hedgehog* (*SHH*) yolağı aktiveleşen, grup 3 ve 4 olarak 4 gruptan oluşan medulloblastom, 2021 güncellemesi ile metilasyon ve transkriptom analizleri ile alt gruplara ayrılmıştır⁶⁶⁻⁶⁹.

Atipik teratoid rabdoid tümör (AT/RT); embriyonal tümör çok katmanlı rozetli (*ETMR*) ve diğer embriyonal tümörlerin sınıflandırması değişmese de AT/RT için 3 yeni alt grup, ETMR için *DICER1* moleküler değişikliği tanımlanmıştır. Ayrıca MSS nöroblastoması, *FOXR2* yolağının aktiveleştiği MSS

tümörü, *BCOR ITD* içeren MSS tümörü de güncel sınıflamada yer almaktadır. Histolojik ve moleküler özelliklerin entegrasyonunu içeren tanısal yaklaşım tüm tümör tipleri için gerekli hale gelmiştir^{37,40,70}.

DSÖ 2021 histomoleküler (patolojik) sınıflama tablo 2’de verilmiştir.

Tablo-2: 2021 Dünya Sağlık Örgütü Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması¹

DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ 2021 SINIFLAMASI	
Gliomlar, glionöronal ve nöronal tümörler	
	Erişkin-tip difüz gliomlar
	Astrositom, <i>IDH</i> mutant
	Oligodendrogliom, <i>IDH</i> mutant ve 1p/19q kayıplı
	Glioblastom, <i>IDH</i> mutant olmayan
	Pediyatrik-tip difüz düşük dereceli gliomlar
	Difüz Astrositom, <i>MYB</i> veya <i>MYBL1</i> değişimli
	Anjiosentrik Gliom
	Genç Yaşın Polimorf Düşük Dereceli Nöroepitelyal Tümörü
	MAPK Yolağı Değişimli Düşük Dereceli Difüz Gliom
	Pediyatrik-tip difüz yüksek dereceli gliomlar
	Difüz Orta Hat Gliomu, H3 K27 değişimli
	Difüz Hemisferik Gliom, H3 G34 mutant
	Difüz Pediyatrik-tip Yüksek Dereceli Gliom, <i>H3</i> ve <i>IDH</i> mutant olmayan

	İnfanıl-tip Hemisferik Gliom
	İyi sınırlı astrositik gliomlar
	Pilositik Astrositom
	Piloid Özellikler Gösteren Yüksek Dereceli Astrositom
	Pleomorfik Ksantoastrositom
	Subependimal Dev Hücreli Astrositom
	Kordoid gliom
	Astroblastom, <i>MN1</i> değişimli
	Glionöronal ve nöronal tümörler
	Gangliogliom
	Gangliositom
	Desmoplastik İnfanıl Gangliogliom / Desmoplastik İnfanıl Astrositom
	Disembriyoplastik Nöroepitelyal Tümör
	Oligodendrogliom Benzeri Özellikler ve Çekirdek Kümeleri İçeren Difüz Glionöronal Tümör
	Papiller Glionöronal Tümör
	Rozet Oluşturan Glionöronal Tümör
	Miksoid Glionöronal Tümör
	Difüz Leptomeningeal Glionöronal Tümör
	Multinodüler ve Vakuoler Nöronal Tümör
	Serebellumun Displastik Gangliositomu (Lhermitte–Duclos hastalığı)
	Santral Nörositom
	Ekstraventriküler Nörositom
	Serebellar Liponörositom

	Ependimal Tümörler
	Supratentoryal Ependimom
	Supratentoryal Ependimom <i>YAP1</i> füzyon-pozitif
	Supratentoryal Ependimom <i>ZFTA</i> füzyon-pozitif
	Posterior fossa Ependimomu
	Posterior fossa Ependimomu, PFA Grubu
	Posterior fossa Ependimomu, PFB Grubu
	Spinal Ependimom
	Spinal Ependimom, <i>MYCN</i> -amplifikasyonu gösteren
	Miksopapiller Ependimom
	Subependimom
Koroid pleksus tümörleri	
	Koroid Pleksus Papillomu
	Atipik Koroid Pleksus Papillomu
	Koroid Pleksus Karsinomu
Embriyonel tümörler	
	Medulloblastom
	Medulloblastom, genetik gruplar
	Medulloblastom, WNT yolağı baskın
	Medulloblastom, SHH yolağı baskın ve <i>TP53</i> mutant
	Medulloblastom, SHH yolağı baskın ve <i>TP53</i> mutant olmayan
	Medulloblastom, WNT ve SHH yolakları dışı
	Medulloblastom, histolojik gruplar
	<i>Medulloblastom, klasik</i>
	<i>Desmoplastik/Nodüler Medulloblastom</i>

			<i>Belirgin Nodülerite Gösteren Medulloblastom</i>
			<i>Büyük Hücreli/Anaplastik Medulloblastom</i>
	Diğer MSS embriyonel tümörleri		
			Atipik Teratoid/Rabdoid Tümör
			Kribriform Nöroepitelyal Tümör (geçici tip)
			Çok Katlı Rozetli Embriyonel Tümör
			SSS Nöroblastom, FOXR2 aktive
			<i>BCOR</i> İnternal Ardışık Duplikasyon Gösteren MSS Tümörü
			MSS Embriyonel Tümör, tanımlanmamış
Pineal bölge tümörleri			
			Pineositom
			Orta Derecede Farklılaşma Gösteren Pineal Parankimal Tümör
			Pineoblastom
			Pineal Papiller Tümör
			Pineal Bölgenin Desmoplastik Miksoid Tümörü, SMARCB1-mutant
Kraniyal ve paraspinal sinir tümörleri			
			Schwannom
			Nörofibrom
			Perinöriom
			Hibrid Sinir Kılıfı Tümörleri
			Malign Melanotik Sinir Kılıfı Tümörü
			Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörü
			Kauda ekuina nöroendokrin tümörü (MSS paragangliomu)
Meningiomlar			

MSS nin mezenkimal, non-meningotelyal tümörleri		
	Yumuşak doku tümörleri	
		Fibroblastik and miyofibroblastik tümörler
		Soliter Fibröz Tümör
		Vasküler tümörler
		Hemangiomlar ve vasküler malformasyonlar
		Hemangioblastom
		İskelet kası tümörleri
		Rabdomiyosarkom
		Belirsiz Başkalaşım (Gösteren)
		Intrakraniyal mezenkimal tümör, <i>FET::CREB</i> füzyon-pozitif
		<i>CIC</i> Değişimi Gösteren Sarkom
		Primer İntrakraniyal Sarkom, <i>DICER1</i> mutant
		Ewing Sarkomu
	Kondro-osseöz tümörler	
		Kondrojenik tümörler
		Mezenkimal Kondrosarkom
		Kondrosarkom
	Notokordal tümörler	
		Kordoma
Melanositik tümörler		
		Difüz meningeal melanositik tümörler
		Melanositozis ve Melanomatosis
		İyi sınırlı meningeal melanositik tümörler
		Melanositom ve Melanom

MSS nin hematolenfoid tümörleri			
	Lenfomalar		
		MSS lenfomaları	
		MSS Primer Difüz Büyük B-Hücreli Lenfoma	
		Immün Yetmezlik ile Beraber Görülen SSS Lenfomaları	
		Lenfomatoid Granülomatozis	
		Intravasküler Büyük B-Hücreli Lenfoma	
		SSS de bulunan diğer nadir lenfomalar	
		Duranın MALT Lenfoması	
		MSS nin Diğer Düşük Dereceli B-hücreli Lenfomaları	
		Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma (ALK+/ALK-)	
		T-Hücreli ve NK/T-Hücreli Lenfomalar	
	Histiyositik tümörler		
		Erdheim Chester Hastalığı	
		Rosai Dorfman Hastalığı	
		Jüvenil Ksanthogranülom	
		Langerhans Hücreli Histiyositoz	
		Histiyositik Sarkom	
Germ hücre tümörleri			
Sellar bölge tümörleri			
		Adamantinomatöz Kraniofarinjiom	
		Papiller Kraniofarinjiom	
		Pituisitom, Hipofizin Granüler Hücreli Tümörü ve İşsi Hücreli Onkositom	

			Hipofiz Adenomu /PitNET
			Hipofiz Blastomu
SSS metastazları			
			Beyin ve Medulla Spinalis Parankimine Metastatik Tümörler
			Meninkslere Metastatik Tümörler
Sinir sisteminin genetik sendromları			
			Nörofibromatozis tip 1
			Nörofibromatozis tip 2
			Schwannomatozis
			von Hippel-Lindau Hastalığı
			Tübero Skleroz
			Li-Fraumeni Sendromu
			Cowden Sendromu
			Yapısal Yanlış Eşleşme Onarım Bozukluğu (MMRD) Sendromu
			Familial Adenomatöz Polipozis Sendromu
			Nevoid Bazal Hücreli Karsinom Sendromu
			Rabdoid Tümör Predispozisyon Sendromu
			Carney Kompleksi
			DICER1 Sendromu
			Ailesel Paragangliom Sendromu
			Melanom-Astrositom Sendromu
			Ailesel Retinoblastom
			BAP1 Sendromu
			Fanconi Anemisi
			ELP1-medulloblastom Sendromu

4. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri – Radyolojik Özellikler

Çocuklarda en sık rastlanan ve en öldürücü kanser tiplerinden biri olan beyin tümörlerinin görüntülemesi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) de kaydedilen ilerlemeler sayesinde son derece gelişmiş, tümörün primer tanı ve tedavi sonrası değerlendirmesinde en önemli yeri almıştır. Beyin bilgisayarlı tomografisi (BT); aniden ortaya çıkan semptomlar (akut bilinç değişikliği, nöbet, akut nörolojik defisit vb gibi) için, hızlı ve sedasyon gerektirmemesi nedenleriyle ilk basamakta önemli bir tetkik olarak yerini korumaktadır. Çocukluk çağı MSS kitlelerinde MRG 1,5 veya 3 Tesla görüntüleme birimlerinde yapılabilir. Burada en önemli nokta, optimal kalitede, objektif yoruma izin verecek ve gerekli sekansları içeren optimal çekimin yapılmasıdır. Hastaların takip edildiği merkezlerde standart MRG çekiminin yanı sıra manyetik rezonans spektroskopisi (MRS), difüzyon tensör görüntüleme ve perfüzyon MRG gibi ileri MRG incelemelerin yapılabilmesi gerekir.

Tümörün yerleşim yeri ve tümör tiplerine özgü radyolojik bulgular, tanı koymada patolog ve cerrahlara oldukça faydalı bilgiler sunmaktadır.

Pilositik astrositomlar, serebellum ve optik yolda farklı davranış şekli gösterir. Serebellumda ‘kontrast tutan mural nodül içeren kistik lezyon’ olarak ortaya çıkarken, optik yolda kontrast tutmaz ve daha infiltratif bir görüntü oluştururlar. Pilomiksoid astrositomlar ise suprasellar sisternadan köken alarak H biçiminde temporal loblara yayılım gösterirler⁷¹.

Diffüz astrositomlar supratentorial ve kortekse yakın olarak yer alan, kontrast tutmayan, bazen mikrokist içeren hafif bir kitle formu olarak karşımıza çıkarlar. Kontrast tutulumu yüksek dereceyi akla getirirken, T2-FLAIR uyumsuzluğu görüldüğünde ayırıcı tanıda IDH mutant tipler düşünülmelidir.

Pleomorfik ksantoastrositom oldukça yavaş büyür ve kemik destrüksiyonuna neden olabilir, görüntülemeye ödem beklememekle birlikte bazen hafif kontrast tutulumu saptanmaktadır⁷².

Anjiosentrik gliomlar, kalsifikasyon gösterebilen kontrast tutmayan girus ekspansiyonu ile karakterize tümörlerdir

Diffüz Orta Hat Gliomu, H3K27M-mutant tümörler, sıklıkla posterior diffüz ekspansiyon ve nadiren kontrastlanma gösteren, nekroz ve kist içermeyen, baziler arteri saran ancak akımını bozmayan kitleler olarak görüntülenir. Diffüzyon kısıtlanması kötü prognoz ile ilişkilidir. Diffüz orta hat gliomu, H3G34-mutant tümörler ise daha heterojen görüntüleme özelliklerine sahiptir. Nekroz, kanama ve kontrastlanma içerebilir. Nöronal-gliyal tümörler yavaş büyüyerek kemik destrüksiyonuna neden olabilir ve genelde kortikal yada giral yerleşim gösterirler.

MSS'nin embriyonel tümörleri, kötü huylu, agresif davranışlı, MSS'ye yayılma eğilimi gösteren tümörlerdir. Medulloblastom (MB), en yaygın olan embriyonel tümör olup, posterior fossada yerleşir. Moleküler profilden bağımsız olarak, tüm embriyonel tümörlerde olduğu gibi MB'lerde de difüzyon kısıtlanması izlenir. Grup 3 ve Grup 4 MB'ler genellikle orta hat ve 4. ventrikülü takip eder ve tanı aşamasında BOS yoluyla yayılmış olabilirler. WNT-MB ise serebellar pedinküller veya serebellopontin açığına doğru yerleşir ve genellikle BOS yoluyla metastaz göstermezler. SHH-MB alt grubu ise serebellar hemisferlerin lateralinden kortikal olarak kaynak alır ve nodüler veya piriform yapı gösterir. Diğer moleküler tipler yoğun kontrastlanırken Grup 4 MB kontrast tutmaz^{73,74}.

AT/RT olgularının 2/3'ü posterior fossada, geri kalanlar ise beyin hemisferlerine yerleşir. Radyolojik olarak, kontrast tutulumu olan kist, nekroz ve kanama komponentleri içeren orta hat kitleleri şeklinde tanımlanırlar⁷⁵.

Ependimal tümörler, sıklık sırasına göre posterior fossa, supratentoryal bölge ve spinal bölgede yerleşirler. Çocuk posterior fossa ependimomları; lateral yerleşimli posterior fossa-A ve orta hat

yerleşimli posterior fossa-B olarak ayrılırlar. Supratentorial ependimomlar ise frontoparietal bölge ve lateral ventriküllere yakın yerleşim gösterirler. Görüntülemelerinde tipik olarak yoğun kontrastlanma, heterojen ve yüksek T2 sinyali saptanmaktadır. Kalsifikasyon bulunabilir^{76,77}.

5. Pediatrik Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri – Tedavi Yaklaşımları

Beyin tümörleri çocukluk çağında görülen kanser ilişkili ölümlerin en sık sebebidir. Tedavi çocuğun yaşı, tümörün yerleşim yeri ve tipi, klinik bulguların aciliyetine göre şekillenmekte olup, cerrahi çok önemli bir yer tutmaktadır. Tümörün tam yada tama yakın çıkarılabilirliği olmasının yaşamda kalma oranlarına önemli katkısı bulunmaktadır. Radyoterapi (RT) bir diğer önemli seçenek olup, burada en önemli sınırlayıcı faktör çocuğun yaşı olarak karşımıza çıkmaktadır. Kombine kemoterapiler yada son yıllarda hedefli tedaviler de diğer seçenekler olarak kullanılmaktadır. Tedavilerdeki son gelişmeler medulloblastom ve düşük dereceli gliom hastaları için 5 yıllık yaşam şanslarını %75 üzerine çıkarırken, yüksek dereceli gliomlarda prognoz hala kötüdür^{78,79}. Tümörün kendisinin yanısıra tedavi ilişkili komplikasyonlar da büyük sorun oluşturmaktadır. Son 15 yıl içerisinde yapılan çalışmalar ile risk baz alınarak verilen tedavi kararları sayesinde düşük riskli gruplarda sekelsiz ve yan etkisiz izlem oranında iyileşmeler gözlenmiştir.

Tümör tiplerine göre bakıldığında, en sık görülen tip olan medulloblastom (MB)'da tedavi, geniş rezeksiyonu takiben kraniospinal RT ve kemoterapi şeklindedir. Bu şekilde tedavi edilen hastalarının yaşam oranları son 40 yılda belirgin olarak artmıştır⁸⁰. Üç yaş altı olan ve nodüler/desmoplastic tümörü olan çocuklarda intratekal metotreksat ile verilen çoklu-ajan kemoterapisinin RT olmaksızın iyi prognoz ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Ancak klasik veya anaplastik varyant tümörü olan çocuklarda mevcut tedavi seçenekleri ile hala prognoz kötüdür⁸¹.

Ependimom'larda, metastaz olmaması durumunda ve infant grubu dışında, total veya totale yakın geniş rezeksiyon sonrası fokal fraksiyone RT standart tedavi yaklaşımını oluşturmaktadır⁸². Çeşitli klinik araştırmalar alkileyici ajanların kombinasyonunun sisplatinli veya sisplatinatsız yeni tanı almış ependimomlar için etkin olduğunu göstermiştir⁸³. COG 9942 çalışmasında, metastazın eşlik etmediği ependimom'larda maksimal cerrahi sonrası rezidü kalması durumunda 4 siklus sisplatin, siklofosdamid ve vinkristin tedavisinin RT öncesi verilmesi durumunda prognozun total rezeksiyon olan hastalar kadar iyi olduğu gösterilmiştir⁸³. Düşük dereceli gliomlarda maksimum cerrahi en ideal tedavi seçeneğidir. Tam çıkarılabilmiş bir kitle sonrası, 10 yıllık progresyonsuz sağkalım oranı %85 üzerindedir ve RT'ye ihtiyaç duyulmamaktadır. Ancak tam çıkarılamayan, radyolojik olarak rezidü saptanan olgularda sağkalım %50'nin altına düşmektedir⁸⁴. Lokasyon ve/veya infiltratif davranış şekli nedeni ile tam rezeksiyonun mümkün olmadığı hastalarda konvansiyonel kemoterapi ve RT seçeneklerine gidilmektedir. RT'nin uzun dönem sekelleri göz önünde bulundurulduğunda konvansiyonel kemoterapi seçenekleri ile küçük çocuklarda RT'den kaçınılmaya veya elden geldiğince bu tedavi seçeneği ertelenmeye çalışılmaktadır^{85,86}.

COG-A9952 çalışmasında, rezeke edilemeyen düşük dereceli glial tümörlerde karboplatin, vinkristin rejimi tioguanine, prokarbazin, lomustin ve vinkristin kombinasyonu ile karşılaştırılmıştır. İki rejimin de tümör progresyonunu anlamlı olarak geciktirdiği ortaya konulmuştur⁸⁷. Hedefli tedavi modalitelerini içeren güncel çalışmalarda; BRAF-V600E mutasyonu olan hastalarda, karboplatin-vinkristin kombinasyonuna üstün bir alternatif olarak, dabrafenib ve trametinib (MEK inhibitörü) ve MEK1/2 (MAPK/ERK) kinaz inhibitörü selumetinib tedavilerinin başarılı sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca everolimus gibi mTOR inhibitörleri ve bevasizumab gibi antianjiojenik ajanlar ile ilgili de yüz güldürücü sonuçlar elde edilmektedir⁸⁸⁻⁹⁰.

Yüksek dereceli gliomlar lokasyonuna göre orta hatta ve beyin sapı dışında yer alan gliomlar olarak ayrılır. Orta hat gliomlarının, hayati organlardaki konumu nedeni ile rezeksiyonları mümkün değildir. Konvansiyonel kemoterapi ajanlarına dirençlidir. Bu hasta grubu için moleküler hedefe yönelik tedavi seçenekleri geliştirebilmek, sağkalım sürelerini artıracak muhtemel bir seçenektir. Son çalışmalar RT ile eş zamanlı ve sonrasında verilen kemoterapinin etkisi üzerinde durmuştur. COG-ACNS0126 çalışmasında, RT esnasında verilen günlük temozolomidin adjuvant tedavi siklusları ile takip edilmesinin erişkinin tersine çocuk hastalarda katkısının olmadığı gösterilmiştir^{91,92}. COG ACNS0423 çalışmasında ise, lomustin ve temozolomid kombinasyonunun, tek başına temozolomid tedavisine kıyasla sağkalımı değiştirmediği gösterilmiştir⁹³. Vorinostat veya bevasizumab tedavilerinin RT kombinasyonu ile temozolomid ve RT kombinasyonu ardından verilen bevasizumab ve temozolomid tedavilerinin sonuçlarını karşılaştıran COG ACNS0822 çalışmasında ise çocuk hastalara sağkalım açısından katkı sağlamadığı gösterilmiştir⁹⁴. Birçok farklı ülkenin dahil olduğu HERBY çalışmasında RT ve temozolomid kombinasyonuna bevasizumab tedavisinin eklenmesinin sağkalım açısından faydası olmadığı gösterilmiştir⁹⁵. RT öncesi ve sonrası verilen kemoterapiler karşılaştırıldığında da sonuçlar yine hayal kırıklığı olmuştur⁹⁶. RT ile eş zamanlı verilen kemoterapi, radyo duyarlaştırıcı ajanlar ve büyüme faktörlerinin etkisini araştıran çalışmalarda da benzer şekilde olumsuz sonuçlar elde edilmiştir^{97,98}. Tüm bu olumsuz sonuçlar göz önüne alındığında hedefli tedavilere ilgi artmış olup, K27M mutasyonu olan hastalarda, histon deasetilaz inhibitörlerinden olan panobinostat, in vitro olarak DIPG ortotopik ksenograft modellerinde denenmiş ve sonuçların umut vadeci olduğu raporlanmıştır⁹⁹. Henüz klinik çalışmalarda histondeasetilaz inhibitörlerinin fark yarattığına dair bir bilgiye ulaşamamıştır¹⁰⁰.

Ayrıca BRAF-V600E ve MAPK inhibisyonu yapan dabrafenib ve trametinib tedavilerinin BRAF mutasyonu taşıyan yüksek dereceli gliomlarda yeri araştırılmaktadır. IDH, K27 veya BRAF mutasyonu

taşımayan tümör alt gruplarında da poli ADP-riboz polimeraz (PARP) inhibisyonu yapan, ABT888 ajanının radyo duyarlaştırıcı etkisi çalışılmaktadır. Ayrıca Pasifik Nöro-Onkoloji Konsorsiyumu, K27 mutasyonu olan tümörler için peptid bazlı immunoterapi modeli oluşturmuş ve prelinik sonuçlar yüz güldürücü olmuştur¹⁰¹.

Nöroradyolojik görüntülemede, cerrahi teknoloji, konformal RT ve konvansiyonel kemoterapinin son yıllarda hızlı bir şekilde gelişmesi ile çocuklarda MSS tümörlerinde prognoz belirgin olarak iyileşmiştir. Güncel çalışmalar ışığında ortaya konan moleküler karakterizasyon sayesinde de tümör özgü yaklaşımların kazanılması sağlanmıştır. Bu yaklaşımlar özellikle düşük dereceli gliomlarda önemli başarılar sağlamıştır ancak diğer tümörlerde hala çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize olan ve mevcut tedavi seçeneklerine dirençli yüksek dereceli glial tümörler için acil yenilikçi tedavi seçeneklerinin araştırılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

6.Otofaji Ve Kanser

A. Otofaji

Otofaji; hücre dengesini sağlayan sitoplazmik materyallerin, lizozomlara degradasyon için yönlendirilmesinden sorumlu, katabolik süreçlerden biridir. Evrimsel sürecin bir parçası olup fonksiyonunu kaybetmiş organellerin, protein agregatların ve uzun süredir yaşayan proteinlerin eliminasyonunu sağlayarak hücre homeostazının korunmasını sağlar. Otofajinin 3 farklı sınıfı tanımlanmıştır; makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon ilişkili otofaji.

Makro-otofaji; hedef aldığı sitoplazmik yapıya göre toplu ve selektif otofaji olarak ikiye ayrılır. Toplu otofajide degradasyon mekanizması temel olarak selektif olmadan çift membranlı otofagozom moleküllerini hedef alır. Diğer yandan selektif otofaji mekanizmasında otofaji substratları mitokondri,

peroksizom, lizozom, endoplazmik retikulum, ribozom, lipid damlaları, patojenik intraselüler katlantılar, serbest protein ve RNA'ların içinde bulunduğu otofagozomlardır¹⁰²⁻¹⁰⁶. Makromolekülleri otofaji aracılığı ile yeniden sıklusa katabilme, hücrelere stres koşulları altında (besin yoksunluğu, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, metabolik stres gibi) hayatta kalma şansı tanır¹⁰⁷. Selektif otofaji mekanizması, organelleri ihtiyaç durumlarına göre değerlendirir, fonksiyon görmeyen kompartmanları elimine eder ve ubiquitin proteozom sistemi aracılığı ile patojenleri yok eder¹⁰⁸.

Belirli koşullar altında otofaji yolağı fazla aktive olur veya regülasyonu bozulur, bu durum da hücre ölümü ile sonuçlanır. Otofajinin hücre için bir kurtarıcı mı yoksa hücre ölümünü tetikleyici mi olduğu, hücre tipine ve çevresel koşullara bağlı olarak değişir¹⁰⁹.

B. Kanserde Otofaji

Kanser hücreleri hipoksi, besin eksikliği, oksidatif stres gibi stress koşullarında hayatta kalmak için otofaji yolağına sıkça ihtiyaç duyarlar¹¹⁰. Ayrıca tümör hücreleri otofaji yolağı sayesinde metastaz, invazyon, migrasyon ve kolonizasyon gibi tümör progresyonunu tetikleyen adımlara hızla adapte olabilirler¹¹¹.

Sitoplazmik materyallerin otofaji sayesinde tekrar geri kullanılabilir olması, kanser hücrelerine enerji devamlılığı sağlayıp, ölmelerini engeller ve tümörün rekürrensini ve metastazını tetikler¹¹¹⁻¹¹³. Otofaji süreci otofagozom olarak tanımlanan çift membranlı veziküllerin oluşumu ile tetiklenir. Çeşitli içeriğe sahip otofagozomlar, lizozomlar ile birleşekerek otolizozomları meydana getirirler¹¹⁴.

Fagositoza uğrayan materyaller lizozomal hidrolazların etkisi ile bozulur ve ortaya çıkan yapı taşları, yeniden kullanılmak üzere sitozole geri transfer olur. Aminoasit eksikliği, serum açlığı, büyüme faktörlerinin yokluğu, hipoksi, çeşitli kimyasallara maruz kalmak ve stres koşulları gibi çeşitli

stimölasyonların etkisi ile otofaji yolağı aktif hale gelir. Yapılan bazı çalışmalar otofaji yolağını tetkikleyen, otofaji ilişkili genleri (Autophagy-related gene – ATG) ve yolak ile ilgili moleküler değışikliklerin detaylarını tanımlamıştır¹¹⁵.

Otofaji yolağı; başlangıç, nükleasyon, maturasyon, füzyon ve degradasyon olarak çeşitli fazlara ayrılır. Otofaji mekanizması otofaji tetikleyici faktörlerin ‘unc-51-like kinaz 1 (ULK1)’ sistemini aktive etmesi ve bunun otofaji ilişkili proteinler *ATG13*, *ATG101* ve *FIP200* ile ilişkiye girmesi sonucu başlar¹¹⁶. Bu kompleks fagoforların (lipid çift tabakasından türetilen izolasyon membranı) nükleasyonunu tetikler ve oluşan çift membranlı yapılar sitoplazmik materyalleri yutmaya başlar. Fagofor ilişkili olaylar zinciri ER’nin otofagozom ilişkili kısmında gerçekleşir¹¹⁷. Nükleasyon süreci fosfatidilinozitol 3-fosfat III ve Beklin-1 aktivasyonu ve bu komplekse fosfatidil inozitol-3 kinaz (*PI3K-III*) ve fosfatidil inozitol-3 fosfat (*PI3P*) komponentlerinin dahil olması sonucu ortaya çıkar^{118,119}. Otofagozom oluşumunda PI3P oluşumu ile birlikte ATG5, ATG12 ve ATG16 komponentleri görev alır¹²⁰. Bu aşamadan sonra elongasyon kısmı başlar. Elongasyon kısmında ATG5, ATG12 ve ATG16 proteinlerinin oluşturduğu oligomer LC3-fosfatidiletanolamin (PE) ile otofagozom yüzeyinde reaksiyona girer ve ATG4, ATG3 ve ATG7 ile birlikte LC3-II-PE kompleksini oluşturur. Otofagozom elongasyonu sırasında, LC3-II-PE kompleksin iç membranında sitozolik yapılar ile reaksiyona girer, sekuestozom 1 (p62/SQSTM1) gibi yapılar ile işaretlenir¹²¹. Elongasyon tamamlandığında, otofagozomlar lizozom ile füzyon oluşturarak maturasyon süreci içerisine girer. Maturasyon esnasında otolizozom oluşumunu tetikleyen şey ATG’lerin otofagozom dış membranından ayrılmasıdır¹¹⁹. Bu aşamada materyal lizozomal enzimler tarafından parçalanır ve otofaji süreci tamamlanmış olur. Otofaji yolağı, katabolik bir süreç olup çok farklı mekanizmalar ile düzenlenir. AMP-aktif protein kinazlar (AMPK) ve mTOR, otofajinin iki temel kontrol mekanizmasıdır ve enerji ihtiyacı dedektörleri olarak görev alırlar¹²².

mTOR kompleksi, mTORC1 ve mTORC2'den oluşur. Otofaji regülasyonundaki direkt roller incelendiğinde, mTORC1; ULK1 ve ATG13 fosforilasyonu ile direkt ilişkilidir. Bu fosforilasyon da, başlangıç kompleksinin inaktivasyonu ve otofaji inhibisyonuna neden olur^{123,124}. mTORC2 ile ilgili hala yeteri kadar veri bulunmamaktadır. Büyüme faktörlerine yanıt olarak PI3K/protein kinaz B (Akt) ve Ras/Raf/mitojen aktive protein kinaz (MEK) / ekstraselüler sinyal regüle kinaz (ERK) sinyal yolları, mTOR'u aktive eder¹²⁵. PI3K aracılı PIP2'nin PIP3'e dönüşümü Akt fosforilasyonuna neden olur bu da mTORC1 kompleksini aktive eder ve sonuç olarak otofaji yolağı inhibe olur. Bu yolak tümör baskılayıcı geni olan ve PI3K inhibe eden fosfatı kodlayan fosfat ve tensin homologu (PTEN) tarafından negatif olarak kontrol edilir¹²⁶. PI3K/Akt kompleksine benzer olarak büyüme faktörleri ile uyarılmış RAS/MEK/ERK yolağı da, mTORC1 kompleksini aktive eder ve bu süreç otofaji inhibisyonu ile sonuçlanır¹²². mTOR regülasyonuna zıt olarak AMPK bu aktivasyonu tersine çevirir¹²². Böylece enerji seviyesi düştüğünde, intraselüler kalsiyum artışı ve/veya yüksek sitokin konsantrasyonu oluştuğunda, AMPK active olur, bu da otofaji yolağını indükler^{127,128}.

Onkoloji dünyasında otofaji konseptine bağlı olarak değişen etkilere sahiptir. Otofaji modülasyonunda tek yönlü yaklaşım kanser tedavilerinde başarılı sonuçlara sahip olamaz. Ayrıca kanser çalışmalarında odaklanılan birçok yolağın da otofaji ile etkileşimi söz konusudur, yani otofajiden kaçınılan bir kanser tedavi mekanizması oluşturmak neredeyse imkansızdır. Fizyolojik stimülasyonlara ek olarak, özellikle sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokusunda farklı etkiler yaratan besin eksikliği veya hipoksi gibi faktörler otofaji yolağında belirgin değişiklikler yaratır. Tüm bu ilişkiler, özellikli durumlara müdahaleye imkan sağlamak için açıklığa kavuşturulmalıdır. Yapılan çalışmaların çoğu otofaji inhibisyonu etrafında planlanmış olup, hastaların çoğunlukla bundan fayda gördüğü gösterilmiştir. Örneğin; otofaji inhibitörü klorokin veya hidroksiklorokin ile yürütülen klinik çalışmalar, kanser tedavisi olarak otofaji yolağını hedef almanın güvenli olduğunu ortaya koymuştur. Hastalarda

nörolojik toksisiteye rastlanmamış olup, farelerde otofaji inhibisyonu sonrası görülen nörodejenerasyonun insanlar için mutlak geçerliliği olmadığı gösterilmiştir ¹²⁹.

Günümüze kadar yürütülen klinik çalışmaların çoğu, lizozomal inhibisyon yapan klorokin ve derivelerine onaklanmıştır. Daha güçlü, spesifik ve ULK1, VPS34 ve ATG4B gibi otofajinin erken modulatorlerini inhibibe eden tedavi seçenekleri de geliştirilmektedir^{130–135}. Ön veriler umut vadeditici olsa da kesin sonuçlar için prelinik çalışmaların devamına ihtiyaç duyulmaktadır. Henüz yanıtlanmamış en önemli sorulardan biri; otofagozomların oluşumunu engellemenin mi, otofagozomların lizozomal inhibitörler aracılığı ile degradasyonunu baskılayanın mı daha avantajlı olduğudur. Otofagozomların birikiminin apoptoz ve nekroptoz'u indükleyebileceği gözetildiğinde otofagozom oluşumunu engellemek yerine lizozomal degradasyonunun kanser hücresi ölümü açısından daha avantajlı bir durum oluşturabileceği düşünülebilir¹³⁶. Ayrıca otofaji indükleyicilerinin onkogenezi engelleme potansiyeli de açıklığa kavuşturulmamış diğer konulardan biridir.

Otofajiyi artırmanın kansere neden olan genomik mutasyonları engellediğini ve tümör oluşumunu tetikleyen inflamasyonu baskıladığını ön gören çalışmalar bulunmaktadır¹³⁷. Bu oldukça kompleks bir soru olup, otofajinin farklı genetik zeminlerde, farklı açılardan kanser oluşumunu tetikleyici ve baskılayıcı etkilerinin incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Otofajinin beyin tümörlerindeki etkisini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; gliomalarda otofaji yolağı hem tümör baskılayıcı bir davranış şekli gösterir, hem de sağkalımın artmasını sağlayacak birçok süreçte görev alır¹³⁸. Otofaji yolağının glial tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyon aşamalarında etkili olduğu gösterilmiştir^{139,140}. Glioma hastalarının standart tedavi modalitesi olan temozolamid ve radyoterapinin, otofaji yolağını aktive ettiği gösterilmiştir^{141–143}. Otofaji ile ilişkili beyin tümörü örneklerinden biri erişkin beyin tümörlerinde tümörögenesis ile ilişkilendirilen

antidepresan araştırmalarıdır. Otofaji yolağı modulasyonu yapan antidepresanların tümör büyümesi ve progresyonunu kontrol edebildiği gösterilmiştir. MSS'ne geçebilme kapasiteleri büyük avantaj olan bu tedavi ajanlarının, tümörün merkezinde stres ilişkili faktörlerin ve otofaji ilişkili mekanizmaların en aktif olduğu hücrelerde daha etkin olduğu g sterilmiřtir¹⁴⁴.

Erişkine benzer şekilde  ocuk ve adolesan beyin tümörleri de hem inhibisyon hem aktivasyon ile ortaya a ıkan otofaji disregülasyonunun tespit edilmesi ile hedef tedavi seçenekleri açısından potansiyel bir araştırma odağı haline gelmiřtir¹⁴⁵. Oluşturulan medulloblastom hücre modellerinde otofaji inhibisyonunun tümör büyümesini engellediği ve invazyon kapasitesini azalttığı g sterilmiştir^{15,146}. Ayrıca otofaji inhibisyonu yapan, mTOR'u hedef alan ajanların medulloblastomda etkili olduğu ortaya konmuřtur¹⁴⁷. Sonuçlar otofaji aktivasyonuna neden olan mTOR inhibisyonunun tümör büyümesini engellemede potansiyel hedeflerden biri olduğunu göstermiştir. Düşük dereceli gliomalarda BRAF-V600E mutasyonunun otofaji inhibitörlerine duyarlılığı artırdığı g sterilmiřtir¹⁴⁸. Pediatrik yüksek dereceli gliomalarda miR-17-92 kümelerinin eksikliğinin PI3K/Akt/mTOR yolağı regülatörü ve otofaji yolağına ters yönde etki eden PTEN ve RB1 regülasyonunda artışa neden olduğu g sterilmiştir^{126,149}. Ancak otofajinin karmaşık doğasının, bu tedavi modaliteleri ile olan ilişkisi hala açıklanamamıştır. Otofajinin özellikle tedavi direnci ile olan ilişkisi çalışılması gereken bir konudur^{142,150,151}. Tüm bunlar otofajinin tümör büyümesini nasıl etkilediğinin derinleştirilmesinin pediatrik beyin kanserinde terapötik olasılıklar için yeni bir ufuk sağlayacağını göstermektedir.

7. Pediatrik Beyin Tümörleri ve Otofaji Yolağı İle İlişkileri

7.A. Pediatrik Embriyonal Tümörler

MSS embriyonal tümörleri (ET), medulloblastom (MB), atipik teratoid/rabdoid tümör, kribriform nöroepitelyal tümör, çok katmanlı rozetli ET, FOXR2 aktive MSS n roblastoması, BCOR internal

tandem duplikasyonu olan MSS tümörü, sınıflandırılmayan ET'ler gibi tümörler, PBT'nin büyük bir kısmını oluştururlar.

7.A.a. Medulloblastom

Medulloblastom (MB), en sık PBT olup, genellikle 0-4 yaş arasında tanı alır. Sıklıkla posterior fossa da, serebellumdan köken alırlar. Histolojik olarak, nöronal kök ve progenitör hücrelerden köken alan az differansiye ET ile uyumludurlar. Rezeksiyonun mümkün olduğu durumlarda ilk tedavi seçeneği cerrahidir. Sitotoksik kemoterapi ve kraniyospinal radyoterapi de oldukça sık kullanılan tedavi modaliteleridir. Tedavi yanıtı hastanın yaşı, tümörün klinikopatolojik ve moleküler özelliklerine bağlıdır. Yüksek risk faktörleri içeren hastaların beş yıllık ortalama yaşam şansı %70'in altındadır. MB'lar genelde sporadik olup nadiren de Gorlin Sendromu, Turcot Sendromu, Fankoni anemisi, Rubenstein-Taybi Sendromu, Coffin-Siris Sendromu, Li-Fraumeni Sendromu gibi hereditör sendromlar ile ilişkilidir¹⁵². Bazı genlerin patojenik varyantları MB genetik risk faktörü olarak tanımlanmış olsa da bu varyantların MB'a eğilim yarattığına dair ilişkiyi ortaya koyan yeterli veri bulunmamaktadır. Çocuklarda MB oluşumunda rol alan bazı epigenetik değişiklikler de tanımlanmıştır. Güncel çalışmalar kromatin modifikasyonundan sorumlu genlerin mutasyonunun, tümör oluşumunda kritik rol oynadığını göstermiştir.

2016 yılında DSÖ, transkriptom analizi, metilom ve mikroRNA profilleri, tanı yaşı ve prognoz gibi özellikleri göz önünde bulundurarak, 4 farklı moleküler MB alt grubu tanımlamıştır; WNT-MB, SHH-MB, grup-3 MB ve grup-4 MB³⁴. 2021 de ise bu sınıflandırmanın alt grupları oluşturularak moleküler özellikleri ayrıntılandırılmıştır.

WNT alt grubu tüm MB hastalarının %10'unu oluşturur ve diğer gruplara kıyasla daha iyi prognoz ile ilişkilidir⁸⁰. Bu alt grupta yer alan hastalar WNT sinyal yolağına ait moleküler değişiklikler içerir ve

beta katenin stabilizasyonu ve birikimine neden olan beta katenin 1 (*CTNNB1*) mutasyonu içerir¹⁵³.

Nukleustaki β -katenin kök hücre, proliferasyon ve farklılaşmadaki görevli bir çok genin transkripsiyonel bir ko-aktivatörüdür. Ayrıca WNT sinyal yolağındaki değişiklik ile *CTNNB1*'de herhangi bir somatik mutasyona sahip olan hastaların adenomatöz polipoliz koli (APK) eğilimi olduğu da bilinmektedir. APK protein kompleksinin ubiquitin bağımlı β -katenin parçalanmasını kolaylaştırdığı göz önünde bulundurulduğunda, APK'nin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlarının, MB hastalarında WNT sinyal yolağını aktive ettiği bilinmektedir. Çalışmalar β -katenin LC3 ilişkili bölgesinin otofagozomlar aracılığı ile parçalanmayı sağladığını göstermiştir¹⁵⁴. Otofaji aracılı β -katenin parçalanması, WNT yanıtı gen ekspresyonunda azalmaya yol açmaktadır. β -katenin, otofaji yolağının hedef molekülü olmasının yanı sıra, düzenleyicisi olarak da çalışmaktadır. β -katenin nukleustaki birikimi otofaji yolağında kritik bir adaptör protein olan, P62'nin transkripsiyonunu baskılar⁴¹. Tüm bu çalışmalar; β -katenin birikimi sonucu aktive olan WNT yolağının otofajiyi baskılanabileceğine işaret etmektedir. WNT-MB alt grubunda otofaji yolağı aktivasyonu hakkında yeteri kadar çalışma olmasa da, WNT/ β -katenin yolağının kanser ilişkili orofaji genlerinin fonksiyonlarını baskılayarak, otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir.

SHH-MB alt grubundaki hastalar SHH yolağına ait delesyon, kopya sayısı değişiklikleri mutasyonları içerir. Protein yamalı homolog 1 (Protein patched homolog 1 - PTCH1), fonksiyon kaybı mutasyonları veya delesyonları, SHH alt grubu hastaların çoğunda tanımlanmıştır. SHH sinyal yolağına ait diğer moleküler değişiklikler; *SUFU*, *SMO*, *GLI1*, *GLI2* ve *MYCN*'dir. Bu mutasyonlar SHH sinyal yolağının devamlı aktivasyonuna neden olur ve bu süreç hücre büyümesi ve çoğalmasından sorumlu genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır^{80,155}. Ayrıca P53, mTOR ve PI3-K yollarına ait moleküler değişiklikler SHH alt grubunda sıkça gözlenmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda otofajinin SHH alt grubunda anti-tümör mekanizması olarak yer alabileceğini gösterecek şekilde mTOR ve PI3-K

yolaklarının kimyasal modölatörler ile inhibisyonu MB hücrelerinin SHH inhibitörlerine duyarlılığını arttırdığını göstermiştir¹⁵⁶. Kanonik otofajinin (makrootofaji) yanısıra mitofaji modülasyonu da MB SHH alt grubunda oldukça umut vaat edici anlamlı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. MB hücrelerinde SHH aktivasyonu sonucu serebellar granüler nöron prekürsörlerinde zayıflatılmış mitokondrial biogenezis oluşmaktadır. SHH tedavisi mitokondrial fragmentasyon ile sonuçlanacak olan mitofusin 1 ve 2 (MFN1 ve MFN2) seviyesinde azalmaya neden olur. Mitofusinlerin ektopik ekspresyonu mitokondrilerin biyogenezini ve fragmentasyonunu düzenler. Bu da, SHH uygulanmış granüler nöron prekürsörlerinde proliferasyon belirteçlerini azaltır¹⁵⁷.

Grup-3 tümörler tüm MB vakalarının %20-25'ni oluşturur, kötü prognoz, sık metastaz ile karakterize ve büyük hücreli/anaplastik morfolojidedirler¹⁵⁸. *MYC* gen amplifikasyonu grup 3 MB'da sıkça saptanır. Bu grupta somatik mutasyonlar daha az olarak görülse de, *MYCN* amplifikasyonu ve orthodenticle homeobox 2 (*OTX2*) mutasyonları saptanmıştır⁸⁰. *OTX2* beyin, göz ve pineal bezin gelişiminin regülasyonundan sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. MB'da *OTX2*, hücre siklusunu kontrol eden genler üzerinden, diferansiyasyon ve kök hücrenin sürdürülebilirliğinden sorumludur¹⁵⁹. Grup 3 MB da kromozomal anöploidi de oldukça sık gözlenir. Olguların %4-50'sinde q duplikasyonu, kromozom 17'de p kaybı ve kromozom 1, 7, 8, 10 ve 16 modifikasyonları bulunmaktadır¹⁵⁵.

Grup 4 olgular tüm MB'ların % 34-40 kadarını oluştur ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Grup 3'e benzer şekilde, Grup 4'te de somatik mutasyonlar sık görülmez. Grup 4 MB üzerinde yapılan çalışmalar, PR bölgesi çinko parmak protein-6 (*PRDM6*) yüksek seviyedeki sentezinin, sinüklein alfa etkileşimli proteinin (*SNCAIP*) duplikasyonunu takiben ortaya çıktığını göstermiştir. *GFI1* veya *GFI1B* yüksek düzeyde sentezi de grup 4 MB'da tespit edilmiştir. Grup 3 gibi, bu grupta da *MYCN* and *OTX2* amplifikasyonu görülmektedir^{155,160}.

Otofajinin medulloblastomdaki yerini direkt olarak gösteren az çalışma olsa da yapılanlarda tümörün büyüme, invazyon ve tedavi direnci aşamalarında kritik rol oynadığı ortaya konmuştur. Güncel çalışmalardan bir tanesi, shRNA aracılı *ATG5* aktivitesinde azalmanın tümör büyümesini etkilemese de, migrasyon ve invazyon potansiyelini belirgin olarak azalttığını göstermiştir¹⁴⁵. Otofajinin genetik ve kimyasal ajanlar ile inhibisyonu, MB hücrelerinin farklılaşmasını artırır. Ayrıca otofaji aktivasyonunda azalma, MB hücrelerini kemoterapi ajanlarına daha hassas hale getirir. *In vivo* modellerde de otofaji modülasyonunun tümör kitlesini küçülttüğü ve infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir¹⁴⁶. Tüm bunlar otofaji inhibisyonunun MB proliferasyonu ve invazyonunu azalttığı yönünde birbirini doğrulayan çalışmalar olmuştur¹⁵. Özellikle kötü prognoz ile karakterize olan Grup-3'te otofaji proteinlerinin yüksek seviyede tespit edilmesi, otofaji yolağını potansiyel bir hedef olarak ortaya koymuştur¹⁶¹.

Otofaji ilişkili mikroRNA'ların incelendiği bir çalışmada otofaji regülasyonu için kritik olan miR-30a'nın tüm MB alt gruplarında anlamlı seviyede az olduğu gösterilmiştir. MiR30-a, *Beclin-1(BECN1)*'i hedef alarak otofajiyi inhibie eder. Ektopik miR-30a ekspresyonunun, *in vitro* koşullarda kritik otofaji genlerinin seviyesini azalttığı ve MB hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁴⁷. Oluşturulan hayvan modellerinde ise, miR-30a ekspresyonunun tümör büyümesini engellediği saptanmıştır¹⁴⁶. Tüm bu veriler otofajinin MB hücrelerinde tümör oluşumunu tetiklediği fikrini destekleyici niteliktedir. Otofaji yolağının MB'da kemoterapi direncindeki rolü de incelenmiştir. Otofaji inhibisyonunun anlamlı derecede sisplatin ve lomustin tedavilerine duyarlılığı artırdığı ortaya konmuştur.

MB'da otofaji rolünü inceleyen sınırlı sayıda çalışma olsa da, veriler otofajinin potansiyel tedavi seçeneği olması konusunda destekleyicidir. Otofajinin MB alt gruplarında, farklı farklı regüle olduğu düşünüldüğünde, yaklaşım moleküler özelliklere özgü olmalıdır. Otofaji yolağı üzerinden etkileri olan

ilaçlarla klinik çalışmalar olsa da, otofaji modülasyonunun anti-tümör etkisinin moleküler mekanizması hala bilinmemektedir ve çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7.A.b. Atipik Teratoid/Rabdoid Tümör

Atipik Teratoid/Rabdoid Tümör (AT/RT) oldukça ender, hızla progrese olan agresif seyirli embriyonal bir tümördür. Sıklıkla 0-4 yaş arasında tanı alırlar. Ortalama yaşam süresi 16.9 aydır¹⁶⁸. AT/RT vakalarının %61'inde tümör posterior fossa yerleşimli iken, %20'sinde serebral hemisfer yerleşimli, kalan vakalar ise 3. ventrikül, pineal bölge ve spinal kord yerleşimlidir. Hastaların çok az bir kısmında ise multifokal prezentasyon görülür¹⁶⁹. AT/RT sıklığı 0-19 yaş arası çocuklarda 100.000 çocukta 0.09 olarak bildirilirken, 0-4 yaş arasında 100.000 çocukta 0.33'tür¹⁷⁰. Prototip genetik lezyon kromozom 22 ile ilişkilendirilmiştir ve tanısız değer taşımaktadır. Özellikle monozomi 22 ve 22q11 lokus delesyonları karakteristik moleküler değişikliklerdir¹⁶⁹. Bu lokus daha sonra hücre büyümesini ve aktin iskeletini organize eden, ATP bağımlı kromatin modellemesinden sorumlu kompleks olan SWI/SNF'ı kodlayan hSNF5/INI1/SMARCB4 geni ile ilişkilendirilmiştir¹⁷¹. Tüm bu bilgilerin ışığında SMARCB4 mutasyonu AT/RT için karakteristik olarak tanımlanmıştır¹⁷². Epigenetik ve genetik çalışmalar ışığında üç farklı AT/RT sınıfı tanımlanmıştır; TYR, SHH ve MYC¹⁷³.

AT/RT-TYR tümörleri, siliyogenezisde rol alan çeşitli melanozomal belirteçler ile ilişkilendirilmiştir. AT/RT-SHH tümörleri, SHH sinyal yolağı aktivasyonu ile karakterize iken, AT/RT-MYC alt grubunda, artmış MYC seviyesi saptanmıştır. Spesifikleştirilmiş alt gruplar belirli lokalizasyonlara eğilim göstermektedir. Örneğin; AT/RT-TYR tümörleri infratentoriyal kompartmanda sık olarak görülürken, AT/RT-MYC grubu supratentoriyal alanda ortaya çıkmaktadır. AT/RT-SHH alt grubu ise hem infratentoriyal hem supratentoriyal alanda gözükmetedir¹⁷³ Farklı anatomik bölgelere

eğilim ve heterojen histolojik özellikler, bu alt grupların farklı prekürsörlerden köken aldığını öngörmektedir¹⁷⁴.

AT/RT'yi otofaji perspektifinden değerlendiren yeterli sayıda araştırma bulunmamaktadır. AT/RT modelinde otofaji ilişkili genlerin seviyesi ve altında yatan mekanizma bilinmemektedir. AT/RT hücre hatları BT-12 ve BT-16'nın kullanıldığı bir çalışmada, beslenme faktörlerinin yokluğunda ve rapamisin tedavisi altında otofaji belirteçlerinin seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada kemoterapi ilaçlarının verilmesinin hücre hatlarında otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Ancak bu sonuçlar ile planlanan siRNA aracılı ATG5 ve ATG12 seviyesinin azaltılması kemoterapi yanıtına dair anlamlı bir fark yaratmamıştır¹⁴⁵. Aynı ekip proteozom inhibitörlerinin AT/RT tümör mekanizmasını rolünü incelemiştir. Ubikutin-proteozom sistemi ve otofaji yolağının birbirini tamamlayıcı sistemler olduğunu göstermişlerdir. Her iki mekanizmadan birinde meydana gelen olası hasarın diğer mekanizmanın aktivasyonuna yol açtığını ve stres koşulunda bu iki mekanizmanın birbiri ile ilişki içerisinde olarak çalıştığını göstermişlerdir¹⁰⁵. Aynı çalışmada proteozom inhibitörlerinin, AT/RT hücrelerinde sitotoksik özelliği olduğu gösterilmiştir. Proteozom ve otofaji mekanizmalarının eş zamanlı inhibisyonunun, AT/RT modelinde kemoterapi ile kombine edildiğinde, sinerjistik etki oluşması teorik olarak beklenmesine rağmen deney sonuçlarında beklenmedik sonuçlar elde edilmiştir¹⁷⁵. AT/RT nihai tedavisini öngörebilecek bir hipotez oluşturmak güncel veriler ile oldukça zor olsa da, araştırmaların sonuçları ışığında, otofaji yolağı modülasyonunun, AT/RT modellerinde kemoterapi direncini kırabileceği öngörülmektedir.

7.B. Pediatrik Gliomlar, Glionöronal ve Nöronal Tümörler

7.B.a. Ependimom

Ependimom üçüncü en sık pediatrik beyin tümörüdür, MSS, serebral ventriküller ve spinal korda ait ependimal hücrelerden köken alır. Ependimomların %90'ı intrakraniyaldir. Bunların 2/3'ü posterior fossa'da, kalan kısım ise supratentoriyal alanda yer alır¹⁶². Yaşam süresi tedavi modalitesine, tümör alt tipine ve tanı yaşına bağlı olmakla birlikte, 0-14 yaş arası çocuklarda beş yıllık sağkalım ortalama %72'dir¹⁴⁶.

Ependimom alt tipleri spesifik mutasyonlar ile tanımlanmıştır. *Nuklear faktör kappa B (NF-kB)* yolağına ait *v-rel avian retikuloendoteliyozis viral onkogen homolog A (RELA)* gen ve C11orf95 gen füzyonu supratentoriyal ependimomların çoğunda tanımlanırken, NF2 gen mutasyonu ve spesifik kromozomal anomaliler daha çok spinal ependimomlarda tanımlanmıştır^{162,163}. Pajtler ve grubu ependimal tümörleri, spinal kord, posterior fossa ve supratentorial kompartmanda 3'er tane olmak üzere 9 moleküler alt grup oluşturacak şekilde DNA metilasyon profiline göre gruplandırmıştır ve moleküler klasifikasyonun prognoz değerlendirmesindeki üstünlüğünü ortaya koymuştur. Pediatrik hastalarda en sık görülen alt gruplar kötü prognoz ile ilişkili olan PF-EPN-A ve ST-EPN-RELA'dır¹⁶⁴.

MSS tümörlerini anatomik, histopatolojik ve moleküler özelliklerini kombine ederek sınıflandıran 2021 DSÖ Sınıflaması, ependimal tümörleri moleküler alt gruplara ayırıp, ayrıntılı analiz sağlayarak, hedef tedavi modalitelerinin önünü açmıştır⁴².

Ependimom ve otofaji yolağı ilişkisi literatürde incelenmemiştir. Sadece bir çalışmada ependimom örneklerinde kontrol dokularına kıyasla otofaji genlerinden *ATG3*, *ATG5*, *ATG12*, ve *BECN1* seviyesinin azaldığı gösterilmiştir¹⁶⁵. Bu çalışmayı yürüten grup aynı zamanda ependimomda, seviyesi artan nükleer por ve nükleer basket protein kompleksinin mTOR yolağı üzerinden otofajiyi regüle ettiğini göstermiştir¹⁶⁶. Transloke başlangıç bölgesi (*TPR*) eksikliği ile indüklenen otofaji, özellikle nükleofaji, LC3 proteinin nukleusa translokasyonuna neden olur¹⁶⁷. Ayrıca, önceki çalışmalar

azalmış *TPR* seviyesinin, artmış otofaji ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Aslında *TPR*, stres uyaranlarına yanıt olarak, mTORC1'i aktive ettiği bilinen sıcaklık şok transkripsiyon faktörü (*HSF1*) mRNA'nın dışa aktarılmasına izin veren bir kompleks üzerinde bulunur¹⁶⁸. Bununla paralel olarak, fare modellerinde rapamisin ile ortaya çıkarılan otofaji indüksiyonunun, *TPR* ve *HSF1* seviyelerini azalttığı, bunun tümör boyutunu küçülttüğü ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir¹⁶⁹. Bu sonuçlar ependimomda otofaji indükleyici ajanların klinik prognozu iyileştirebileceği yönünde umut vadetmektedir, ancak bu konuda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7.B.b. Pediatrik Diffüz Glial Tümörler

Son güncellemeye kadar erişkinle aynı başlıklar altında değerlendirilen pediatrik tip diffüz gliomalar, artık tamamen ayrı bir grup olarak ayrılmış, kendine özgü moleküler değişiklikler ile tanımlanmaktadır.

Şimdiye kadar otofaji yolağı, gliom ilişkisini inceleyen çalışmalar erişkin odaklı olup çocuk gliom modellerinde otofajinin etkisini inceleyen oldukça az çalışma bulunmaktadır. Erişkin yüksek dereceli gliomalarda AKT ve mTOR yolağının yüksek aktivitesi tespit edilmiştir¹⁷⁰. Ayrıca bazı otofaji genlerinin seviyesi, sağlıklı beyin dokusu ile karşılaştırıldığında erişkin yüksek dereceli gliomalarda düşük saptanmıştır. İncelemeler ilginç olarak, LC3B ve BECN1 seviyelerinin glioma derecesi ile ters korelasyon gösterdiğini, tümörün derecesinin artması ile moleküllerin mRNA ve protein seviyelerinin azaldığını göstermiştir¹⁷¹. Bu sonuçlar ile *LC3B* and *BECN1* yüksek ekspresyonunun erişkin glioma hastalarında iyi prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir¹⁷¹. Bu genlerin glioma profilasyonu ve ilaç direnci rolleri düşünüldüğünde, otofaji gliomada tedavi hedefi olabilecek kritik moleküler yollardan biridir. miRNA ilişkili otofaji regülasyonunun, erişkin gliomadaki rolü de çalışmalar ile gösterilmiştir. Örneğin; miRNA miR-244-3p yüksek ekspresyonu birçok otofaji geninin kritik

transkripsiyonel baskılanması ile anlamlı düzeyde korelasyon göstermektedir ve glioma hücrelerinin oluşumunu tetikleyerek kötü prognoz ile ilişkilidir¹⁷². Hipoksik koşullarda ise *ATG5* and *FIP200* inhibisyonu yapan miRNA miR-244-3p seviyesinin glioblastomada belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir. Hasta örnekleri incelendiğinde bu ilişkiyi doğrulayacak şekilde miRNA miR-244-3p ve *ATG5* and *FIP200* seviyelerlerinin ters korelasyonu ortaya çıkarılmıştır. Lentivirüs ile oluşturulan fare modellerinde miRNA miR-244-3p yüksek ekspresyonunun, tümör volümünü küçülttüğü gösterilmiş ve bu da otofaji ilişkili miRNA'ların gliomalardaki yerine bir kez daha dikkat çekmiştir. Buna ek olarak miR-519a'nın erişkin glioma hücrelerinin temozolomide olan hassasiyetini, STAT3 yolağı üzerinden artırdığı gösterilmiştir¹⁷³. Tüm bunların tersini, otofaji yolağının glioma tümör modellerinde tetikleyici olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bahsedilen çalışmaların sonuçlarına tezat oluşturacak şekilde yüksek dereceli glioma hastalarının parafin kesitlerinde, düşük dereceli hastalara göre LC3 and BECN1 seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda *LC3* ve *BECN1* seviyesinin kötü prognoz ve kısa yaşam süresi ile orantılı olduğu sonucu ortaya çıkarılmıştır¹⁷¹.

Otofaji yolağının gliomadaki indükleyici etkisi, oluşturulan 'fonksiyon kaybı' deney modelleri ile de gösterilmiştir. Örneğin; glioma doku örneklerinde seviyesinin arttığı gösterilen otofaji yolağı ilişkili *ATG4C* molekülünün gen düzeyinde ekspresyonu azaltıldığında, glioma hücrelerinde apoptoz ve proliferasyonun engellendiği gösterilmiştir. Ayrıca, *ATG4C* sentezinin gen düzeyinde azaltıldığı glioma hücrelerinin temozolomid duyarlılığının arttığı da gösterilmiştir¹⁷⁴. Başka bir çalışmada shRNA tekniği ile otofaji yolağının inhibisyonu oluşturulmuş ve KRAS ilişkili onkojenik glial hücrelerin proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir¹⁷⁴. Bu bağlamda KRAS ilişkili gliomada otofaji yolağının büyümenin durdurulduğu koşullar altında yaşlanmanın önüne geçen basamak olduğu gösterilmiştir¹⁷⁵. Bu sonuçlarla korelasyon olarak, otofaji yolağının tümör indükleyici etkisinin hipoksik koşullarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hipoksi ilişkili artan otofaji aktivasyonunun, glioma hücre

proliferasyonunu indüklediği ve kimyasal ajanlar ile hipoksi ilişkili otofaji yolağı baskılandığında, glioma hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir. İlginç olarak hipoksi ilişkili artan serin/treonin kinaz P21 (RAC1) seviyesinin, kinaz 1 (*PAK1*) aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Otofaji yolağının anahtar moleküllerinden biri olan ATG5, PAK1 ile doğrudan fosforile olur ve fosforilasyon sonrası ubiquitinasyonu ve ona bağlı olarak degradasyonu önler. Böylece genetik ve kimyasal ajanlar ile *PAK1* seviyesinin baskılanması, glioma hücrelerinde otofaji aktivasyonunu baskılar ve bu durum *in vitro* ve *in vivo* koşullarda glioma tümör boyutunda azalma sağlar¹⁷⁶.

Tüm bu sonuçlar, gliomada otofaji yolağının ikili rolünün içinde bulunduğu koşullara göre yön aldığını, modülasyonu ile hem tümör baskılayıcı hem de indükleyici modellerin oluşturulabileceğini, tedavi duyarlılığının artırılabilirliğini göstermektedir. Otofaji yolağının farklı noktalardan düzenlenmesi erişkin glioma vakalarında oldukça umut vadeci sonuçlar içermektedir.

7.B.b-1. Pediatrik Tip Diffüz Düşük Dereceli Gliomalar, İyi Sınırlı Astrositik Gliomalar, Glionöronal ve Nöronal Tümörler

Düşük dereceli gliomalar çocukluk çağı MSS tümörlerinin %20'sini oluşturur. Yeni sınıflandırma ile pediatrik tip diffüz düşük dereceli gliomalar (PDDG); MYB veya MYBL1 moleküler değişikliğinin eşlik ettiği diffüz astrositoma, anjiosentrik glioma, genç yaş grubuna ait polimorfik düşük dereceli nöroepitelyal tümörler, MAPK yolağına ait moleküler değişikliklerin eşlik ettiği diffüz pediatrik düşük dereceli gliomalar olarak alt tiplere ayrılır. Bu alt tiplerin morfolojilerindeki benzerlik, klinikteki ayırıcı tanı konusunu oldukça zorlaştırmaktadır.

Çocuklarda beş yıllık sağkalım oranı genel olarak %95'tir. Cerrahi yaklaşım tedavide ilk seçenek olup, sağkalımı belirgin olarak uzatır. Opere edilemeyen olgularda, yaşam kalitesi oldukça düşüktür ve çocuklarda gelişim geriliğine neden olan ciddi morbidite durumları gözlenir.

Moleküler açıdan erişkinden farklı olarak PDDG, *IDH* mutasyonu oldukça ender saptanır. Genetik predispozisyon oluşturan mutasyonlar incelendiğinde, nörofibromatozis 1 (*NFI*) mutasyonunun PDDG riskini belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir¹⁷⁷. Tümör baskılayıcı rolü olan *NFI* geninin inaktivasyonu, protein ekspresyon ve fonksiyon kaybına neden olur. PDDG'ların %14'ünde *NFI* mutasyonu bulunmaktadır. Bu mutasyonlar genelde optik yolağa ait olsa da %20'si diğer lokalizasyonlarda olabilmektedir. Optik yolak dışında saptanan mutasyonların ise ilginç olarak, optik yolaktakilere kıyasla daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak da *NFI* mutasyonunun indüklediği ve optik yolağın dışında ortaya çıkan PDDG'lar kötü prognozları dolayısı ile daha iyi ve özgün tedavi metodlarına ihtiyaç duymaktadır⁴³.

PDDG'da primer mutasyondan bağımsız olarak en sık rastlanan moleküler değişiklikler MAPK yolağına aittir. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu *KIAA1549:BRAF* füzyonları olarak karakterizedir⁵⁹. *BRAF* geninin *KIAA1549* ile füzyonu BRAF proteininin devamlı olarak aktivasyonuna neden olur. Aktive BRAF proteini ise hücre siklusundaki G2/M geçişini regüle eden MAPK yolağını indükler¹⁷⁸. *BRAF* gen füzyonuna ek olarak bazı pilositik astrositomalarda BRAF- V600E mutasyonu da tespit edilmiştir¹⁷⁹. BRAF-V600E mutasyonu sonucu valin, glutamik asit ile yer değiştirir. Bunun sonucunda proteinin fosfomimetik mutantının oluştuğu ve MAPK yolağının devamlı olarak aktive olduğu gösterilmiştir⁴³. *KIAA1549:BRAF* füzyonu spesifik olarak pilositik astrositomalarda tespit edilse de, V600E mutasyonu bir çok alt tipte gözlenebilmektedir. *KIAA1549* ek olarak başka BRAF füzyon partnerleri de tüm PDDG'ların %17'sinde görülebilmektedir¹⁸⁰.

Yapılan çalışmalar BRAF ilişkili gliomaların, kemoterapi sonrası davranış şekillerinin otofaji ile ilişkili olduğunu göstermektedir¹⁴⁵. BRAF-V600E mutasyonuna sahip pediatrik gliomalarda kemoterapiyi takiben artmış miktarda hücre ölümü görülmektedir. Hidroksiklorokin kullanarak otofaji yolağının inhibe edildiği hücre hatlarında, vemurafenib tedavisine hassasiyetin arttığı gösterilmiştir¹⁸¹.

BRAF-V600E mutasyonu taşıyan beyin sapı ganglioglioması olan bir hasta, vemurafenib ve vinblastine tedavilerini takiben bir yıl boyunca asemptomatik izlenmiş, bir yıl sonra radyolojik görüntülemesinde rekürrens tespit edilmesi üzerine vemurafenib ile birlikte hidroksiklorokin tedavileri almış ve 6 hafta içerisinde semptomlarında belirgin gerileme saptanmıştır. Hastada klinik iyileşme 6 ay boyunca devam etmiş olup bu sonuç otofaji yolağının modülasyonunun çocukluk çağına ait düşük derceli gliomalarda tedavi yanıtı üzerine olan etkisine dikkat çekmiş ve bu konuda araştırmaların yapılmasının gerekliliğini göstermiştir¹³.

KIAA1549 yanısıra *CLCN6*, *GIT2*, *GNAI1*, *FAM131B*, *FXR1*, *MKRNI*, *RNF130* ve *SRGAP* gibi çeşitli birçok genin de PDDG’da BRAF ile füzyon oluşturduğu saptanmıştır⁴³. Benzer şekilde RAS/MAPK genlerindeki füzyonlar da RAS/MAPK yolağında aktivasyona neden olmaktadır. PDDG’lerin %95’indeki mutasyonlar direkt olarak RAS/MAPK yolağı ile ilişkilidir. Geriye kalan küçük grupta ise *IDH1* mutasyonu ve *MYB*, *MYBL1* genetik değişiklikleri bulunmaktadır¹⁸².

MAPK ekstraselüler kompartmandan gelen sinyalleri hücre içine aktararak fosforilasyon kaskadının regüle edilmesini sağlar. MAPK yolağı hücre için kritik süreçleri regüle eder ve proliferasyon, diferensiasyon ve stres yanıtında etkin olarak görev alır. Otofaji önemli bir hücre stres yanıtı mekanizması olup, MAPK yolağı ile oldukça sıkı bir şekilde bağlantılıdır. MAPK yolağı temel olarak ERK, p38 ve c-Jun alt gruplarından oluşur. MAPK yolağının aktivasyonu tüm kanserlerin %85’inde tespit edilmektedir. MAPK yolağı ve otofaji arasındaki mekanizma tam olarak bilinmese de, MAPK aktive birçok kanserde otofaji incelenmiştir. Glioma da dahil olmak üzere genel olarak otofaji inhibitörlerinin MAPK inhibitörleri ile kombine edildiği çalışmalarda oldukça umut vadeci, pozitif sonuçlar elde edilmiştir¹⁸³. Erişkin gliomalarda MAPK yolağının artmış aktivitesinin otofaji genlerinin sessizleştirilmesi ile azaltılabildiği gösterilmiştir¹⁴. Ayrıca otofaji yolağının inhibe edildiği MAPK aktive glioma hücrelerinde, invazyon ve göç özelliklerinin baskılanabildiği gösterilmiştir. Gliomadaki

MAPK aktivasyonuna ek olarak, otofajinin indüklediği hücre ölümü ve apoptozisin görüldüğü hücrelerde, MAPK yolağının hiperaktivasyonu görülür. Hücre siklusu, sirkadiyen ritim ve DNA tamirinde görevli serin/treonin kinaz olan kazein kinaz-2 (CK-2) seviyesi siRNA aracılığı ile azaltıldığında, hücrede fosforile mTOR seviyesinin azaldığı ve bunların sonucu olarak da otofaji yolağının aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir. Erişkin glioma hücrelerinde CK-2 kaybı, buna bağlı ortaya çıkmış azalmış fosforilasyon ve MAPK aktivitesi, hücreleri otofaji ilişkili hücre ölümü konusunda olası bir hedef olarak ortaya koymuştur¹⁸⁴. Yine benzer olarak anti-kanser özelliği olan çeşitli kimyasalların glioma hücrelerinde mTOR yolağını baskılayarak otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Oluşturulan bu modellerde, MAPK hiperaktivasyonunun glioma hücrelerinde, otofaji mekanizmasını koruyucu bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Elde edilen tüm bu umut vadecici sonuçlar, otofaji ve MAPK yolları arasındaki potansiyel ilişkiyi hedef göstermektedir, ancak pediatrik gliomaya özgü hedef tedavileri ortaya çıkarabilecek özgün çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

PDDG’da günümüzde halen uygun tedavi yaklaşımı öncelikle cerrahi ve vinblastin, vinkristin gibi vinka alkaloidlerini içeren kemoterapi rejimleridir. Uzun dönemde bu tedavi seçenekleri çocuk hastalarda birçok yan etkiye sahiptir. Ayrıca son çalışmalar dabrafenib ve sorafenib gibi BRAF-V600E mutasyonuna spesifik inhibitörlerin de tümör progresyonunu durdurabildiğini göstermiştir^{85,86,87}. Son yıllarda klinisyenler ve araştırmacılar PDDG’deki tedavi seçeneklerini değerlendirmede sadece sağkalımın değil, fonksiyonel durumların da oldukça değerli olduğu konusunda hemfikir olmuştur. PDDG’de mTOR inhibitörlerinin fonksiyonelliğe ve yaşam süresine olan etkisini araştıran klinik çalışmalar PDDG’lerin moleküller sınıflandırmasının, efektif tedavi tercihine olan etkisini de göstermektedir.

7.B.b-2. Pediatrik Tip Diffüz Yüksek Dereceli Gliomalar

Yüksek derece glial tümörler (YDGT), DSÖ sınıflandırmasında derece 3 anaplastik astrosioma ve derece 4 glioblastoma multiforme sınıflarına karşılık gelir. Erişkin vakalarda YDGT'ye sıkça rastlansa da, tüm çocuk MSS tümörlerinin %10'unu oluşturur¹⁸⁵. Erişkinlerde YDGT düşük derecelilerin transformasyonundan ortaya çıkabilir. Çocuk hastalarda ise tümörün tetikleyici faktörü bilinmemektedir. Şimdiye kadar etiyolojide kanıtlanmış tek risk faktörü, lösemi hastalarının tedavisinde kullanılan radyoterapidir. Tümör lokalizasyonu cerrahi müdahaleye uygun ve hasta için mortal bir yaklaşım olmayacaksa pediatrik YDGT'nin birinci basamak tedavisi total rezeksiyondur. Cerrahi yaklaşımın yanında fokal radyoterapi ve kemoterapi tümör progresyonunu engelleyebilen diğer alternatiflerdir. Protokoller erişkin hastalara yaklaşıma benzer şekilde oluşturulur, ancak erişkinin aksine tedavi yanıtı oldukça azdır. Vakaların ortalama yaşam süresi 11 ay olup, %30 hasta 5 yıldan kısa süre içerisinde kaybedilir^{78,186}. Pediatrik YDGT'nin genetik profili, DNA kopya sayısı, tek nükleotid varyasyonları ve bazı genlerin ekspresyonu açısından sağlıklı çocuklara göre farklılık gösterebilir. Ayrıca *TP53* ve *NF1* genlerindeki germ hattı mutasyonları çocuklarda YDGT oluşma riskini artırmaktadır, ancak hastalarda gelişen diğer mutasyonların sporadik vakalardan farklı olmadığı bilinmektedir¹⁸⁷. 2012 yılında pediatrik YDGT'ye özgün somatik histon mutasyonları tanımlanmış olup, bu tanımlama ile erişkinlerden tamamen ayrılmasını sağlayan, spesifik moleküler özellikleri keşfedilmiştir. Çalışmalar H3.1 ve H3.3 histonlarındaki mutasyonların özel olarak pediatrik glioma ile ilişkili olduğunu göstermiştir^{188,189}. Histonlar DNA'nın nükleozomal lif içerisinde paketlenmesinden sorumludur ve aktif olarak bölünen hücrelerde DNA kanonikal histonlar ile çevrilidir. Kritik pozisyonlardaki amino asit farklılıkları, histon varyantlarının fonksiyonlarının kanonikal histonlardan ayrışmasını sağlar. Post-traslasyonel modifikasyonlar, histon fonksiyonunun belirlenmesinde oldukça önemlidir. Modifikasyonlar özellikle, histon kuyruklarında, histonların kromozomlardan çıkan uçlarında, gelişim, kök hücre ve differansiasyon basamaklarının kontrol genlerinde olur. Histon modifikasyonlarının

onkogenezis ve çeşitli kanser çeşitlerinde metastaz basamaklarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Histon varyantlarındaki mutasyonlar kuyruk bölgesinde post-translasyonel modifikasyonlara neden olarak tümorogeneze neden olur. Pediatrik beyin tümörlerinde H3 varyantlarındaki mutasyonlar, mutasyon tipine bağlı olarak, kötü prognoz ve kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmiştir. H3.3 varyantı 2 paralog gen olan *H3F3A* ve *H3F3B*'den eksprese olur. Histon varyantı H3.3, kanonikal histonlardan H3.1 ve H3.2 sırası ile 4 ve 5 amino asit ile ayrılır. H3.1 ekspresyonu replikasyona bağlı olup, hücre siklusunun S fazında artarken, H3.3 tüm siklus boyunca aktif olarak eksprese olur^{190,191}. H3.3 aktif gen lokusunda birikimine ek olarak, peri-sentromer ve telomer bölgesinde de bulunur. Yeni nesil dizileme datası, H3.3 nokta mutasyonları ile çocukluk ve adolesan çağına ait ender kanserler arasında belirgin bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bu mutasyonlar histon kuyruklarında, post-translasyonel modifikasyonda bozulmaya yol açarak, kromatinin yeniden modellenmesine ve gen ekspresyonunun değişmesine yol açar.

Özellikle lizinin metiyonine dönmesi ile meydana gelen 27. pozisyonundaki H3.1 ve H3.3 histon varyantlarındaki mutasyonlar (K27M) ilk olarak DIPG'da, çocukluk ve adolesan çağı diffüz gliomlarında tanımlanmıştır. H3.1 K27M mutasyonu özellikle pons bölgesine lokalize tümörlerde saptanırken, H3.3 K27M mutasyonu orta hatta yer alan tüm pediatrik tümörlerde saptanabilir¹⁹². Bu pediatrik gliomalara özgün mutasyonlar tümörün lokalizasyonu, hastanın yaşı ve hastalığın prognozu ile anlamlı oranda ilişkilidir. Mutasyonlar ve tedavi direnci, kötü prognoz ve kısa yaşam süresi arasındaki güçlü bağlantının kanıtlanması, 2021 DSÖ sınıflandırmasına da yön vererek diffüz orta hat glioma (K27 mutant, EGFR mutant) grubunun tanımlanmasını sağlamıştır¹⁹³. Pediatrik yüksek dereceli gliomalardaki K27 bölge mutasyonları, dramatik epigeneik ve transkripsiyonel düzeyde yeniden modellenmelere neden olmaktadır. K27M mutasyonuna sahip histonların, substratları bağlamak ve polycomb baskılayıcı kompleks 2 (PBK2)'deki metiltransferaz deriveleri için yarıştığı ve onların katalitik etkisini baskıladığı

gösterilmiştir¹⁹⁴. PBK2, K27 pozisyonundaki H3'ün ikili ve üçlü metilasyonunu regüle eder ve epigenetik gen baskılaması ile X kromozomu inaktivasyonundan sorumludur. Bu ilişki hücre siklusu, proliferasyonu ve diferensiasyonu gibi birçok basamağın düzenlenmesinde rol alır. Pediatrik yüksek derece gliomalarda, K27 mutasyonu ve buna bağlı olarak oluşan histon kuyruk metilasyonunda azalma gliomageneziste kritik rol oynar¹⁹⁴.

H3.3 34. pozisyonundaki mutasyonlar glisinin yerine arjinin veya valin gelmesine neden olur (G34R/V) ve pediatrik diffüz gliomaların %15'inde tespit edilir¹⁹⁵. G34R/V mutasyonu genelde daha ileri yaş çocuk hastalarda, serebral hemisfere lokalize tümörlerde tespit edilmiş olup, K27 mutasyonuna sahip vakalar ile kıyaslandığında daha iyi prognoz ile ilişkilendirilmişlerdir.

H3.1 ve H3.3'DKİ K27 aminoasitlerinin aksine G34 aminoasitleri posttranslasyonel modifikasyona neden olmaz¹⁹⁶. Ancak 36. pozisyonundaki lizine yakınlığı nedeni ile G34 rezidü mutasyonu pediatrik gliomalar için manipulatif olmaktadır.

Otofaji yoluğı esas olarak sitozolde ilerler ve çekirdekdeki moleküler olaylar ile arasındaki bağlantıyı ortaya çıkaracak yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır. Aslında otofaji aktivasyonu, çekirdekteki çeşitli otofaji genlerinin transkripsiyonel regülasyonuna bağlıdır. Otofaji ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eden çeşitli transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Örneğın; lizozomal biyolojisinde regülatör olan MiT/TFE üyesi transkripsiyon faktörü EB (TFEB), *ATG5*, *ATG9*, *LC3B* ve *BECN1* gibi çeşitli otofaji genlerinin transkripsiyonunu regüle eder¹⁹⁷. Transkripsiyonel regülasyonun yanı sıra, otofaji yoluğında kritik bir protein olan LC3, nükleus ve sitoplazma arasındaki asetilasyona bağlı olarak fonksiyon kaybına uğrar¹⁹⁸. Ayrıca yeni yayınlanan bir çalışmaya göre, ATG5'in DNA tamir mekanizmasında etkin rol oynadığı ve XRCC6 ile etkileşime bağlı olarak genomik stabiliteyi sağladığı gösterilmiştir¹⁹⁹. Bu sonuç otofaji yoluğının nükleus içerisindeki fonksiyonel görevine işaret

etse de, otofaji mekanizması ve kromotin düzenlemesi arasındaki ilişki hakkında veriler yetersizdir.

Örneğin Epstein-Barr virüsü ile yürütülen bir çalışmada EBNA3C onkoproteininin büyümeyi kısıtlayan koşullarda lenfoblast hücrelerinde otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. ChIP-seq data sonucunun ChIP-PCR metodu ile doğrulaması, EBNA3C proteininin H3K4me1, H3K4me3, H3K9ac, and H3K27ac aracılığı ile otofaji modülasyonu yaptığını göstermiştir²⁰⁰. Tüm bu verilere rağmen otofaji mekanizması ve histon modifikasyonları arasındaki bağlantı tam olarak çözülmemiştir.

Pediyatrik hastalara özgü histon mutasyonları ile birliktelik gösteren otofaji modülasyonu yapan çeşitli mutasyonlar bulunmaktadır. Bunlardan biri insan aktivin reseptör A-1 (*ACVRI*) gen mutasyonu olup, H3.1 K27M mutasyonuna eşlik eder¹⁰⁴.

H3.3 G34R/V mutasyonu ilişkili pediyatrik glioma tümörögenезisi araştırıldığında ise potansiyel onkogenlerden biri olan *MYCN* seviyesinin arttığı gösterilmiştir¹⁰⁵.

İnsülin benzeri büyüme faktörü; IGF2; MSS için önemli bir büyüme ve gelişme faktörüdür, nöronların yaşam siklusunun uzamasını sağlar¹⁰⁶. *IGF2* ve reseptörü *IGF1R* seviyesindeki artış çeşitli pediyatrik tümörlerle ilişkilendirilmiştir^{107,108}. PDYDG’de de, *IGF2* ve *IGF1R* ilişkili kopya sayısı artışları ve *IGF1R*’ye ait artmış aktivasyon tespit edilmiştir¹⁰⁹. Bu sonuçlar ışığında yürütülen, IGF2’yi hedef alan inhibitör ajan ile pediyatrik glioblastoma hücre hatlarında, *in vitro* ortamda anlamlı ve olumlu sonuçlar alınmıştır²⁰¹. Glioblastoma hücrelerine ait ekspresyon analizleri, inhibitör tedavisinin anlamlı oranda çeşitli siklinlerin, siklin bağımlı kinazların ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin seviyesini değiştirdiğini ve hücre siklusu kontrol noktalarında yenilenmeyi sağladığını göstermiştir²⁰². Ayrıca gen ontoloji analizi, inhibitör ajanının PI3-K üzerinden hücre siklusunu etkilediğini göstermiştir. PI3-K inhibisyonunun ise erişkin glioma hücrelerinde otofaji yolağını aktiflediği gösterilmiştir²⁰².

Temozolomid direncinde otofaji yolağının önemimini inceleyen çalışmalar da yürütülmektedir¹⁴³.

1. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız hücre hatları üzerinde yapılmış olup, bu hücre hatları ve moleküler karakterizasyonları aşağıda verilmiştir.

1.Hücre Hatları

1.A. SF188

SF188; 8 yaşındaki bir hastanın temporal lobunda yer alan, yüksek dereceli infiltratif glial tümöründen elde edilmiştir²⁰³. SF-188 hücreleri, glial fibriler asidik protein (GFAP) veya glutamin sentataz gibi glial proteinleri eksprese etmez, ancak erken pasajlarında proliferatif hücre ve mezenkimal hücre transformasyon özelliklerinin göstergesi olan laminin ve fibronektin pozitifliği mevcuttur. SF-188 hücrelerinin xenograft denemelerinde tümör oluşturmadağı gözlenmiştir²⁰³. Ayrıca SF188 hücreleri MYC gen amplifikasyonu göstermekte olup, bu düzenleme yüksek proliferatif kapasitelerinden sorumludur²⁰⁴. Bu hücreler yıldız şeklinde, tek katmanda büyüyen ve poligonal özellik gösteren hücrelerdir. SF188 hücreleri; S-100, vimentin pozitifliği ve az miktarda sinaptofizin eksprese ederler. Hücrelerde kök hücre belirteçleri olan nestin ve CD-133 pozitifliği bulunmaktadır. CD-133 gibi kök hücre belirteçlerinin varlığının, intrinsik ilaç direncinde rol oynadığı düşünülmektedir. SF188 hücrelerinde, onkogenlerden 8q24'de yer alan MYC, 11q13'de yer alan CCND1 ve 12q14'de yer alan siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) pozitifliği bulunmaktadır. Ayrıca hücre hatlarında 17q11.2 pozisyonunda yer alan NF1'e ait fokal delesyon bulunmaktadır²⁰⁵. Metilasyon profili incelendiğinde ise, SF188 hücrelerinde kısımlı histidin üçlüsü (FHIT) geni hipermetilasyonu tespit edilmiştir. Gliomagenesis için anahtar sinyal yollarının incelendiği çalışmalarda; SF-188 için MAPK aktivasyonunda artış tespit edilmiştir. AKT

yolağı aktivasyonu, SF188 dahil tüm pediatrik glioma hücre hatları için mevcutken, bu aktivasyon erişkin hücre hatlarına kıyasla daha düşük oranda saptanmıştır.

Tüm yüksek dereceli glioma hücre hatları gibi, SF188’de pediatrik gliomada regülasyonu bozulduğu bilinen siklin-1 proteinini kodlayan gen (CCND1), MYC, CDK4, fosfatidil inositol 3 kinaz (PIK3CA), siklin bağımlı kinaz 2A/B’yi kodyalan gen (CDKN2A/B) ve retinoblastom-1 (RB1) gibi kanser ilişkili genlerde amplifikasyon ve delesyona sahiptir²⁰⁶. Primer pediatrik glial tümörlerde tespit edilen 1q ve 7. kromozomda kazanım, 10q ve 13q’da kayıp, SF188 hücre hattında da tespit edilmiştir. Hücre hattında RB1 yolağı disregülasyonu yanı sıra, hücre siklus kontrol kaybı ile ilişkili genlerden olan CCND1 ve CDK4’de amplifikasyon tespit edilmiştir. Primer tümör hücrelerinde NF1 delesyonu sonucu ortaya çıkan p53 ve RTK/PI3K/AKT yollarındaki bozukluklar SF188 hücrelerinde de tespit edilmiştir^{207,208}.

1.B. SF8628

SF8628 hücre hattı; H3.3 K27M mutant DIPG hastasından, cerrahi biyopsi ile alınmış olup, bu mutasyonun karakterizasyonu ve hedef tedavi çalışmaları için örnek teşkil eden, literatürde sıkça kullanılan bir hücre hattıdır ^{218,219}. H3.3 K27M mutasyonu taşımasının yanı sıra bu hücre hattını, SF188’e iyi bir alternatif kılan diğer bir özelliği ise hayvan modellerinde tümorojenik özelliğinin olmasıdır^{218,219}. DIPG, çok agresif ve tedavisi oldukça zor tümörler olup, çocukluk çağında beyin tümörlerine bağlı ölümlerin en sık sebebidir²⁰⁹. DIPG’lerin önemli bir kısmı spesifik bir alterasyon ile karakterize özel bir grup tümörden meydana gelmektedir; DSÖ MSS Tümörleri 2021 sınıflamasına göre “diffüz orta hat gliomu, H3 K27 değişikliği gösteren” olarak tanımlanan bu tümörlerin >%95’inde H3.3 proteinin kodlayan genlerin birinde (H3F3A, H3F3B, HIST1H3B, HIST1H3C), 27. kodondaki mutasyon neticesinde, lizin aminoasidi metiyonin aminoasidi ile yer değiştirmiştir. H3 K27 değişikliği

içeren DIPG vakalarında K27 dimetilasyon ve trimetilasyon seviyesinde genel düşme saptanır ve bu epigenetik değişikliğin onkogeneze en önemli tetikleyici faktör olduğu düşünülmektedir^{210,211}. Daha ender olarak görülen, EZHIP geni yüksek ekspresyonu da tümörojenik etkiye neden olmaktadır^{210,212,213}.

1.C. U87

U87 hücre hattı, epitelyal morfolojiye sahip olup, 44 yaşındaki malign glioma tanısı konulan bir erkek hastadan elde edilmiştir. IDH mutasyonu taşımayan U87 hücre hattı, proliferatif tümör kümeleri oluşturabilir ve nöral kök hücre fenotipindeki hücrelerden zengindir. Kök hücrelerin kendini yenileme ve multipotent olma özelliklerini bünyesinde barındırır. Oluşturdukları ikincil kümeler insan glioblastomu tipik özelliklerini taşır. Bunlar; selüler pleomorfizm, nekroz çevresinde psödopalizatlanma, hiperkromatik çekirdek, yoğun mikrodamarlanma ve beyin parankimine invazyon'dur. Farelerde tümörojenik etkisi bulunmaktadır. Erişkin yüksek dereceli gliomunun tüm tipik özelliklerini bünyesinde bulunduran U87 hücre hattı, literatürde en çok kullanılan hücre çeşitlerinden biri olup araştırmalar için güvenilir ve kullanışlı bir tercihtir²¹⁴.

1.D. LN229

LN229 hücreleri, 60 yaşındaki glioblastom tanılı hastanın sağ fronto-parieto-okspital bölgesinden alınmıştır. İgsi form göstermekte olup, 1.7 ± 0.2 gün içerisinde iki katına çıkma hızı ile kolektif büyüme paternine sahiptirler. GFAP ve S-100 pozitifler. Hücreler TP53 mutasyonu ve CDKN2A tümör baskılayıcı gende, homozigot delesyon taşır. PTEN *wild type* genotip gösterirler. Literatürde en çok kullanılan hücre çeşitlerinden biri olup, erişkin GBM davranış paterni için klasik örneklerdendir^{215,216}

2. Primer Kültür

Koç Üniversitesi Hastanesi'nde opere olan hastalardan, taze alınmış tümör örnekleri patoloji uzmanı tarafından glial tümör olduğu doğrulandıktan sonra hızlıca %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) eklenmiş, soğuk Dulbecco'nun değiştirilmiş eagle medyumunu (DMEM) içerisinde laboratuvar ortamına 20 dakika içerisinde getirildi. *Smear* örneği hazırlanarak yapılan intraoperatif histomorfolojik değerlendirme ile nekroz içermeyen ya da <%10 oranında nekroz içeren yaklaşık 2 cm³ hacmindeki tümör örneği, 10 cm çapındaki hücre kültürü plaklarında, fosfat tamponize salin (PBS) içerisinde 1 mm³ olacak şekilde steril neşter ile parçalara ayrıldı. Parçalara ayrılan doku, 50 ml DMEM içeren falkon içerisine alındı. Oda sıcaklığında 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatantı ayrıldıktan sonra kalan çökelti 1mg/ml kollejanaz/dispaz çözeltisi içinde çözündü. Çözünen doku 37⁰C'de, 30 dakika boyunca sallanan düzenek üzerinde inkübatörde bekletildi ve 10 defa olacak şekilde 10 ml'lik pipet yardımı ile karıştırıldı. Örnek 70 µm hücre süzgeçlerinden geçirildi ve tekrar 50 ml'lik falkon tüplere alındı. Sindirim enzimlerini uzaklaştırmak adına 50 ml DMEM eklendi. Örnek 500xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı ayrıldı. Kalan çökelti, 6 ml nöronal bazal medya içerisine, EGF (20 ng/ml), FGF (20 ng/ml) ve B27 eklenerek çözündü ve 10 cm çapındaki plaklara konuldu. 15 dakika sonra medya, matrijel ile kaplanmış plaklar üzerine transfer edildi ve fibroblast içeren ilk plak atıldı. Hücreler günlük olarak takip edildi.

3. Reaktifler

Tedavi seçeneği olarak çalışmada kullanılan ilaçlar: klorokin (S3267), vinkristin (S9555), siklofosfamid (S2957), temozolomid (S5673), etoposide (S1225), karboplatin (S1215) idi. İlaç miktarları; Siklofosfamid: 50 mg, Vinkristin: 5 mg, Karboplatin: 50 mg, Temozolomid: 10 mg, Etoposid: 100 mg ve Klorokin: 50 mg olarak ayarlandı²¹⁷. İlaçların dilüsyonu; dimetilsulfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich, MO) veya PBS ile sağlanarak, final solüsyonlar; 100 mM siklofosfamid, 10 mM

vinkristin, 10 mM karboplatin, 100 mM etoposid, 100 mM temozolomid, 50 mM klorokin olarak belirlendi²¹⁷.

Otofaji indüksiyonu yapan Torin1 (T4247), Selleckchem (Abingdom, UK)'ye, hücre ölümünü değerlendirmek için kullanılan MTT [3- (4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide], Invitrogen (Canada, USA)'e aittir. *Western blotting* ve immünohistokimya için kullanılan antikorlar; anti-*LC3B* (CST, #2775), anti-*SQSM1/p62* (BD, 610832), anti-*ATG5* (Sigma-Aldrich, A0856), anti-*beta actin* (Sigma-Aldrich, A5441)'dir.

Tavşan IgG sekonder antikor ile konjuge *horseradish* peroksidaz (HRP) (Jackson Immunoresearch laboratories, #111035144) ve fare antikor HRP (Jackson Immunoresearch laboratories, #115035003) ürünlerinin hepsi Cell Signaling Technology (Danvers, USA)'ye aittir. Rekombinant insan ATG5 antikor Novus biologicals (Logan, USA)'den, Earle's dengeli tuz solüsyonu (EBSS) Biological Industries (Masschusetts, USA)'den temin edildi.

4. Hücre Kültürü

Erişkin glioma hücre hatları U-87, LN-229 ve çocuk glioma hücre hattı SF-8628, American Type of Cell Culture (Manasas, VA)'den, pediatrik glioma hücre hattı SF188 ise Dr Chris Jones laboratuvarı (İngiltere)'nden temin edildi.

SF-188 hariç tüm hücrelerin kültürü ve proliferasyon ortamı yüksek glukoz içeren DMEM (GE Healthcare, Piscataway, NJ) kullanılarak yapıldı. Bu besi yeri, %10 FBS ve %1 P/S (GIBCO, Carlsbad, CA) ile hazırlandı. SF-188 hücreleri ise DMEM/F12 medyası ile yine %10 FBS ve %1 P/S içerecek şekilde çoğaltıldı. Tüm hücreler 37°C'de, %5 CO₂ inkübatöründe muhafaza edildi.

5. Otofaji İndüksiyonu ve İnhibisyonu

Otofaji indüksiyonu; amino asit ve serum açlığı veya Torin 1 ile sağlanırken, inhibisyonu klorokin ile yapıldı. Tüm hücreler petri kaplarında 100 mm çapta 1×10^6 hücre olacak şekilde çoğaltıldı ve bir gece inkübasyonu takiben adhezyonları sağlandı. Bunu takiben hücrelerin büyüme ortamı Earle dengeli tuz solüsyonu (EBSS) ile değiştirildi ve 37°C’de 48 saat bekletildi. Alternatif olarak EBSS altında 3 saat bekletilen hücrelere 10 μ M klorokin eklendi. Ayrıca hücreler protein izolasyonu öncesi 250 μ M Torin 1 ve aynı hacimde DMSO ile muamele edildi.

6. Protein izolasyonu ve Western blot analizi

Bu çalışma daki tüm adımlar buz üzerinde gerçekleştirildi. Protein izolasyonu için tüm hücreler PBS ile yıkandı. 10.000 rpm, 4°C’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra PBS ayrıldı. Hücreler, 100 μ L 50mM proteaz inhibitör karışımı (Roche, 04-693-131-001), 1mM fenilmetilsülfonik florid (PMSF, Sigma-Aldrich, P57626) ve TRIS-HCl pH 7.4, %1 Nonidet P-40, %0.25 Sodyum deoksikolat içeren RIPA tampon çözeltisi ile parçalandı. Her 5 dakikada bir 30 dakika boyunca 10.000g, 10 dakika, 4°C koşullarında vortekslendi. Total protein içeren supernatanlar ependorf içine alındı ve -80°C’de muhafaza edildi. Protein konsantrasyonu üretici talimatlarına uygun şekilde, Bio-Rad (Hercules, CA), Bio-Rad (Bradford) protein ayar düzenlemesi ile belirlendi. Aynı miktarda protein içeren örnekler Laemmli yükleme tamponu ve β -merkapto etanol ile 95°C’de 4 dakika denatüre edildi. Her protein örneğinden 60-80 μ g kadarı, %10-15 SDS-poliakrilamid jellere (SDS-PAGE) ayrı ayrı yüklendi. Jel protein yığını için 80V ile başlanıp protein çözme için 110V’a çıkacak şekilde 2 saat boyunca yürütüldü. İşlem biter bitmez proteinler transfer tampon (25 mM Tris Base, 190 mM glisin ve %20 metanol) içerisinde nitroselülöz membranlara (Millipore, IPVH00010), oda sıcaklığında, 225 mA’de 75 dakika sürecek şekilde transfer edildi. Sonrasında membran, yavaş bir şekilde bloke edici solüsyon (4% non-Fat milk

powder (BioRad, 1706404) içerisine alındı ve 1 saat oda sıcaklığında tutularak 0,5%PBS-T (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, %0.05 Tween- 20, pH 7.4) içerisinde özündü. Bloklama bittikten sonra membran spesifik primer antikorlar [anti-p62, anti-LC3, anti-ATG5, and anti-actin (Sigma-Aldrich, A5441)] ile 4°C’de yavaşça sallayan düzeneğin üzerinde gece boyu kalacak şekilde inkübe edildi. Sonraki aşamada membranlar %5 PBS-T ile yıkamanın ardından içerisinde spesifik HRP konjuge ikincil antikor içeren bloklama solüsyonunun içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat bekletildi ve 3 kere %5 PBS-T solüsyonu ile 15’er dakika olacak şekilde, oda sıcaklığında yıkandı. Protein bandları Western lightning ECL gelişmiş kemiluminesans substratının (Amersham, Buckinghamshire, UK) 1/1 olarak hazırlanmış solüsyonu kullanılarak görüntülendi ve görüntüler ChemiDoc Touch Görüntüleme Sistemi (BioRad) ile alındı. İmmunreaktif bandların yoğunluğunun kuantifikasyonu ve ChemiDoc Touch görüntülerinin analizi, Image Lab Software (Bio-Rad) ile yapıldı. Grafikler, arka plan çıkarımının ardından ortalama yoğunluk değerleri baz alınarak hazırlandı.

7. MTT

3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolim bromid (MTT) deney düzeneği, kemoterapi modülasyonu yapan ilaçların sitotoksitesinin değerlendirilmesi ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek için yapıldı. U87-MG, LN-229, SF-8628 ve SF-188 hücreleri, 96-kuyucuklu plakların üzerine, her kuyucuk içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde ekildi ve kültür koşulları yukarıda anlatılan şekilde hazırlandı. 24 saat süren ekilmenin ardından hücreler artan konsantrasyonlarda vinkristin, siklofosamid, karboplatin, etoposide, temozolomide, klorokin ve DMSO ile ayrı ayrı muamele edildi. 48 ve 72 saat süre ile yapılan muamelelerin ardından, 5mg/mL MTT’den 10 µl kadar, 100 µl hücre medyasının içine konuldu. SF-188 için 6 saat, diğer hücre hatları için ise 3 saat

kadar, 37°C’de bekletildi. Beklemenin sonunda media çekildi, formazan kristalleri DMSO içinde 10 dakika kadar oda havasında bekletilerek çözüldü. Absorbans dalgası, Microplate absorbans okuyucu (BioRad, iMark) tarafından 570 nm olarak belirlendi. DMSO verilerek oluşturulan kontrol hücrelerinin absorbansına oranla her grubun MTT yoğunluğu belirlendi.

8. Klonlama ve Lentiviral Üretimi

Klorokin, lizozom pH’sını yükselterek, lizozom içinin daha bazik olmasına neden olur. Lizozomdaki yıkıcı enzimler (proteaz, lipaz, vb) optimum etkilerini asit pH ortamda gösterebilirler. Klorokin ile muamele lizozomdaki yıkımı baskılar ve otofaji tarafından taşınan kargo moleküllerin ve otofagozom yapısındaki LC3 gibi proteinlerin yıkımını engeller. Öte yandan klorokin lizozomların bütünlüklerini kaybetmelerine ve yıkıcı enzimlerinin sitoplazmaya sızdırmalarına yol açabilir. Bu nedenle otofajiyi, başka yan etkileri olabilecek klorokin dışında modern genetik yöntemlerle, *ATG5* gibi önemli otofaji genlerini nakavt ederek de incelemek gerekir.

ATG5 knock-out hücre hatları, laboratuvarımız tarafından CRIPSR/CAS 9 sistemi ile (g) RNA *ATG5* Crispr primer sekansları hedef alınarak: *ATG5*-1 Foward primer 5’- CACCGGATGGACAGTTGCACACACT-3’ ve *ATG5*-1 Reverse primer 5’- AGTGTGTGCAACTGTCCATCCGGTG -3’ oluşturuldu. Stbl3 kompetent bakteri türü ile transformasyonu için pLentiCRISP-v2 plasmidi ve (Addgene, #52961) *ATG5* primerlerinin termal *cycler* ile ligasyonu sağlandı. Transforme bakteri ampisilin içeren LB agar besi yerlerinin üzerine eklendi ve 37°C’de bir gece inkübe edildi. Transformasyon sonrası oluşan koloniler seçildi ve ampisilin eklenmiş LB medya üzerinde, sallanan düzeneğin üzerinde 200 rpm hızında 37°C’de bir gece boyunca bekletildi. Bir sonraki adımda, büyüyen bakteriler 5000g’de, 4°C’de 30 dakika boyunca santrifüj edildi ve çökeltiler toplandı. Plazmid üretici talimatlarına uygun şekilde mini prep kit (Macherey-

Nagel;1708/003) kullanılarak çıkarıldı. Sonrasında CRISPR *ATG5* vektörü içeren lentivirus, HEK293T hücrelerinin 5ug/mL psPAX2 (Addgene, #12260), 4 ug/ml pMD2.G (envelope plasmid, Addgene,#12259) ile transfekte edilmesi sonucu protokole uygun olarak kalsiyum fosfat da kullanılarak üretildi. Transfeksiyondan 28 saat sonra, lentivirus *ATG5* içeren süpernatantlar toplandı, transdüksiyon için 0.45 µm por içeren enjektörler aracılığı ile filtrelendi ve -80°C’de depolandı. *ATG5* knock-out hücreler 1 µg/ml ve 0.75 µg/ml (U87-MG) puromisine dirençlerine göre 6 kuyuculuklu plate’lerden seçildi. Poliklonlar test edildi ve western blot ile *ATG5* protein seviyeleri kontrol edilerek; doğru klonlar seçildi. Sonraki deneylere doğrulanan klonlar ile devam edildi.

9. Knock-down

ATG5 knock-out protokolü tüm hücre hatlarına uygulandı ve bu protocol U-97, LN-229 ve SF-188 hücreleri için başarılı olurken SF-8628 hücrelerinin tamamen ölümüne sebep oldu. Bunun üzerine bu hücre hattı için siRNA aracılı ‘*knock-down*’ protokolünün uygulanmasına karar verildi. Transfekte hücreler %70-90 oranında büyütüldü. Opti-MEM™ 3000 Reagent içerisinde, dilüe edilmiş lipofektamin iyice karıştırılarak hazırlandı.

10. Göç Deneyi

Kuyucuklu büyüme plaklarında, proliferen olan hücreler tripsin ile plaklardan kaldırılıp falkon tüplerinde toplandı ve ml’deki hücre sayısı belirlendi. 8.0 mm boyutundaki insertler 24 kuyucuklu plaklar içine yerleştirildi. İnsert başına 100 ml serumsuz medya eklendi. İnsert başına 2.5×10^5 hücre, 200 ml serumsuz medya içerisinde eklendi, 750 ml medya alt bölmeye eklendi. İnsertler sırası ile kuyucuklara konuldu. 16 saat sonra PBS ile yıkama yapıldı. Hücrelerin fiksasyonu, %4 PFA ile oda sıcaklığında 2 dakika süre ile yapıldı. İki kere PBS ile yıkamanın ardından %100 metanol kullanılarak

oda sıcaklığında 20 dakikalık permeabilizasyon gerçekleştirildi. Ardından insertler iki kere PBS ile yıkandı. Hücrelerin boyanması Giemsa ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında yapıldı. Giemsa'nın yıkaması ise yine 2 kere olacak şekilde PBS ile yapıldı. Göç etmeyen hücreler pamuk ile ayrıldı. Göç eden hücrelerin fotoğrafı çekilerek mikroskop altında sayıldı.

11. Çizik Deneyi

Plaklarda çoğaltılan hücreler plak üzerinden ayrıştırılarak mikroskop altında sayıldı. 12 kuyucuklu plak, içerisinde her kuyucukta 1-2 ml medya olacak şekilde hazırlandı ve hücre ekimi yapıldı. Hücre yoğunluğu %70-80 oranına gelene kadar, yaklaşık 18-24 saat beklenildi. 1 mm'lik pipet ucu kullanılarak kuyucuk üzerinde birbirini kesecek şekilde 2 çizik oluşturuldu. Çizik sonrası ayrılan hücrelerin çıkarımı için hücrelerin medyası dikkatlice değiştirildi. Mikroskop altında görüntüleri alındıktan sonra, hücreler inkübatöre konuldu ve hücreler çizik hattının ortasında buluşana dek 4-8 saatte bir fotoğraflar çekildi.

12. Seahorse

Mitokondrial solunum, XFe24 extraselüler akış çözümleyici ve XF Cell Mito Stress Test Kiti kullanılarak ve üretici talimatlarına (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) uygun bir şekilde incelendi²¹⁸. Hücreler kuyucuk başında 15.000 hücre olacak şekilde, XFe24 hücre kültürü plaklarına ekildi. Kartuş CO₂ içermeyen inkübatörde 37°C'de analizden önce bir gece boyunca bekletildi. Hücrelerin içinde bulunduğu medya analizden 30 dakika ve 6 saat önce XF tahlil medyası (XF Cell Mito Stress Assay) ile değiştirildi ve plaklar CO₂ içermeyen inkübatörde 37°C'de bekletildi. 1 µM oligomisin, 0.5 µM FCCP ve 0.5 µM antimisin/rotenon (Agilent Technologies) enjeksiyonlarından önce ve sonra 3 ölçüm alındı. Her kuyucuğa ait protein konsantrasyonu Bio-Rad Protein Assay reagent ile ölçüldü. Bazal solunum oligomisin enjeksiyonundan önce 3. adımda kaydedildi. Maksimum solunum 7.,

8. ve 9. adımda kaydedildi. Bazal solunumdaki protein sızıntısı 6. adımda kaydedildi. Maksimum solunumdan bazal solunum çıkarılarak yedek solunum kapasitesi ve bazal solunumdan proton kaçağı çıkarılarak ATP'ye bağlı solunum belirlendi. Mitokondriden bağımsız solunum (10, 11 ve 12. adımdaki minimum solunum) tüm solunum hesaplamalarından çıkarıldı.

13. İstatistik Analizleri

İstatistiksel analizler Graphpad Prism 2021 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Graphpad Prism, verileri analiz etmek, grafikler oluşturmak ve sonuçları yorumlamak için kullanılan bir istatistiksel analiz programıdır.

İki grup arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı Student's t-testi ve ANOVA yöntemleri ile belirlendi. Student's t testi, örneklem verilerinin normal dağılıma uyduğu durumlarda kullanılır. ANOVA (varyans analizi) yöntemi, bir veya daha fazla bağımsız değişkenin, bir bağımlı değişkenin varyansında anlamlı bir fark yaratıp yaratmadığını belirlemek için kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir. ANOVA, birçok farklı varyasyona sahip veri setlerinde kullanılabilir ve bu nedenle çok yönlü bir analiz yöntemi olarak kabul edilir. ANOVA, verilerin varyansını analiz ederek çalışır ve farklı grupların ortalamaları arasındaki farkı değerlendirir. ANOVA, farklı grupların ortalamaları arasında anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için F-testi kullanır. Bu test, gruplar arasındaki farkın, grup içindeki varyansın karşısında ne kadar büyük olduğunu belirler. Bu çalışmada birden fazla bağımsız değişken birlikte değerlendirildiği için çift yönlü ANOVA kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar p değerinin <0.05 olması ile belirlendi.

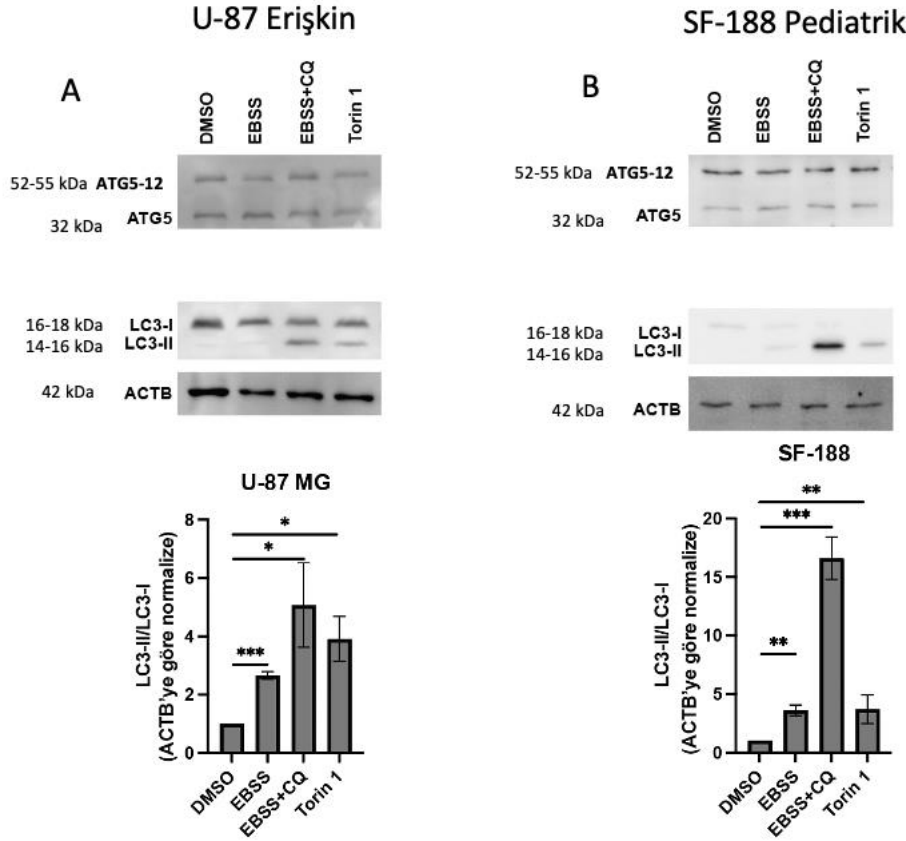
Veriler ortalama + standart hata (SEM) olarak verildi. Ortalama, verilerin ortalamasını temsil ederken, standart hata, verilerin yayılımını ve ölçümler arasındaki farklılıkları ölçer. Bu verilerin sunulması, sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini artırır.

BULGULAR

Bu çalışmadaki ilk hedefimiz otofaji mekanizmasının pediatrik (SF-8628 ve SF-188) ve erişkin (U-87, LN-229) glioma hücre hatlarındaki aktivasyonunu karşılaştırmalı olarak incelemek oldu. Bu amaçla, otofaji aktivasyonunu tetikleyen ‘Torin 1’ ve açlık koşulları sağlanarak çocuk ve erişkin glioma hücre yanıtları gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar hem açlık koşullarında hem de Torin 1 uygulanması ile çocuk ve erişkin glioma hücre hatlarında otofaji aktivasyon belirteci olan, lipide olmuş LC3 (LC3-II) seviyesinin artmış olduğunu gösterdi (Şekil-1).

Şekil-1: A: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren Protein Düzeyi

B: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren Protein Düzeyi

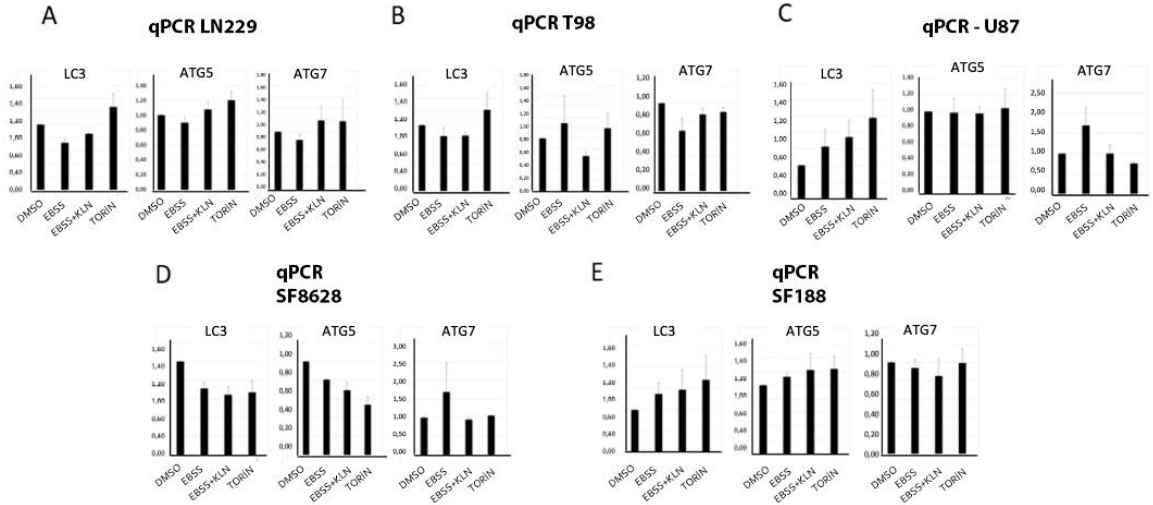


Her iki grup hücre hattı yanıtları karşılaştırıldığında, çocuk glioma hücre hatlarında erişkine kıyasla otofaji aktivasyonunun daha güçlü olduğu ve LC3-II birikiminin daha fazla olduğu gözlemlendi (p: 0.001 ve p:0.0001). Diğer yandan, otofaji yıkım hedeflerinin lizozom inhibitörleri kullanımı sonrasında incelenmesi, otofajik akımın düzeyine işaret etmektedir. Bu amaçla klorokin eklenerek yapılan deneylerde, pediatrik glioma hücrelerinin otofajik aktivitesinin erişkin glioma hücrelerine göre daha yüksek olduğu teyit edildi (Şekil 1).

Protein analizindeki otofajiye bağlı farklılıkların, otofaji proteinlerinin mRNA düzeylerindeki farklılıktan kaynaklanıp kaynaklanmadığı, qPCR analizleri ile incelendi. Yine hem erişkin hem çocuk glial hücre hatlarında protein analizine benzer şekilde otofaji deneyleri yapıldı ve qPCR analizi ile hücrelerdeki LC3, p62, ATG5 ve ATG7 seviyeleri incelendi (Şekil 2). Çoğunlukla mRNA düzeyinde artışa meyilli qPCR sonuçları elde edildi, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak, otofaji

ilişkili protein seviyelerindeki değişikliklerin, mRNA düzeyindeki değişikliklerden kaynaklanmadığına ve posttranslasyonel protein degradasyonuna bağlı olduğuna işaret eden veriler elde edildi (Şekil-2).

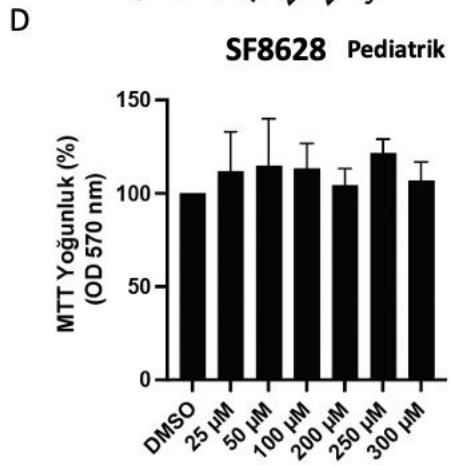
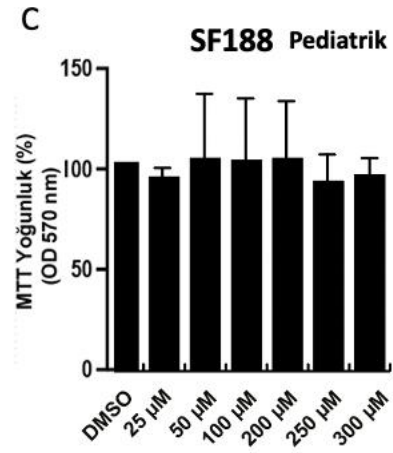
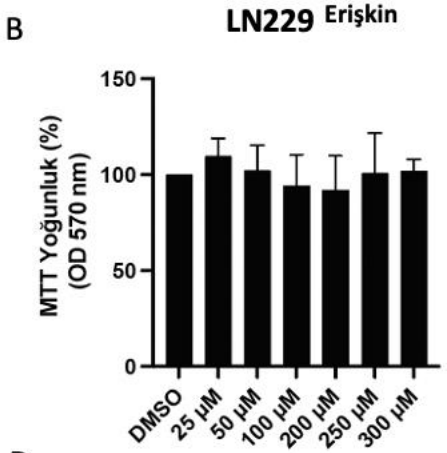
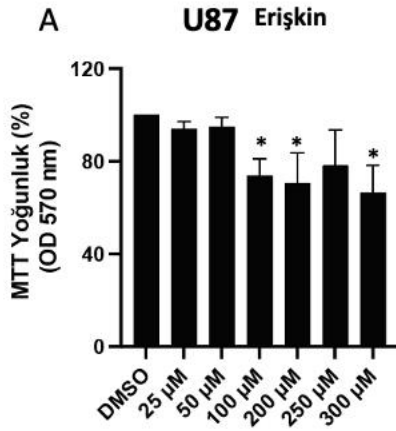
Şekil-2: A-B-C: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren DNA Düzeyi
D-E: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji Aktivasyonunu Gösteren DNA Düzeyi



Klinikte sıkça tedavi seçenekleri arasında tercih edilen kemoterapi ajanlarının, hücre tiplerine özgü yanıtları, laboratuvar ortamında, *in vitro* hücre kültürü koşullarında, karşılaştırmalı olarak

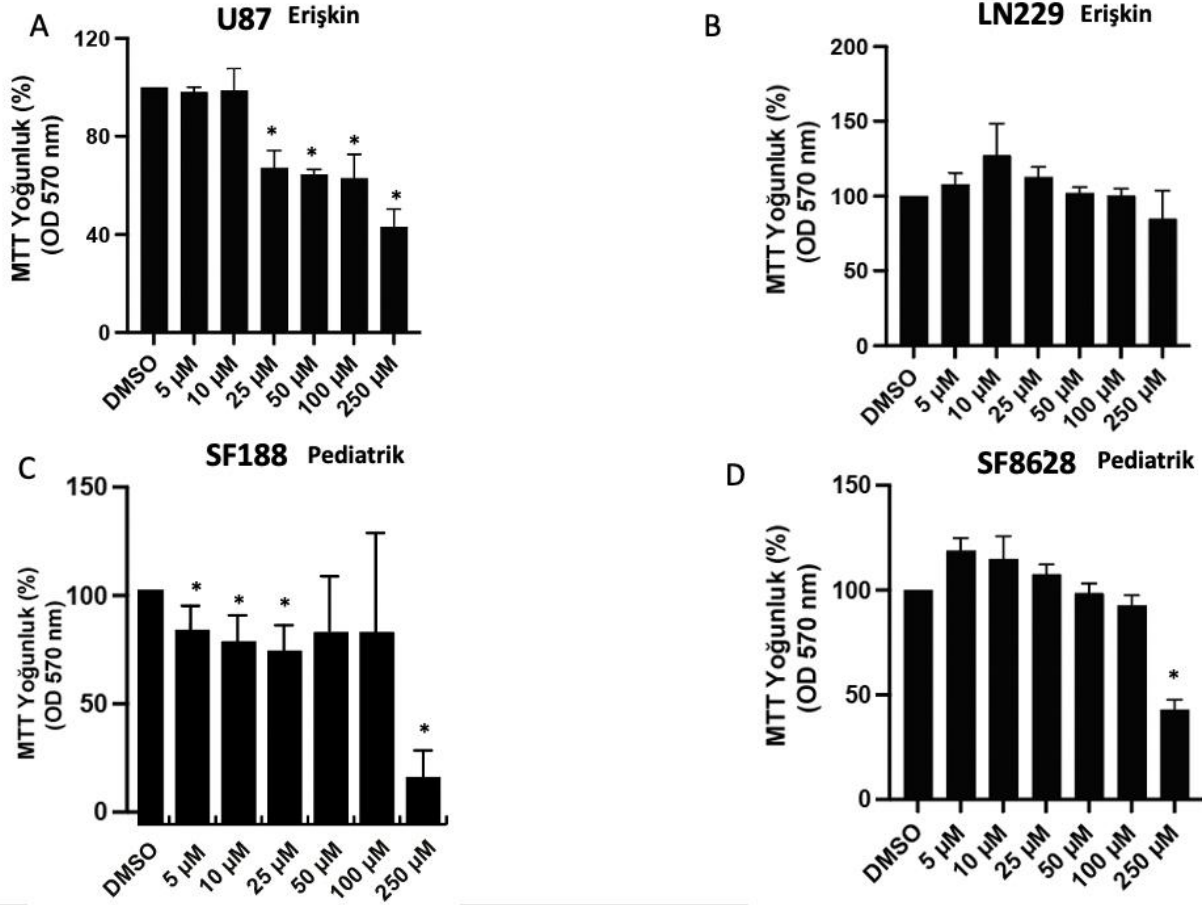
değerlendirildi (Şekil 3-8). Siklofosfamid ve temozolomid ajanlarına, hem erişkin hem çocuk hücrelerinde belirgin direnç olduğu gözlemlendi (Şekil-3).

Şekil-3: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Siklofosfamid Yanıtı
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Siklofosfamid Yanıtı

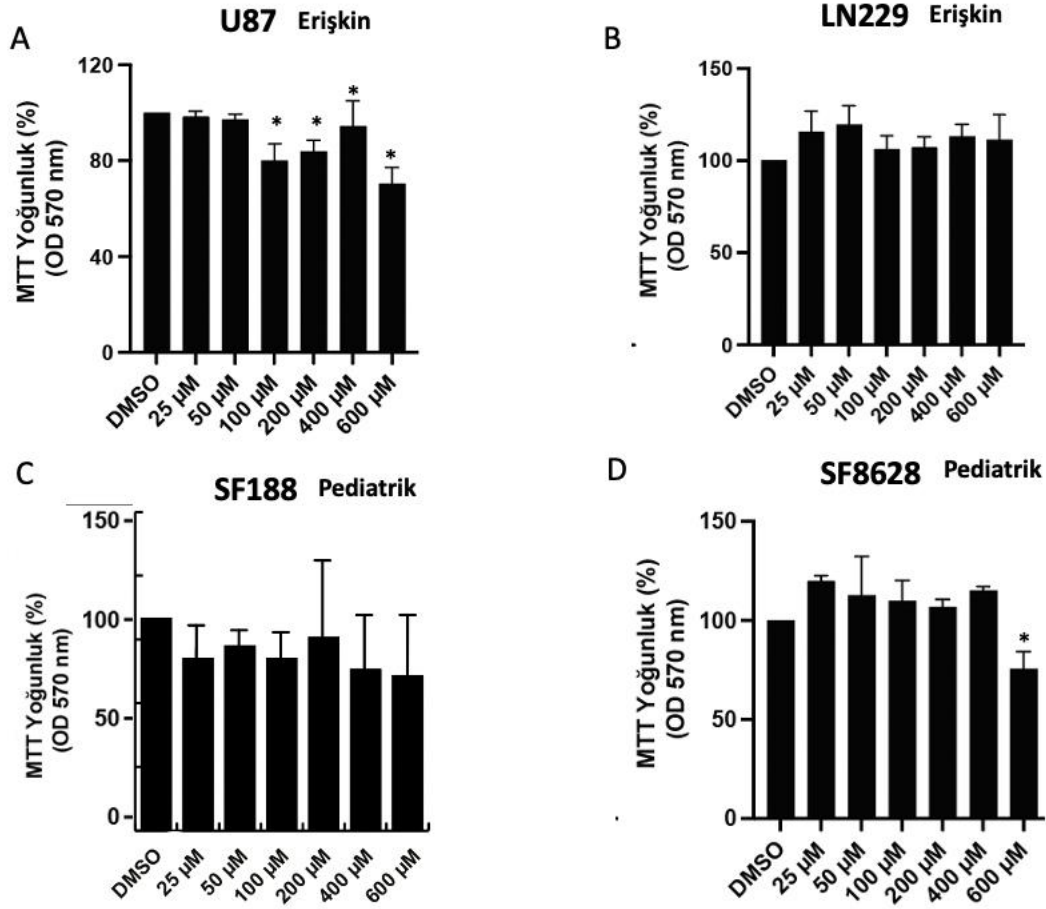


Şekil-4: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Karboplatin Yanıtı

C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Karboplatin Yanıtı

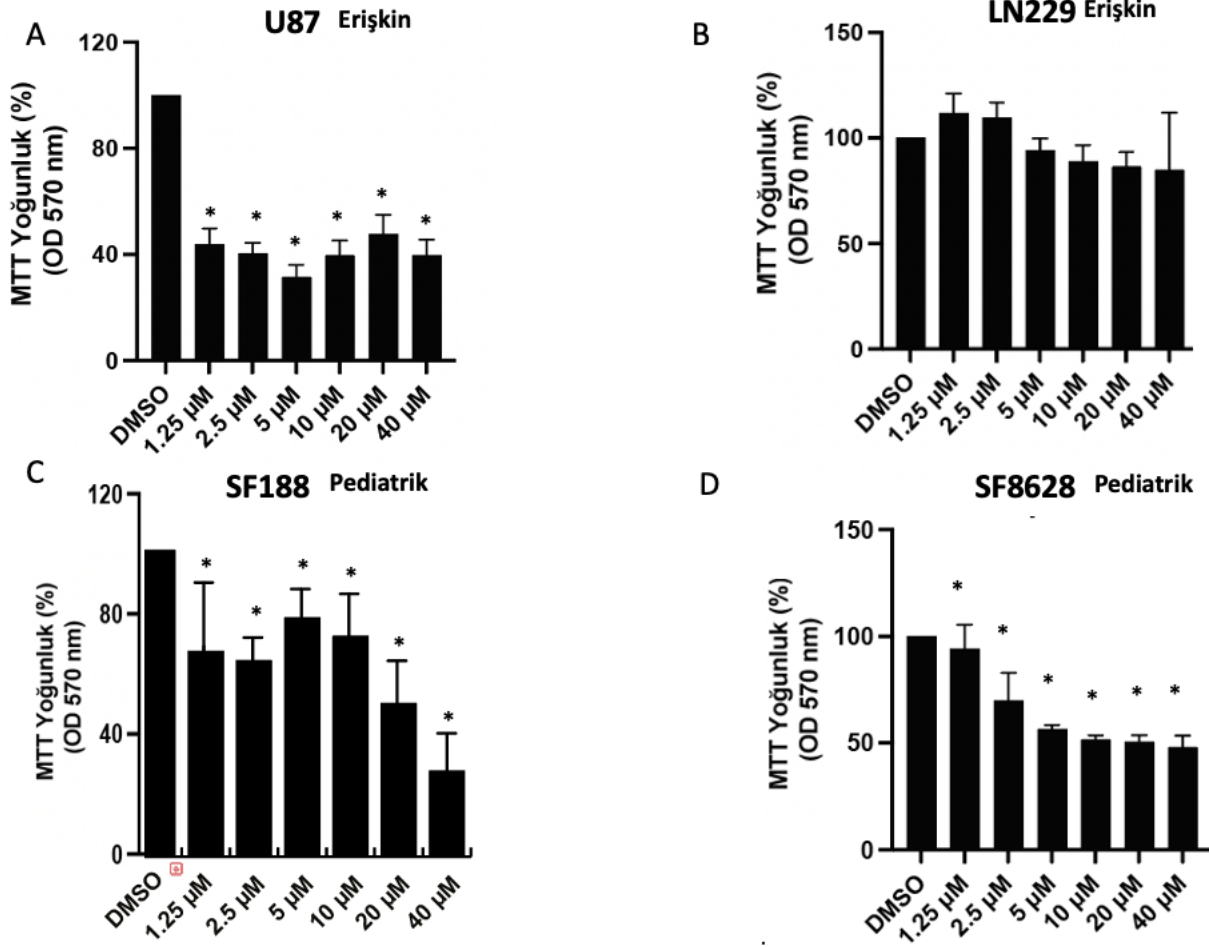


Şekil-5: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Temozolomid Yanıtı
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Temozolomid Yanıtı



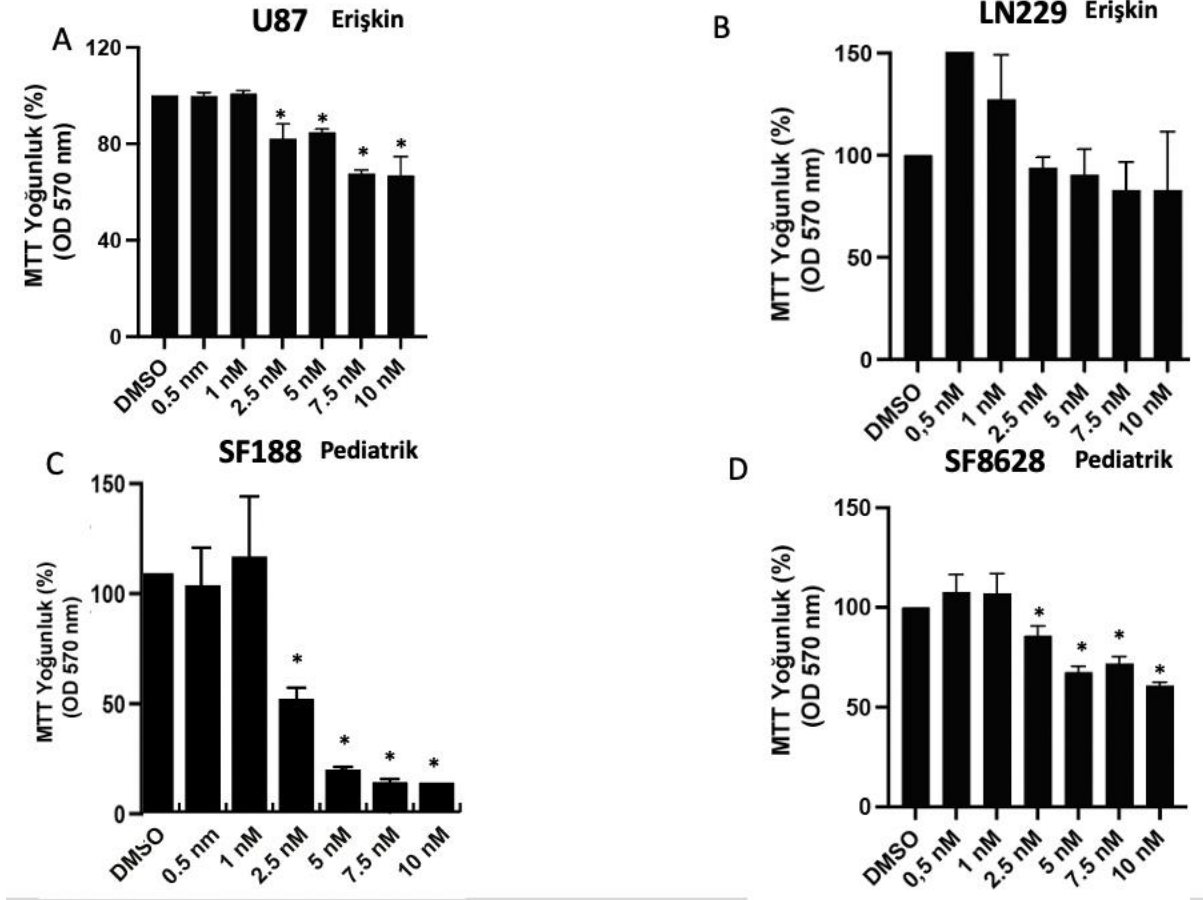
Şekil-6: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Etoposid Yanıtı

C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Etoposid Yanıtı



Şekil-7: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Vinkristin Yanıtı

C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Vinkristin Yanıtı



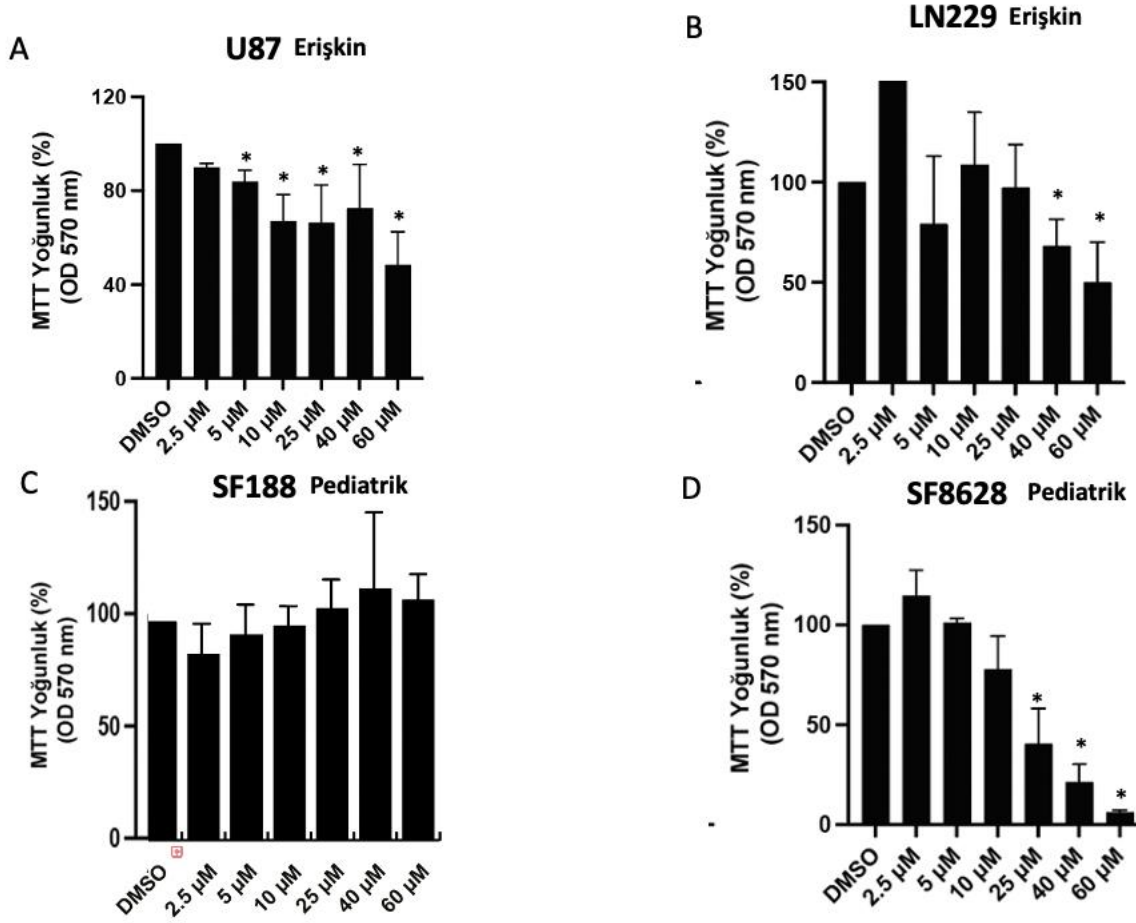
Etoposid'e ise LN-229 hariç tüm hücre hatlarının belli bir düzeyde hassasiyet gösterdiği (%50 civarı ölüm) saptandı (Şekil-6). Karboplatin ve vinkristin ajanlarına ise özellikle pediatrik hücre hatlarında, daha güçlü yanıt tespit edildi (Şekil-4 ve Şekil-7). Karboplatin muamelesine pediatrik hücre hatları sadece en yüksek doz kullanıldığında, %60 ve üzeri ölüm yanıtı verirken, erişkin hücre hatlarında %40 ve altı ölüm yanıtı elde edildi (Şekil-4). Vinkristin muamelesi sonrasında pediatrik hücre hatları; SF-188 ve SF-8628 sırası ile; %90 ve %40 ölüm yanıtı verirken, erişkin hücre hatlarında %25'in altında ölüm

yanıtı gözlemlendi (Şekil-7). Bütün bu sonuçlar, test edilen glioma hücrelerinin klinikte sık kullanılan kemoterapi ajanlarına karşı genelde direnç gösterdiğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda, pediatrik glioma hücrelerinin erişkin glioma hücrelerine göre otofaji açısından daha aktif olduğu gösterilmişti (Şekil 1). Bu nedenle ek olarak, pediatrik ve erişkin glioma hücrelerinin, klorokin tarafından otofaji inhibisyonuna yanıtları, hücre ölümü açısından incelendi. Erişkin tümör hücrelerinde klorokin ile yapılan otofaji inhibisyonu, belirgin hücre ölümüne yol açarken, iki farklı çocuk glioma hücrelerinde klorokin yanıtının farklılık gösterdiği saptandı. SF-188 hücreleri klorokin muamelesine tamamen direnç gösterirken, SF-8628 hücrelerinde doza bağlı belirgin bir hassasiyet gözlemlendi (Şekil-8).

Şekil-8: A-B: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Klorokin Yanıtı

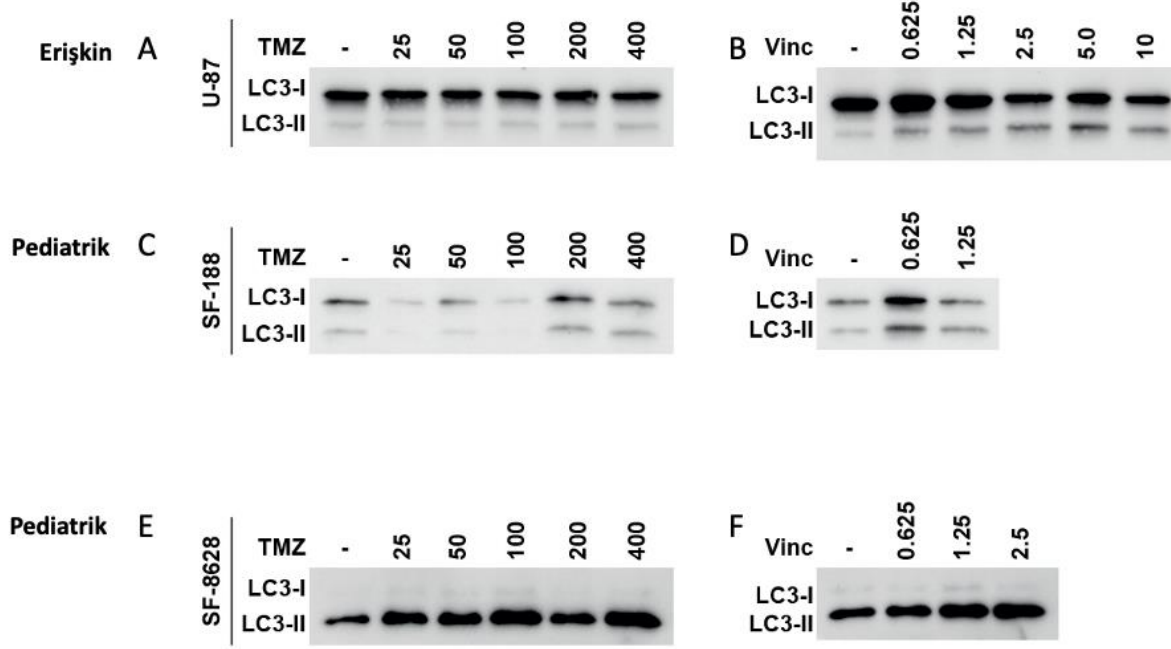
C-D: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Klorokin Yanıtı



Çalışmamızda, kemoterapi ilaçlarından temozolomid ve vinkristinin, otofajiyi aktive edip etmedikleri incelendi. Bu amaçla, erişkin ve pediatrik glioma hücreleri, artan dozda kemoterapi ilaçları ile muamele edildi ve otofaji belirteçleri immunoblot analizi ile incelendi. EBSS’de kültür sonrası açlık uyarımı şeklinde yapılan deneylerdekine benzer şekilde, pediatrik hücre hatlarında erişkin hücre hatlarına göre kemoterapi tarafından aktive edilen otofaji düzeyinin daha yüksek olduğu tespit edildi (p: 0.001), (Şekil-9).

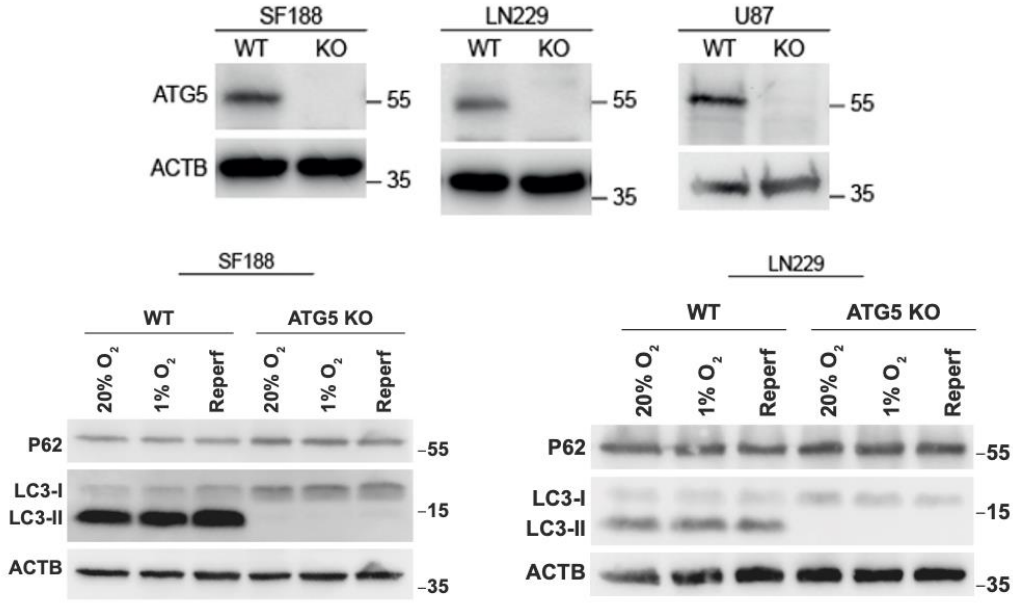
Şekil-9: A: Artan Temozolomid ve Vinkritstin Dozlarında Erişkin Glial Tümör Hücrelerindeki Otofaji Aktivasyonu

B ve C: Artan Temozolomid ve Vinkritstin Dozlarında Pediatrik Glial Tümör Hücrelerindeki Otofaji Aktivasyonu



Otofajinin pediatrik glioma hücre hatlarındaki rolünü genetik yöntemler ile ortaya koyabilmek için, otofaji regülasyonunda anahtar genlerden biri olan *ATG5* geni, hücre hatlarında CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak etkisiz hale getirildi (Şekil-10). *ATG5* geninin U-87, LN-229 ve SF-188 hücre hatlarında, başarılı bir şekilde etkisiz hale getirildiği, Western Blot protein analizi ile doğrulandı (Şekil-10). SF-8628 hücre hattında ise *ATG5* geninin etkisiz hale getirilmesinin ölümcül olduğu gözlemlendi.

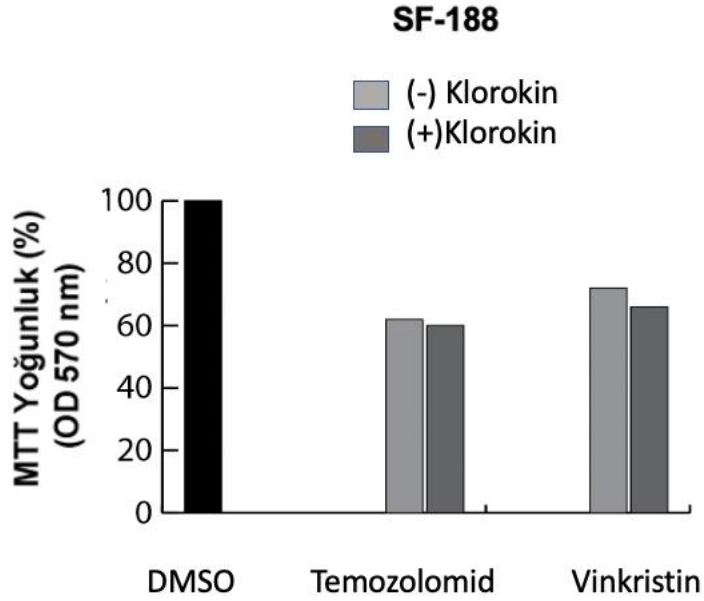
Şekil-10: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin CRISPR/CAS9 Sistemi ile Otofaji İnhibisyonunun Yapılması



CRISPR/Cas9 ile gen nakavtı, hücreler için letal olduğundan dolayı, SF-8628 hücrelerinde ATG5 geni, shRNA sistemi kullanılarak azaltıldı. ShRNA sistemi, CRISPR/Cas9 sisteminden farklı olarak genom düzeyinde bir değişiklik yerine, hedeflenen proteini kodlayan mRNA'lerden protein sentezini engellemektedir. Hedef proteinin tamamen yok edilmesi yerine, düzeyinde azalma gözlemlendiğinden, shRNA sistemi ile elde edilen sonuca nakdavn (knock-down, KD) adı verilmektedir. Çalışmamızda, ATG5 shRNA içeren SF-8628 hücrelerinden, ATG5 protein düzeylerinin azaldığı Western blot ile gösterildi.

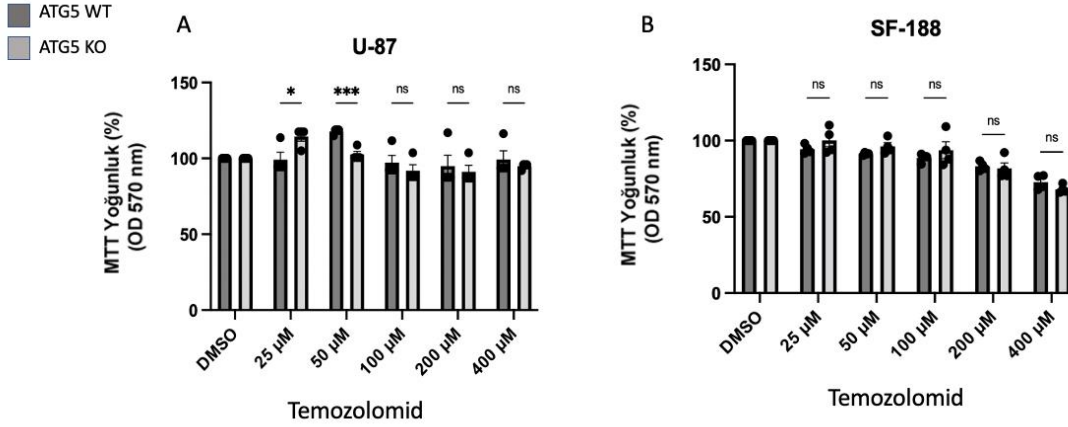
Kemoterapi ajanlarının ayrı ayrı klorokin ile kombinasyonları SF-188 hücreleri ile muamele edildi. Temozolomid-klorokin kombinasyonu, tek ajan temozolomid ile karşılaştırıldığında belirgin bir toksisite artışı göstermedi. İlginç olarak, tek başına etki göstermeyen klorokin, vinkristin ile kombine olarak kullanıldığında, toksik etkiyi bir miktar artırdığı görüldü (Şekil-11).

Şekil-11: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Temozolomid ve Vinkristin Tedavilerine Klorokin Kombinasyonu Yapıldığında Yanıtı

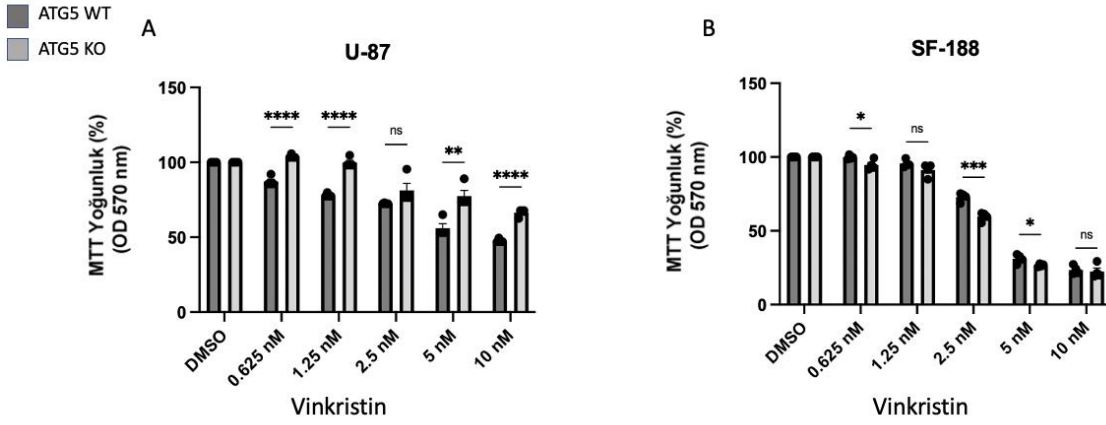


Klorokin'in adjuvan etkisinin otofaji baskılayıcı etkisi üzerinden olduğunu teyit etmek amacı ile CRISPR/Cas9 yöntemi ile yaptığımız ve otofaji yapamayan ATG5 KO U-87 ve SF-188 tümör hücrelerinin kemoterapi yanıtları karşılaştırıldı. Temozolomid ile yapılan deneylerde, ATG5 WT veya KO hücreler arasında kemoterapi yanıtları açısından bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil-12). Vinkristin kullanılarak yapılan deneylerde ise sadece pediatrik glioma ATG5 KO hücrelerinde, WT hücrelere göre kemoterapi yanıtlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p:0.003$), (Şekil-13).

Şekil-12: A: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Temozolomid Yanıtları
 B: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Temozolomid Yanıtları



Şekil-13: A: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Vinkristin Yanıtları
 B: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Vinkristin Yanıtları

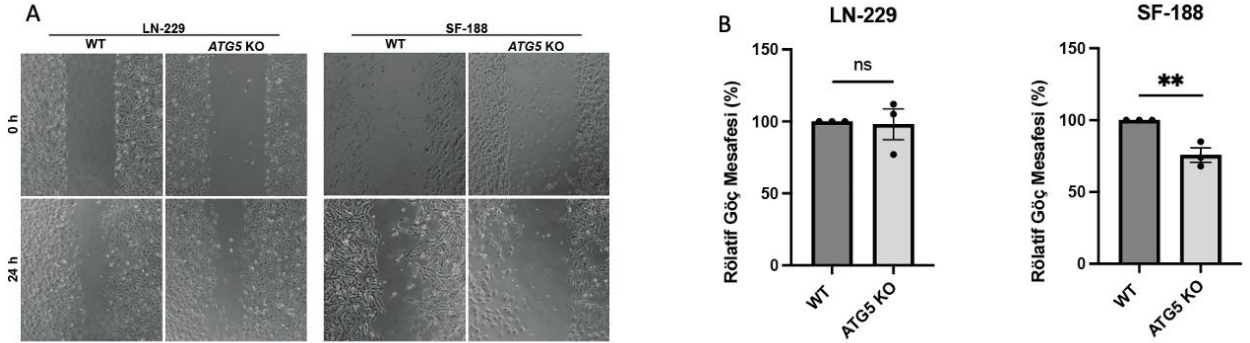


1. Migrasyon, Invazyon ve İnfiltrasyon Özellikleri

Otofajinin tümör hücrelerindeki infiltrasyon özelliği üzerindeki etkisini ortaya koymak için ATG5 WT ve KO/KD glioma hücreleri 8.0 µm por çapı olan zarlar içeren çapraz kuyucukların içine ekildi ve bir sonraki gün pasajlanarak kristal viyole ile boyandı. Elde edilen sonuçlar çarpıcı bir biçimde *ATG5* geninin etkisiz hale getirilmesinin sadece pediatrik glioma hatlarının migrasyonunu oldukça anlamlı olarak azalttığını ortaya koydu, aynı deneylerin yürütüldüğü erişkin hücre hatlarında ise benzer bir etki gözlenmedi (Şekil-14).

Şekil-14: A: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Şekilsel Gösterilmesi

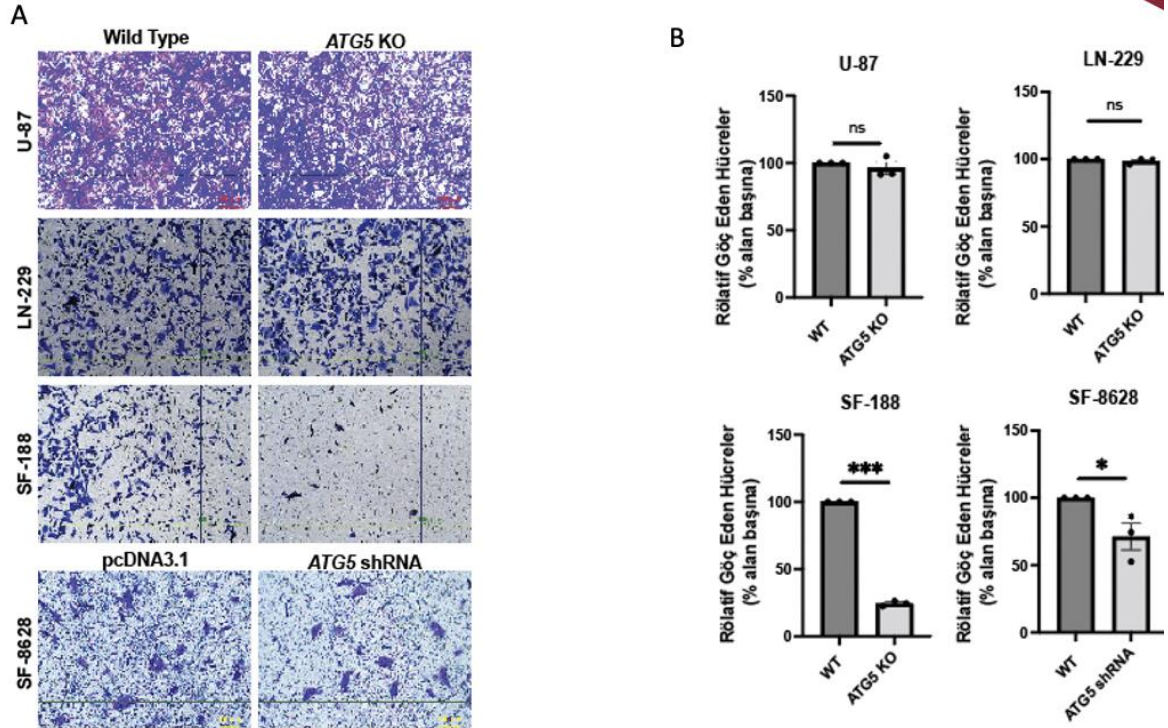
B: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Grafik Gösterimi



Çapraz kuyucuklarla yürütülen deney sonuçlarımızı destekleyici bir diğer sonuç ta, çizik testi deneyleri ile elde edildi. *ATG5* geninin etkisinin azaltıldığı pediatrik hücrelerde yapılan çizik testi ile migrasyonun belirgin olarak azaldığı gösterildi (p: 0.001). Çapraz kuyucuk sisteminde, hücre dışı matriks bileşenleri içeren ve doku matriksini modelleyen matrijel kullanılarak glioma hücre hatlarının invazyon ve infiltrasyon kapasitesi incelendi. Otofaji yapamayan ATG5 KO/KD SF-188 ve SF-8628 hücrelerinde, invazyon/infiltrasyon kapasitesinin de belirgin olarak azaldığı görüldü (p:0.001), (Şekil-15).

Şekil-15: A: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnfiltrasyon Özelliğinin Şekilsel Gösterilmesi

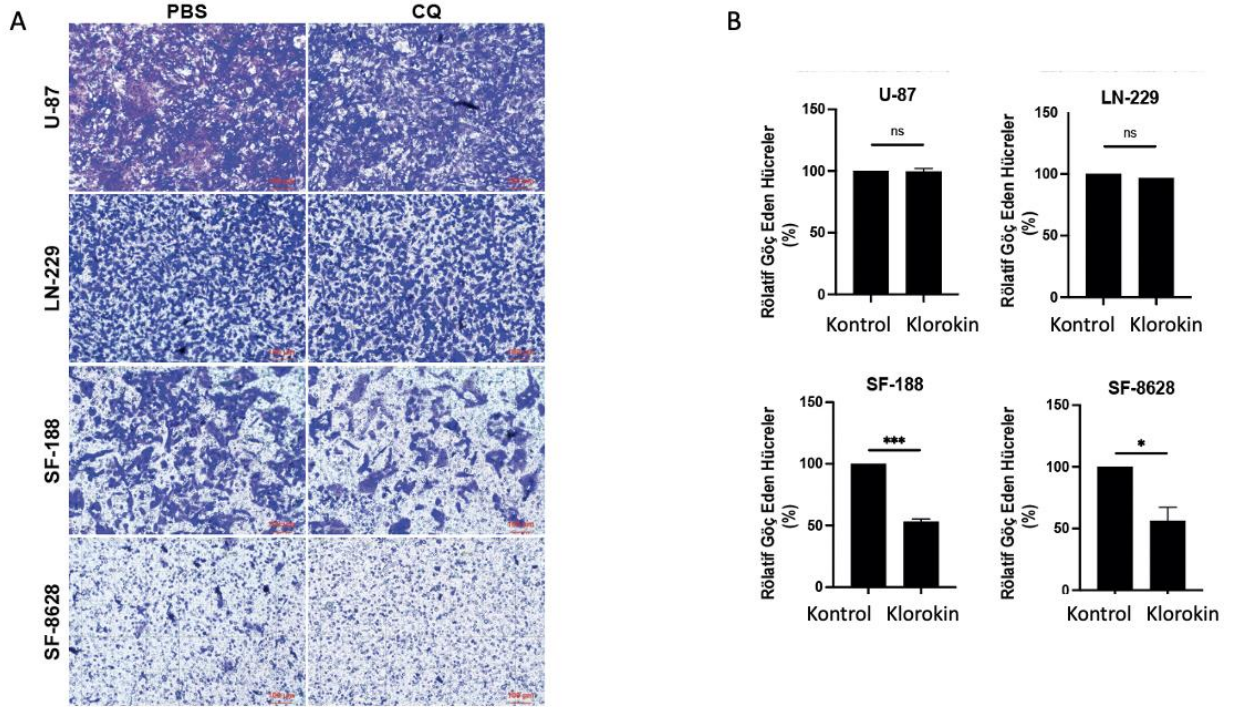
B: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Moleküler Olarak Yapıldığında İnfiltrasyon Özelliğinin Grafik Gösterimi



Alternatif bir yaklaşım olarak, otofajinin klorokin ile inhibisyonunun migrasyon, invazyon ve infiltrasyon üzerine etkileri de incelendi. Çapraz kuyucuklara hücre hatları ekildi ve 16 saat boyunca 10 mM klorokin ile muamele edildi. Klorokin ile sağlanan otofaji inhibisyonu sonucunda pediatrik glioma hücre hatlarında, SF-188 and SF-8628, migrasyon/invazyon/infiltrasyon kapasitesinin belirgin olarak azaldığı ortaya konuldu ($p:0.001$), (Şekil-16). Bu sonuçlar genetik olarak otofaji inhibisyonu yapılarak elde ettiğimiz sonuçlar ile benzer idi. Birbirini destekleyen tüm bu deney sonuçları *in vitro* ortamda, otofaji yolağının genetik ve/veya kimyasal inhibisyonunun pediatrik glioma hücrelerinin agresif davranışını azalttığını açıkça gösterdi (Şekil 14-16).

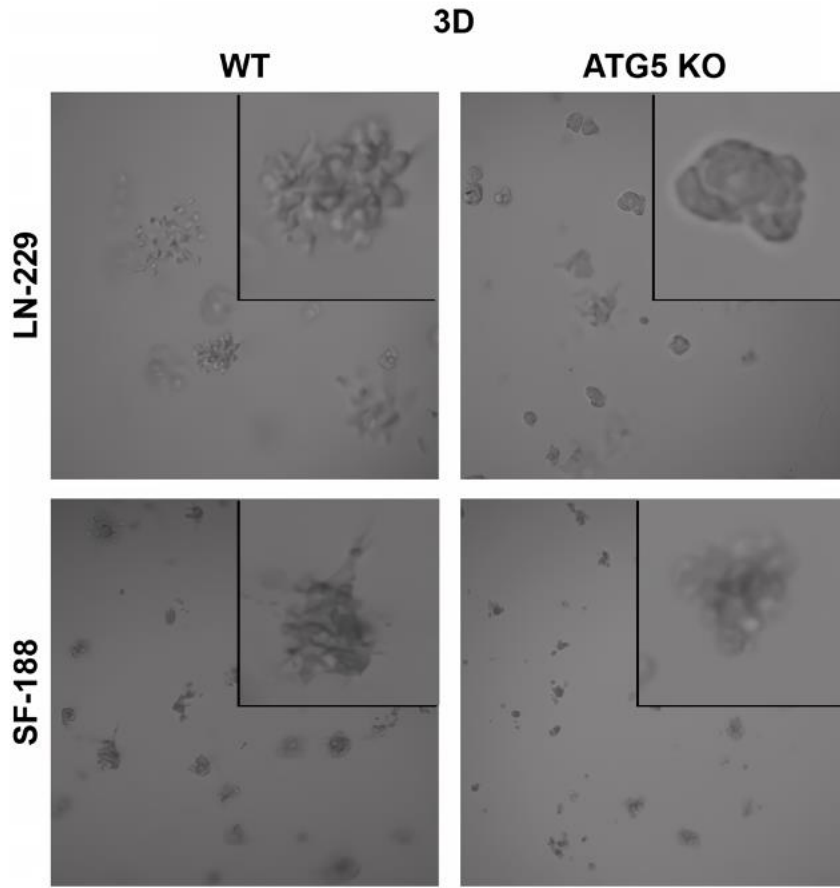
Şekil-16: A: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Medikal Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Şekilsel Gösterilmesi

B: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Medikal Olarak Yapıldığında İnvazyon Özelliğinin Grafik Gösterimi



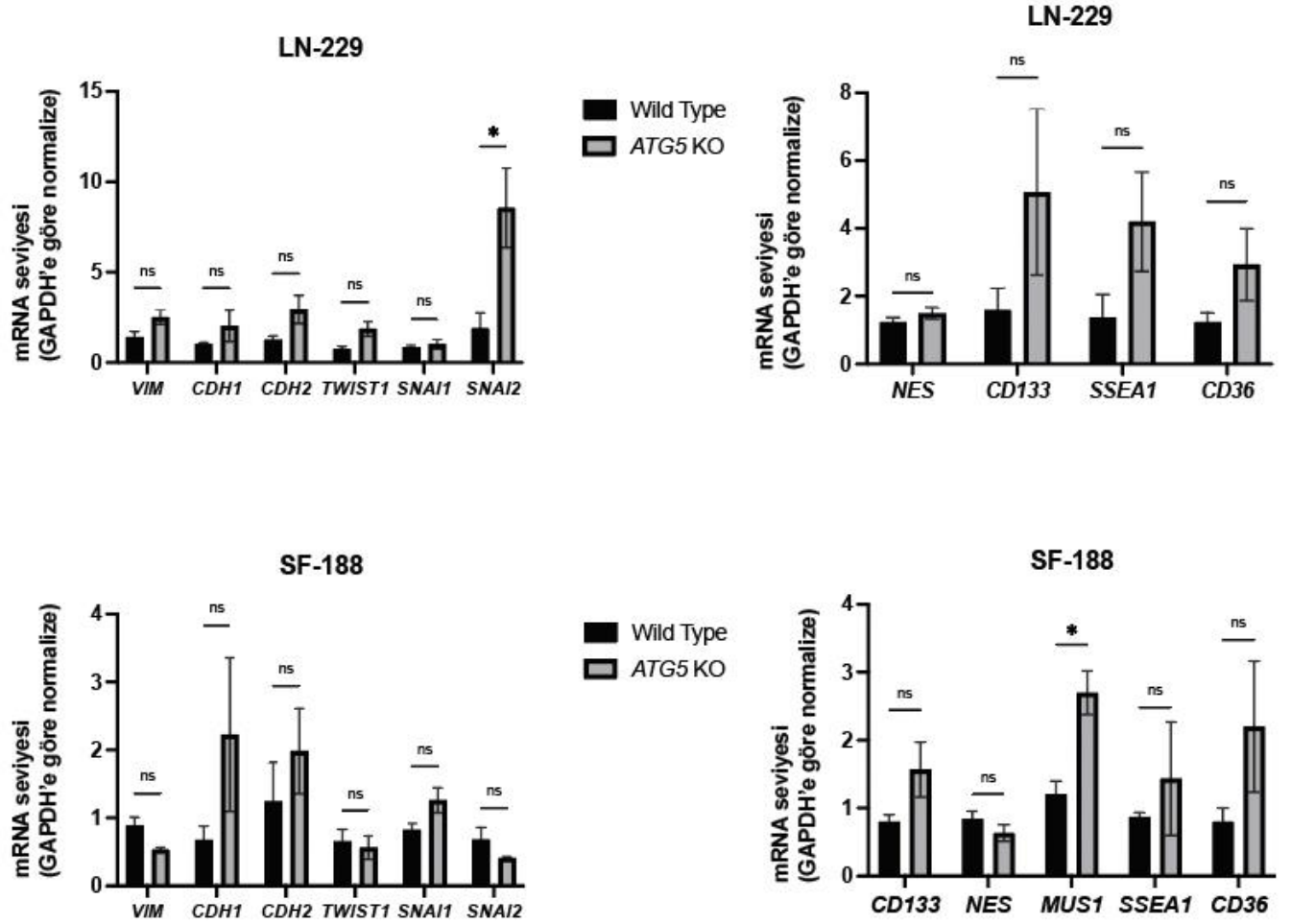
Bu sonuçların ışığında *ATG5 WT* ve *KO* tümör hücrelerinin 3 boyutlu kültürleri oluşturularak yine tümör hücresi hareketinde önemli bir gösterge olan podosit oluşumları gözlemlendi. Hem erişkin hem çocuk glial *ATG5 KO* tümör hücrelerinde podosit oluşumunun WT hücrelere göre belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil-17).

Şekil-17: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında 3 Boyutlu Görüntülerindeki Değişiklikler



Tümör hücrelerinin göçü ve invazyonunda kök hücre belirteçlerinin de etkisi olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak, otofajinin glial kök hücre belirteçleri üzerindeki etkisi incelendi. Otofaji inhibisyonu birçok kök hücre belirtecinin seviyesini artırsa da, anlamlı düzeyde etkinin hücre farklılaşması ve göçünde etkin olan SNAI2 ve MUS1 seviyelerinde olduğu görüldü (Şekil-18).

Şekil-18: Erişkin ve Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Kök Hücre Belirteç Düzeylerinde Oluşan Değişiklikler

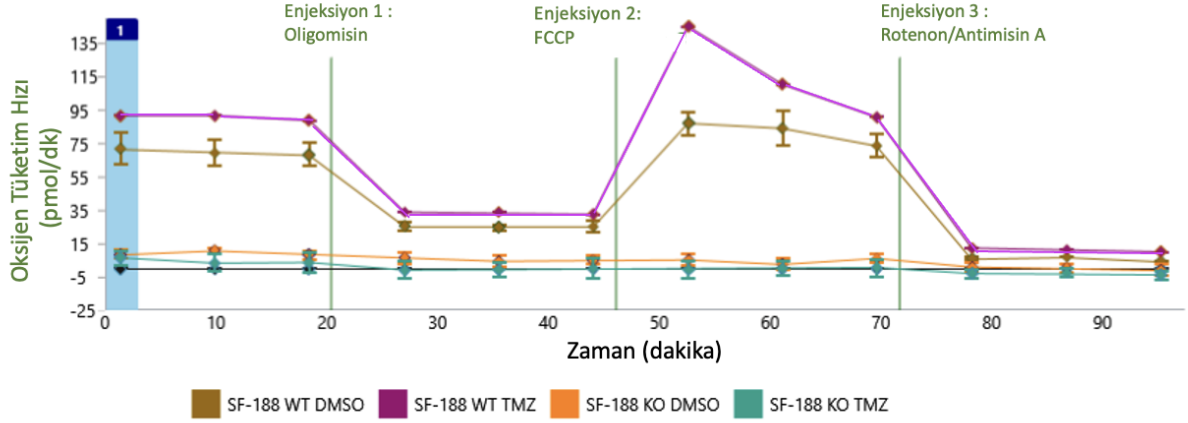


2. Otofajinin Hücrelerdeki Metabolizma Üzerine Etkisi

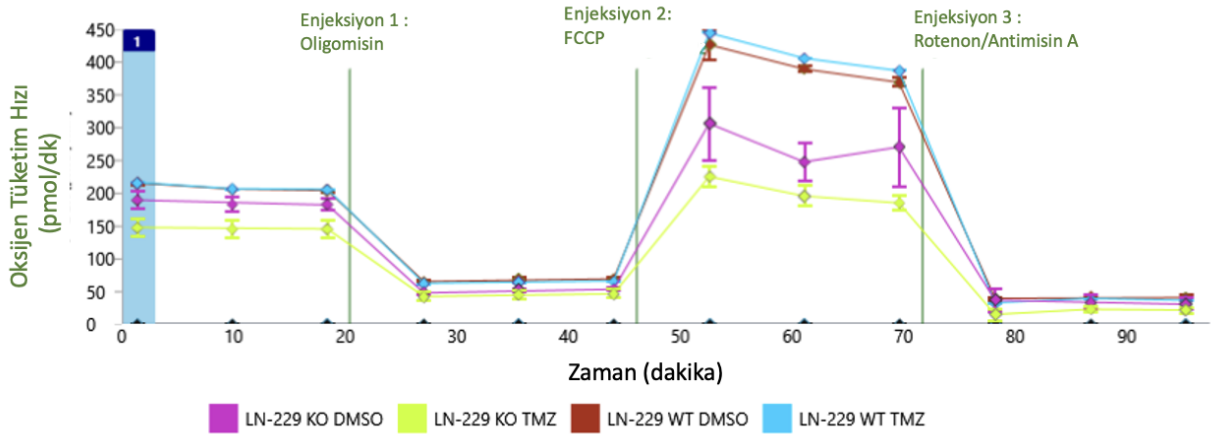
Çalışmamızda, ATG5 KO/KD hücrelerde kemoterapi etkisi ile değişen oksijen tüketim oranı Seahorse yöntemi ile analiz edildi. ATG5 KO SF-188 ve LN-229 glioma hücre hattında; bazal ve maksimum solunum kapasitesinin belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil-19-20). Bu fark pediatrik hücre hatlarında erişkine kıyasla daha belirgin olarak ortaya konuldu. Temozolomid muamelesi

sonrasında ise ATG5 WT SF-188 hücrelerinde oksijen tüketim hızında belirgin bir artış gözlenirken, ATG5 KO SF-188 hücrelerinde, temozolomid uygulaması sonrası belirgin bir fark gözlenmedi (Şekil-19).

Şekil-19: Pediatrik Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Metabolizma Düzeyinde Oluşan Değişiklikler



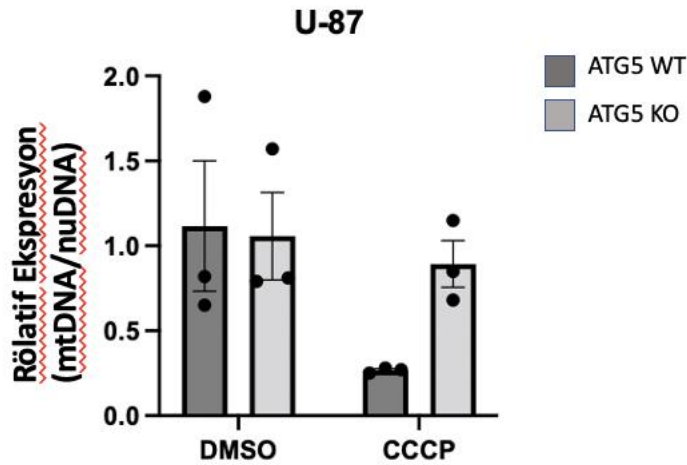
Şekil-20: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Metabolizma Düzeyinde Oluşan Değişiklikler



Oksidatif fosforilasyonun merkezi olan mitokondrilerin organel olarak sağlıklı kalabilmesi ve bozuk mitokondrilerin temizlenebilmesi için otofajinin temel rol oynadığı bilinmektedir ve bu

mekanizmaya mitofaji adı verilmektedir. Glioma hücrelerinde gözlemlediğimiz otofajik aktivitenin mitokondrilerin temizlenmesinde rol oynadığını teyit etmek amacı ile hücreler bir mitofaji uyaranı olan CCCP ile muamele edildi. Mitokondriyal DNA (mt-DNA) ve çekirdek genomic DNA (n-DNA) oranları, qPCR yöntemi ile karşılaştırıldı (Şekil-21). CCCP muamelesi sonrasında mitokondriyal DNA miktarının azaldığı gösterildi. Gözlemlerimizin otofajiye bağlı olduğunu ispatlamak amacı ile benzer deneyler ATG5 KO hücrelerde de yapıldı ve gözlenen mitokondriyal DNA azalmasının mitofajiye bağlı olduğu ispatlandı (p:0.001), (Şekil-21).

Şekil-21: Erişkin Glial Tümör Hücrelerinin Otofaji İnhibisyonu Yapıldığında Mitokondriyal DNA Düzeyinde Oluşan Değişiklikler



TARTIŞMA

Çalışmamızda pediatrik ve erişkin yüksek dereceli glioma, ikişer hücre hattında modellenerek, tümör hücrelerinin kemoterapi yanıtları, infiltrasyon ve metabolizma özellikleri otofaji açısından karşılaştırmalı olarak ortaya konuldu. Model olarak çocuk tümör hücresi için 8 yaşındaki bir hastanın temporal lob yüksek dereceli glial tümörü olan SF-188 ve DIPG olan SF-8628 kullanılırken, erişkin yüksek dereceli glioma örnekleri için, 44 ve 60 yaşlarındaki hastalara ait olan U-87 ve LN-229 hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarında birbirlerinden farklı davranış şekillerini belirleyen, kendilerine özgü farklı moleküler değişiklikler bulunmaktadır. SF-188 hücreleri, yüksek proliferasyon özelliklerini açıklayan *MYC* gen amplifikasyonu, ilaç direnci ile ilişkili CD133 pozitifliği, *p53* ile *RTK/PI3K/AKT* yollarında bozulmaya neden olan *NF1* delesyonu ve *CCND1* ve *CDK4* genetik değişikliklerini içerir. SF-8628 hücreleri sınıflandırmada belirleyici olan H3.3 K27M pozitifliği ve EZHIP seviyesinde artış ile karakterizedir. Her iki erişkin tümör hücresi *IDH* negatif olup, LN-229 hücreleri *TP53* ve *CDKN2A* moleküler değişikliklerini içerirken U-87 *PTEN WT* dır.

Otofaji aktivasyonu bazal koşullarda, tümör mikroçevresi stres koşullarında ve kemoterapi altında hem erişkin hem çocuk yüksek dereceli glial tümör hücrelerinde karşılaştırmalı olarak incelendi. Otofaji aktivasyonu için açlık koşulları oluşturuldu ve mTOR inhibitörü kullanıldı ve açlık koşullarını takiben lizozom inhibitörü klorokin uygulaması yapılarak aktivasyonu tekrardan analiz edildi. Tüm uygulamalarda çocuk ve erişkin glioma hücre hatlarında otofaji aktivasyon belirteci olan lipide LC3 (LC3-II) seviyesinin artmış olduğu gösterildi (Şekil-1). Çocuk tümör hücrelerinde ise bu aktivasyon artışı erişkine göre çok daha yüksek olarak saptandı; bu sonuçla çocuk glial tümör hücrelerinin otofaji modülasyonuna hassasiyeti konusunda ilk dikkat çekici veri oluşturuldu. Yine aynı koşullar sağlanarak bu sefer qPCR ile yapılan analizlerde otofaji ilişkili protein seviyelerindeki değişikliklerin post-

translasyonel değişikliklere bağlı olduğuna işaret eden sonuçlar gösterildi. Kemoterapinin tümör hücresinde yarattığı otofajik modülasyonu ortaya çıkarmak açısından, artan dozlarda verilen temozolomid ve vinkristin ile aynı yönde artan yoğun otofaji aktivasyonu gözlendi. Protein analizi ile ortaya konan bu aktivasyonun yine pediatrik tümör hücrelerinde daha yoğun olduğu konusunda dikkati çekildi. Özetle; pediatrik tümör hücrelerinde hem bazal hem stress koşullarında hem de kemoterapinin artan dozları ile doğru oranda artan, yüksek otofaji aktivasyonu ortaya konuldu. Bu tümör hücrelerinin otofaji modülasyonuna ne kadar açık olduğuna ve tedavi direnci ile ilişkili artan otofaji aktivasyonu olabileceğine dikkat çekmektedir.

Bu sonuçlarımızı destekleyen birçok literatür verisi bulunmaktadır. Yapılan hayvan deneylerinde otofaji aktivasyonunun GBM oluşumu için gerekli olduğu ve apoptoza oldukça dirençli olan gliom hücrelerini ldrebilmek için otofaji aktivasyonun stimlatrler ile tetiklenmesinin hücre ölümüne alternatif bir yol olduğu öne srlmřtr²¹⁹. Henüz tedavi verilmemiş 20 pediatrik yüksek dereceli glial tümör örneğinin otofaji açısından yapılan incelemesinde immunohistokimyasal analizler dokuların otofaji aktivasyonunun göstergesi olan Beklin 1 ve LC-3 proteinlerinden, kontrol dokulara kıyasla oldukça zengin olduğunu ortaya konulmuřtur²²⁰. Hipoksik koşullar altında ise erişkin gliom hücrelerinde artan otofaji aktivasyonu ve buna paralel olarak tümör hücre sağ kalımının arttığı gsterilmiřtir²²¹. Otofaji yolağını baskılayan bir ajan olarak tanımlanan, RAB13 inhibitörünün düşük dereceli gliomlarda tümör hücrelerinin ölümünü artırdığı gsterilmiřtir²²². Çocukluk ağı MSS tümörlerinde kritik bir moleküler değişiklik olan BRAF (V600E) mutasyonunu taşıyan gliomlarda yapılan bir çalışmada otofaji inhibitörü olan klorokinin tümör hücrelerinin yaşam ömrünü kısalttığı gsterilmiřtir²²³. Diğer bir otofaji modlatr olan salinomisin, otofaji üzerinden ROS birikimini indüklediği ve GBM hücrelerinin ölümüne neden olduğu gsterilmiřtir²²⁴. Tüm bu verilerin yanısıra tümörlerde otofaji aktivasyonunun otofajik hücre ölümü sayesinde anti-tümör etki gösterebildiğine dair bazı çalışmalar da

mevcuttur²²⁵⁻²³¹. Bütün bu veriler ile otofajinin kanser hücrelerinde belli bir düzeyde tutulması gerektiğine ve bu düzeyden sapmaların, tümör hücresinin hayatta kalımını etkilediğine işaret edilmiştir. Tüm bu bilgiler ve kendi sonuçlarımız bir araya geldiğinde, yüksek dereceli glial tümörlerde otofaji aktivasyonunun yüksek olduğu ve tedavide özellikle otofaji yolağının inhibisyonuna özgü seçimlerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yüksek dereceli glial tümörlerin tedavi sürecinde, en önemli sorunlardan biri kemoterapi direncidir. Konvansiyonel kemoterapi seçenekleri kısıtlı olup, siklofosfamid, platin grubu ilaçlar, etoposid, vinkristin ve temozolomid en sık kullanılan ajanlardır. Ancak, pediatrik yüksek dereceli glial tümörler, mevcut kemoterapi seçeneklerinin tümüne oldukça dirençlidir. Bizim çalışmamızda, oluşturduğumuz tümör modellerinde genel anlamda kemoterapi direnci ile karşılaştırılmıştır. Siklofosfamid ve temozolomid ajanlarına tüm hücre yanıtlarında belirgin bir direnç gözlenirken, etoposid uygulamasına erişkin tümör modelinde anlamlı derecede ölüm yanıtı gözlenmiştir. Pediatrik tümör modellerinde ise vinkristin ve karboplatin tedavilerine yüksek oranda hassasiyet ortaya çıkarıldı. Vinkristin uygulaması sonrası K27M pozitif, SF-8628 hücreleri %40 civarında ölürken, K27M negatif, SF-188 hücrelerinde %90'a varan ölüm oranı gözlemlendi. Bu sonuçlar, sınıflandırma ve tanıda önemi ortaya konan K27M mutasyonunun, tedavi yanıtları konusunda da belirleyici olabileceğine dikkat çekmektedir. Pediatrik glial tümör modellemelerinin farklı moleküler değişiklikler zemininde oluşturulup, tedavi yanıtlarını incelemek, özgün tedavi olanaklarının geliştirilmesi ve mevcut tedaviler arasında ideal olanın seçilmesi açısından oldukça önemlidir.

Önceki deneylerimizde, özellikle pediatrik olmak üzere glioma hücrelerinde gözlemlediğimiz yoğun otofaji aktivasyonu doğrultusunda; otofaji inhibisyonu yapan klorokin hücre ölümüne etkisi; konvansiyonel kemoterapiler ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Erişkin tümör hücrelerini

kemoterapilere kıyasla belirgin olarak daha fazla öldürebilen klorokin, pediatrik tümör hücrelerinde farklı etkiler açığa çıkardığı gösterilmiştir. K27M negatif SF-188 hücrelerinde klorokin muamelesi sonrası ölüm gözlenmezken, K27M pozitif SF-8628 hücrelerinde artan dozlarda belirgin hassasiyet gözlenildi. Klorokin tek başına SF-188 hücrelerini öldürmezken, kemoterapilerle kombinasyon halinde verildiğinde, klorokin vinkristin toksisitesini arttırdığı gözlemlendi. Otofaji aktivasyonunu arttırdığını daha önce ortaya koyduğumuz vinkristin ajanının otofaji inhibitörü, klorokin ile kombinasyonu sonucu öldürdüğü hücre oranının artması birbirini destekleyici veriler olarak ortaya konmuştur.

Hem klorokin adjuvan etkisinin otofaji baskılayıcı etkisi üzerinden olduğunu teyit etmek hem de hücre içine salınmasına neden olduğu lizozomal enzimlerin yan etkilerini dışlamak amacı ile oluşturulan KO ve KD modelleri üzerinden yapılan deneylerde; K27M pozitif SF-8628 hücrelerinde ATG5 KO modellemesinin letal olduğu görüldü ve bu nedenle aynı hücre hattına KD protokolü uygulandı. Sonuç olarak, otofaji inhibitörü olan klorokine belirgin hücre ölümü yanıtı veren K27M pozitif SF-8628 hücrelerinde, otofajinin moleküler baskılanmasının da ölümle sonuçlanması birbirini desteklemektedir. Bu nedenle, K27M pozitif hücrelerin otofaji inhibisyon hassasiyeti alternatif hedef tedavi modaliteleri geliştirilmesi açısından oldukça dikkat çekicidir.

Daha önceki deneylerde otofaji aktivasyonunu arttırdığını gösterdiğimiz vinkristin ajanının pediatrik glioma *ATG5 KO* hücrelerinde, *ATG5 WT* hücrelere kıyasla, hücre ölümünü belirgin şekilde arttırması; pediatrik glioma hücrelerindeki vinkristin otofaji ilişkisine bir kez daha dikkat çekilmesini sağlamıştır. Tüm bu sonuçlar pediatrik yüksek dereceli glial tümör hücrelerinde bazal ve kemoterapi sonrası indüklenmiş yüksek otofaji aktivasyonunu ortaya koymasının yanısıra; otofaji inhibisyonunun bu tümör hücreleri için adjuvant bir tedavi seçeneği olabileceğine dikkat çekilmektedir. Anlamlı fark yaratan sonuçları ile vinkristin tedavisi bu kombinasyon için en ideal konvansiyonel kemoterapi ajanı

olarak görülmektedir. Hem otofaji modülasyonu ile artan yanıtı hem kendisinin tümör hücresinde açığa çıkardığı otofaji aktivasyonu ile, bu ajan kombinasyon çalışmaları için önemli bir hedef olarak gözükmektedir.

Kemoterapi direncinde otofajinin de rol aldığını ve otofaji modülasyonunun tümör hücrelerinin ölümünü arttırabildiğini gösteren sonuçlarımıza benzer veriler literatürde de yer almaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, otofaji modülasyonunun, temozolomid direncini kırarak antikanser etkiyi artırdığı^{232,233}, otofaji indüksiyonuna neden olan miR-519a'nın GBM hücrelerinde temozolomid sensivitesini arttırdığı²³⁴ ve temozolomid tedavisinin selektif otofaji inhibisyonu ile apoptozu tetikleyerek tümör hücrelerinin ölümüne yol açtığı gösterilmiştir²³⁵. Diğer yandan, GBM'de otofaji inhibisyonunun kemoterapi etkisini arttırabildiği ve otofaji inhibitörü klorokin, VEGF reseptör inhibitörü ve STAT3 inhibitörü ile kombinasyonunun hücre ölümünü arttırdığını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur²³⁶⁻²³⁹. Ayrıca açlık gibi otofaji aktivasyonunun arttığı durumlarda, GBM hücrelerinin yaşam süresinin uzadığı ve otofaji inhibisyonunun hücre ölümünü artırarak kemoterapötiklere duyarlılığı artırdığı da gösterilmiştir^{240,241}.

Çocukluk çağı MSS tümörleri, endotelyal mezenkimal dönüşüm ile invazyon özelliği kazanabilir. Bu kazanım sonrasında normal beyin dokusuna infiltre olarak cerrahi yaklaşımı inkansız kılabilirler. Hastaların morbidite ve mortalitesinde tümörün lokalizasyonu kadar hücrelerin infiltrasyon potansiyeli de önemlidir. Çalışmamızda hem erişkin hem de çocuk yüksek dereceli glial tümör hücrelerinin infiltrasyon özelliği (göç ve invazyonu), otofaji açısından çok yönlü olarak ortaya konulmuştur. Çalışmamızda, otofaji aktivasyonunun olmadığı *ATG5 KO* erişkin tümör hücrelerinde, *ATG5 WT* hücrelere kıyasla; hücre göçü ve invazyonunda farklılık saptanmazken, pediatrik tümör hücrelerinde hem *ATG5* geninin genetik olarak KO edildiği durumda, hemde otofajinin klorokin ile inhibisyonu

sonucunda hücrelerin infiltrasyon özelliğinin belirgin olarak baskılandığı ortaya konuldu. Hücre hareketindeki bu etki, üç boyutlu *ATG5 KO/KD* tümör hücrelerinde belirgin şekilde azalan ayakçıkların görsel olarak tespit edilmesi ile de teyit edildi. Literatürde sonuçlarımıza benzer şekilde otofajinin glial tümörlerde infiltrasyonu tetikleyen bir mekanizma olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır^{242,243}.

Tümör hücrelerinin göçü ve invazyonunda kök hücre belirteçlerinin de etkisi olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak, çalışmamızda, otofajinin glial kök hücre belirteçleri üzerindeki etkisi de incelendi. Tümör hücrelerinin farklılaşması ve infiltrasyonunda önemi gösterilmiş olan belirteçlerin çoğunda ofotaji inhibisyonu ile belirli seviyede artış saptansa da istatistiksel olarak anlamlı artış *SNAI2* ve *MUS1* seviyelerinde gösterildi. Literature bakıldığında, GBM'e ait in-vitro çalışmalarda otofajinin *SNAI2* ailesine ait proteinlerin degradasyonu sonucu N-cadherin seviyesini arttırdığı ve buna bağlı olarak tümör hücre invazyonunun arttığı gösterilmiştir^{244,245}. Tüm bunların yanı sıra, otofaji yolağının tümör hücrelerinin ekstraselüler matriksten koparak metastazını kolaylaştıran etkisi gösterilmiştir²⁴⁶. Metastazın geç bsamaklarında tümör hücrelerinin yaşamaya devam etmesi, çevresel ve metabolik stres koşullarına dirençli olabilmesi için otofaji aktivasyonuna ihtiyaç duyduğu ortaya konulmuştur²⁴⁷.

Çocukluk çağının diğer MSS tümörlerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, medulloblastom ve ependimom hücrelerinde kanabinoid ve türevlerinin ROS üretimi ile otofajiyi indüklediği ve hücre siklusunu durdurabildiği gösterilmiştir²⁴⁸. Medulloblastom grup-3 ve grup-4 alt tiplerine ait hücre hatlarında yapılan bir çalışmada shRNA aracılı *ATG5* ekspresyonunda azalmanın hücrelerin invazyon potansiyellerinde belirgin bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir¹⁵. Yine medulloblastom ile yürütülen başka bir çalışmada, pro-otofajik faktör *AMBRA1*'in grup-3 altı tipinde kötü prognozla ilişkili olduğu ve *AMBRA1* ekspresyonundaki azalmanın tümör hücresinin kök hücre, büyüme ve invazyon

davranışlarını baskıladığı gösterilmiştir¹⁶¹. Medulloblastom hücre hatlarında azalmış Beklin 1/ATG5 seviyesinin artmış hücre ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁴⁶. Ependimom hayvan modellerinde rapamisin ile mTOR inhibisyonunun tümör boyutunda belirgin küçülme yarattığı gösterilmiştir¹⁶⁹.

Çocuklarda glial hücre metabolizmasının prognoz ve tedavi yönetimindeki yeri henüz bilinmemektedir ancak erişkinlerde bu konunun önemi, yapılan çalışmalar ile kapsamlı bir şekilde açığa çıkarılmıştır. Erişkin yüksek dereceli glial tümörlerde, metabolizma ilişkili moleküler değişiklikler sınıflandırma ve prognoz açısından ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur. ‘İzositrat dehidrogenaz’ (IDH) enzimi ilişkili moleküler değişiklikler bu tanımlamaların başında gelmektedir. IDH enzimi krebs siklusunda yer alır,ve NADP+ bağımlı enzimleri regüle eder. IDH mutasyonu enzimlerin katalitik fonksiyonlarını belirgin olarak etkiler ve hücre içi enerji metabolizmasında değişiklikler ortaya konulmuştur. IDH mutasyonu taşıyan tümör hücrelerinde fizyolojik izositrat seviyelerine duyarlı hale geldiği ve oksidatif reaksiyon kapasitesi %80’den fazla; NADPH üretimi ise %38 civarında azaldığı gösterilmiştir. Bu onkogenik sinyal glikolitik enzim aktivitesini dolaylısı ile glikolizi indüklemektedir. Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasında; *O⁶-metilguanin-DNA metiltransferaz* (MGMT) metilasyon durumu prognostik olan, en agresif tip olan *IDH WT* difüz astrositomlar ‘GBM’ olarak tanımlanır ve derece 4’e tekabül etmektedir^{249–251}. Pediatrik yüksek dereceli gliomalarda ise sağlıklı beyin dokusuna kıyasla metabolik farklılıklar olduğu bilinse de bunların zeminindeki yollar açıklığa kavuşturulamamıştır. Pediatrik yüksek dereceli gliomalarda mitokondriyal DNA sayısındaki azlığı ve yüksek aerobik glikoliz seviyesi tümörojenite, infiltrasyon ve tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir²⁵². Ancak bu konuda net ilişkilerin ortaya konulabilmesi adına daha çok veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Bizim çalışmamızda ise pediatrik tümör hücrelerinin metabolizması, otofaji bağlamında erişkin tümör hücreleri ile karşılaştırmalı olarak ortaya konulmuştur. *ATG5 KO* pediatrik ve erişkin tümör

hücrelerinde (pediatrik hücre hatlarında çok daha belirgin olmak üzere), mitokondrial oksidatif fosforilasyon bağımlı oksijen tüketim hızının baskılandığı gösterildi. Yine aynı hücre tiplerinin temozolomid verilmesi sonrası enerji metabolizması incelendiğinde, temozolomid verilen tümör hücrelerinin verilmeyen hücrelere göre oksidatif fosforilasyon bağımlı oksijen tüketim hızının daha yüksek olduğu ancak yine de enerji metabolizmasının *KO* hücrelerde temozolomid sonrası dahi belirgin olarak baskılanmış olduğu tespit edildi. Metabolizmadaki bu belirgin baskılanma gözlemimiz; SF-8628 hücrelerinde *ATG5* gen çıkarımının letal olması ile uyumlu olarak değerlendirilebilir. SF-8628 hücreleri için *ATG5* gen çıkarımının hücre ölümü ile sonuçlanması ve SF-188 hücrelerinde bu baskılanmanın, metabolizmada enerji tüketimini oldukça bazale indirgemesi birbirlerini destekleyici sonuçlar olup, otofaji geni olan *ATG5*'in çocuk yüksek dereceli glial tümörlerde hayati bir önem taşıdığına işaret etmektedir. Bu veriler hem literatürde ilk hem de çarpıcı seviyede anlamlı olması nedeni ile oldukça önem teşkil etmektedir.

Çalışmamızda, otofaji inhibisyonun metabolizma üzerindeki bu baskılayıcı etkisinin mitofaji üzerinden mi olduğunu gözlemlemek adına, CCCP uygulaması sonrası ATG WT/*KO* tümör hücrelerindeki mitokondri sayısı değerlendirildi. Otofaji inhibisyonunun oksidatif fosforilasyon kapasitesini belirgin olarak değiştirmesinin yanı sıra hücrelerdeki mitokondri kalitesini de değiştirdiği ortaya konuldu. Tüm bu sonuçlar otofaji ve mitofajinin tümör hücrelerinin metabolizması üzerinde belirgin değişikliğe yol açtığına dikkat çekmekte olup; otofaji yolağının yanısıra mitokondrinde de hastalarda tedavi hedefi olarak değerlendirmesi açısından önemlidir. Mitofaji modülasyonunun erişkin glial tümörlerde metabolizma değişikliğine yol açtığını gösteren oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır^{253,254}, çocuklarda ise bu konuda literatürde gösterilmiş bir sonuç yer almamaktadır.

Klinik çalışmalarda otofaji inhibitörleri ve indükleyicileri monoterapi veya tirozin kinaz inhibitörleri (EGFR, PDGR, VEGFR, EGFR/PI3K/AKT) ile kombinasyon tedavisi olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak, hastaların yaşam süresi başta uzamış olarak gözüktüğü de çoğu tümör daha yüksek migrasyon ve invazyon kapasitesi ile tedavilere dirençli olarak rekürrens göstermiştir. Bu yüzden otofajinin tümör hücresi yaşamındaki pozitif veya negatif etkisi halen tartışmalıdır ve bu konunun açığa çıkması için tümör tiplerinin epigenetik, moleküler özellikleri, mikroçevresinin heterojenitesi ve lokalizasyonu göz önünde bulundurularak çalışmaların daha derin incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır¹⁸³

Güncel olarak otofaji modülasyonu yapan ilaçlarla yürütülen az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Hidroksiklorokin, dabrafenib kombinasyonu (NCT04201457), everolimus (NCT00187174), everolimus ve lenvatinib kombinasyonu (NCT03245151), ve temsirolimus ile valproik asid kombinasyonu (NCT01204450) otofaji modülasyonu yaparak çocukluk çağı MSS tümörlerinin tedavisinde çalışılan ajanlardır, ancak bu konuda net etkinin belirlenebilmesi için daha çok veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Bizim çalışmamız ile ortaya konulan; ofajinin pediatrik yüksek dereceli glial tümör hücrelerinde kemoterapi yanıtı, invazyon, hücre göçü ve metabolizmadaki belirgin etkisi, çoğu tedavi seçeneklerine yanıtı olmayan bu tümörlerde, otofajinin terapötik bir hedef olarak değerlendirilmesi gerektiğine dikkat çekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pediatrik yüksek dereceli glial tümörler, yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize, mevcut tedavi seçeneklerine dirençli ve hastaların kaybedilmesi ile sonuçlanan kötü prognozlu kanserlerdir. Son

yıllarda hastaya özgü doğru tanısal yaklaşım ve prognozun değerlendirilmesi açısından çok önemli moleküler çalışmalar yapılmış ve çarpıcı değişiklikler yaşanmıştır. Ancak tedavi anlamında halen hastaların yaşam süresini uzatacak ve prognozunu iyileştirecek etkin tedavi seçenekleri bulunmamaktadır.

Pediyatrik tümör hücrelerinin otofaji modülasyonuna daha açık olması ve yolak aktivasyonunun tedavi direnci ile güçlü ilişkisi, otofaji inhibisyonu sonucu artan vinkristin hassasiyeti, infiltrasyonun ve metabolizmanın baskılanması; verilerinin tümü yolağın bir tedavi hedefi olarak değerlendirilmesi açısından çok önemlidir. Sonuçlar otofaji ve mitofaji inhibisyonu sağlayan bir tedavi ajanı ile hastalarda relaps olasılıklarının azalması ve tedaviye daha iyi yanıt alınabilmesi açısından umut vadecidir. Otofaji inhibisyonu sağlayan hedef tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hashizume R, Andor N, Ihara Y, et al. HHS Public Access. 2015;20(12):1394-1396.
doi:10.1038/nm.3716.Pharmacologic
2. Kebudi R. Pediatric oncology in Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34(SUPPL. 1):12-14.
doi:10.1097/MPH.0b013e318249aaac
3. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):719-731.
doi:10.1016/S1470-2045(17)30186-9
4. Hegi ME, Murat A, Lambiv WL, Stupp R. Brain tumors: Molecular biology and targeted therapies. *Ann Oncol*. 2006;17(SUPPL. 10):x191-x197. doi:10.1093/annonc/mdl259
5. Wells EM, Packer RJ. Pediatric brain tumors. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2015;21(2):373-396.

doi:10.1212/01.CON.0000464176.96311.d1

6. Magrath I, Steliarova-Foucher E, Epelman S, et al. Paediatric cancer in low-income and middle-income countries. *Lancet Oncol.* 2013;14(3):e104-e116. doi:10.1016/S1470-2045(13)70008-1
7. Barone G, Maurizi P, Tamburrini G, Riccardi R. Role of temozolomide in pediatric brain tumors. *Child's Nerv Syst.* 2006;22(7):652-661. doi:10.1007/s00381-006-0081-z
8. Riaz Q, Naeem E, Fadool Z, Lohano M, Mushtaq N. Intracranial tumors in children: a 10-year review from a single tertiary health-care center. *Child's Nerv Syst.* 2019;35(12):2347-2353. doi:10.1007/s00381-019-04260-7
9. Perla A, Fratini L, Cardoso PS, et al. Histone Deacetylase Inhibitors in Pediatric Brain Cancers: Biological Activities and Therapeutic Potential. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(July):1-14. doi:10.3389/fcell.2020.00546
10. Rogers HA, Estranero J, Gudka K, Grundy RG. The therapeutic potential of targeting the PI3K pathway in pediatric brain tumors. *Oncotarget.* 2017;8(2):2083-2095. doi:10.18632/oncotarget.13781
11. Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):94-101. doi:10.1038/s41556-018-0249-2
12. Hu F, Song D, Yan Y, et al. IL-6 regulates autophagy and chemotherapy resistance by promoting BECN1 phosphorylation. *Nat Commun.* 2021;12(1):1-14. doi:10.1038/s41467-021-23923-1
13. Levy JMM, Zahedi S, Griesinger AM, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *Elife.* 2017;6:1-24. doi:10.7554/eLife.19671
14. Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, et al. The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene.* 2013;32(6):699-712.

doi:10.1038/onc.2012.111

15. Paul R, Bharambe H, Shirsat NV. Autophagy inhibition impairs the invasion potential of medulloblastoma cells. *Mol Biol Rep.* 2020;47(7):5673-5680. doi:10.1007/s11033-020-05603-3
16. Kaza N, Kohli L, Roth KA. Autophagy in brain tumors: A new target for therapeutic intervention. *Brain Pathol.* 2012;22(1):89-98. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00544.x
17. Stevens M. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* Vol 65.; 1990.
doi:10.1136/adc.65.5.563-a
18. Kutluk MT, Yeşilipek A. Pediatric Cancer Registry in Turkey 2009-2021 (TPOG & TPHD). *J Clin Oncol.* 2022;40(16_suppl):e22020-e22020. doi:10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e22020
19. CBTRUS. Central Brain Tumor Registry of the United States (2004-2007). *Cbtrus.* 2011;(February):3831.
20. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol.* 2013;15(SUPPL.2). doi:10.1093/neuonc/not151
21. Hulsebos TJM, Plomp AS, Wolterman RA, Robanus-Maandag EC, Baas F, Wesseling P. Germline mutation of INI1/SMARCB1 in familial schwannomatosis. *Am J Hum Genet.* 2007;80(4):805-810. doi:10.1086/513207
22. Roach ES, Walsh T. Intracranial neoplasms in children. *Am Fam Physician.* 1986;33(2):243-253.
23. Connelly JM, Malkin MG. Environmental risk factors for brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007;7(3):208-214. doi:10.1007/s11910-007-0032-4
24. Khafaga Y, Hassounah M, Kandil A, et al. Optic gliomas: A retrospective analysis of 50 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56(3):807-812. doi:10.1016/S0360-3016(02)04512-1
25. Honig PJ, Charney EB. Children With Brain Tumor Headaches: Distinguishing Features. *Am J*

- Dis Child.* 1982;136(2):121-124. doi:10.1001/archpedi.1982.03970380033008
26. Gilard V, Tebani A, Dabaj I, et al. Diagnosis and management of glioblastoma: A comprehensive perspective. *J Pers Med.* 2021;11(4). doi:10.3390/jpm11040258
 27. Goldman RD, Cheng S, Cochrane DD. Improving diagnosis of pediatric central nervous system tumours: Aiming for early detection. *Cmaj.* 2017;189(12):E459-E463. doi:10.1503/cmaj.160074
 28. Agaoglu FY, Ayan I, Dizdar Y, Kebudi R, Gorgun O, Darendeliler E. Ependymal tumors in childhood. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;45(3):298-303. doi:10.1002/pbc.20212
 29. Dang M, Phillips PC. Pediatric Brain Tumors. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2017;23(6, Neuro-oncology):1727-1757. doi:10.1212/CON.0000000000000545
 30. Tsai ML, Chen CL, Hsieh KLC, et al. Seizure characteristics are related to tumor pathology in children with brain tumors. *Epilepsy Res.* 2018;147:15-21. doi:10.1016/j.eplepsyres.2018.08.007
 31. Sánchez Fernández I, Gaínza-Lein M, Abend NS, et al. Factors associated with treatment delays in pediatric refractory convulsive status epilepticus. *Neurology.* 2018;90(19):E1692-E1701. doi:10.1212/WNL.00000000000005488
 32. Wessling C, Bartels S, Sassen R, Schoene-Bake JC, von Lehe M. Brain tumors in children with refractory seizures—a long-term follow-up study after epilepsy surgery. *Child's Nerv Syst.* 2015;31(9):1471-1477. doi:10.1007/s00381-015-2825-0
 33. Lamba N, Wen PY, Aizer AA. Epidemiology of brain metastases and leptomeningeal disease. *Neuro Oncol.* 2021;23(9):1447-1456. doi:10.1093/neuonc/noab101
 34. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
 35. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria

and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2020;139(3):603-608.
doi:10.1007/s00401-020-02127-9

36. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathol.* 2018;136(5):805-810. doi:10.1007/s00401-018-1913-0
37. Louis DN, Wesseling P, Paulus W, et al. cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC). *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):481-484.
doi:10.1007/s00401-018-1808-0
38. Louis DN, Giannini C, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol.* 2018;135(4):639-642. doi:10.1007/s00401-018-1826-y
39. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF V600E mutation. *Acta Neuropathol.* 2019;137(4):683-687. doi:10.1007/s00401-019-01987-0
40. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2020;30(4):844-856. doi:10.1111/bpa.12832
41. Ellison DW, Aldape KD, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol.* 2020;30(5):863-866. doi:10.1111/bpa.12866
42. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106
43. Ryall S, Tabori U, Hawkins C. Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):1-22. doi:10.1186/s40478-020-00902-z

44. Chan KM, Fang D, Gan H, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 2013;27(9):985-990.
doi:10.1101/gad.217778.113
45. Ryall S, Zapotocky M, Fukuoka K, et al. Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas. *Cancer Cell.* 2020;37(4):569-583.e5.
doi:10.1016/j.ccell.2020.03.011
46. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-450. doi:10.1038/ng.2938
47. Jain SU, Do TJ, Lund PJ, et al. PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-09981-6
48. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 2012;124(3):439-447. doi:10.1007/s00401-012-0998-0
49. Korshunov A, Capper D, Reuss D, et al. Histologically distinct neuroepithelial tumors with histone 3 G34 mutation are molecularly similar and comprise a single nosologic entity. *Acta Neuropathol.* 2016;131(1):137-146. doi:10.1007/s00401-015-1493-1
50. Shantanam S, MUELLER. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139-148. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1030.Infant
51. Guerreiro Stucklin AS, Ryall S, Fukuoka K, et al. Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-13. doi:10.1038/s41467-019-12187-5
52. Korshunov A, Schrimpf D, Ryzhova M, et al. H3-/IDH-wild type pediatric glioblastoma is

comprised of molecularly and prognostically distinct subtypes with associated oncogenic drivers. *Acta Neuropathol.* 2017;134(3):507-516. doi:10.1007/s00401-017-1710-1

53. Sievers P, Sill M, Schrimpf D, et al. A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of EGFR. *Neuro Oncol.* 2021;23(1):34-43. doi:10.1093/neuonc/noaa251
54. Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014;24(5):429-435. doi:10.1111/bpa.12171
55. Clarke M, Mackay A, Ismer B, et al. Infant high-grade gliomas comprise multiple subgroups characterized by novel targetable gene fusions and favorable outcomes. *Cancer Discov.* 2020;10(7):942-963. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1030
56. Di Ruscio V, Carai A, Del Baldo G, et al. Molecular Landscape in Infant High-Grade Gliomas: A Single Center Experience. *Diagnostics.* 2022;12(2):1-16. doi:10.3390/diagnostics12020372
57. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(9):878-887. doi:10.1097/NEN.0b013e3181845622
58. Ding C, Tihan T. Recent progress in the pathology and genetics of pilocytic and pilomyxoid astrocytomas. *Balkan Med J.* 2019;36(1):3-11. doi:10.4274/balkanmedj.2018.1001
59. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008;68(21):8673-8677. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2097
60. Kulac I, Tihan T. Pilomyxoid astrocytomas: a short review. *Brain Tumor Pathol.* 2019;36(2):52-55. doi:10.1007/s10014-019-00343-0

61. Yeo YH, Byrne NP, Counelis GJ, Perry A. Adult with cerebellar anaplastic pilocytic astrocytoma associated with BRAF v600e mutation and p16 loss. *Clin Neuropathol*. 2013;32(3):159-164. doi:10.5414/NP300564
62. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Burger PC, Jenkins S, Giannini C. Anaplasia in pilocytic astrocytoma predicts aggressive behavior. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(2):147-160. doi:10.1097/PAS.0b013e3181c75238
63. Gareton A, Tauziède-Espariat A, Dangouloff-Ros V, et al. The histomolecular criteria established for adult anaplastic pilocytic astrocytoma are not applicable to the pediatric population. *Acta Neuropathol*. 2020;139(2):287-303. doi:10.1007/s00401-019-02088-8
64. Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: Reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. *J Negat Results Biomed*. 2011;10(1):1-13. doi:10.1186/1477-5751-10-7
65. Vera-Bolanos E, Aldape K, Yuan Y, et al. Clinical course and progression-free survival of adult intracranial and spinal ependymoma patients. *Neuro Oncol*. 2015;17(3):440-447. doi:10.1093/neuonc/nou162
66. Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):958-971. doi:10.1016/S1470-2045(17)30243-7
67. Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Northcott PA. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):42-56. doi:10.1038/s41568-019-0223-8
68. Mynarek M, von Hoff K, Pietsch T, et al. Nonmetastatic medulloblastoma of early childhood: Results from the prospective clinical trial hit-2000 and an extended validation cohort. *J Clin*

Oncol. 2020;38(18):2028-2040. doi:10.1200/JCO.19.03057

69. Robinson GW, Gajjar A. Genomics paves the way for better infant medulloblastoma therapy. *J Clin Oncol.* 2020;38(18):2010-2013. doi:10.1200/JCO.20.00593
70. Louis DN, Ellison DW, Brat DJ, et al. cIMPACT-NOW: a practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol.* 2019;29(4):469-472. doi:10.1111/bpa.12732
71. Resende LL, Alves CAPF. Imaging of brain tumors in children: The basics—a narrative review. *Transl Pediatr.* 2021;10(4):1138-1168. doi:10.21037/TP-20-285
72. Yu S, He L, Zhuang X, Luo B. Pleomorphic xanthoastrocytoma: MR imaging findings in 19 patients. *Acta radiol.* 2011;52(2):223-228. doi:10.1258/ar.2010.100221
73. Yeom KW, Bouffet E, Fisher PG, et al. MRI Surrogates for Molecular Subgroups of Medulloblastoma. *Am J Neuroradiol.* 2014;35(7):1263.
<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.a3990>
%5Cnfile:///Unknown/MRI Surrogates for Molecular Subgroups of Medulloblastoma - 0.pdf%5Cnpapers3://publication/doi/10.3174/ajnr.A3990
74. Stock A, Mynarek M, Pietsch T, et al. Imaging characteristics of wingless pathway subgroup medulloblastomas: Results from the German HIT/SIOP-trial cohort. *Am J Neuroradiol.* 2019;40(11):1811-1817. doi:10.3174/ajnr.A6286
75. Lau CSM, Mahendraraj K, Chamberlain RS. Atypical teratoid rhabdoid tumors: A population-based clinical outcomes study involving 174 patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973–2010). *Cancer Manag Res.* 2015;7:301-309.
doi:10.2147/CMAR.S88561
76. Mangalore S, Aryan S, Prasad C, Santosh V. Imaging characteristics of supratentorial ependymomas: Study on a large single institutional cohort with histopathological correlation. *Asian J Neurosurg.* 2015;10(04):276-281. doi:10.4103/1793-5482.162702

77. Shantanam S, MUELLER. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139-148. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.002.Molecular
78. Napieralska A, Krzywon A, Mizia-malarz A, Sosna-zieli J. High-Grade Gliomas in Children—A Multi-Institutional Polish Study 3 ,. Published online 2021.
79. Packer RJ, Gajjar A, Vezina G, et al. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(25):4202-4208. doi:10.1200/JCO.2006.06.4980
80. Biterge Sut B. Somatic Missense Mutations of Histone Variant H3.3 in Central Nervous System Cancers. *Eur J Biol.* 2020;79(2):75-82. doi:10.26650/eurjbiol.2020.0019
81. Komotar RJ, Otten ML, Garrett MC, Anderson RCE. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone - A critical review. *Clin Med Oncol.* 2009;2009(3):13-14. doi:10.4137/cmo.s392
82. Lin FY, Chintagumpala M. Advances in Management of Pediatric Ependymomas. *Curr Oncol Rep.* 2015;17(10):1-7. doi:10.1007/s11912-015-0470-0
83. James H. Garvin Jr., 1 Michael T. Selch, 2 Emi Holmes, 3 Mitchell S. Berger, 4 Jonathan L. Finlay, 5* Ann Flannery, 6 Joel W. Goldwein, 7 Roger J. Packer, 8 Lucy B. Rorke-Adams, 9 Tania Shiminski-Maher, 10 Richard Sposto, 3, 11 Philip Stanley, 12 Raymond 13Ian F. Pollack14 and for the Children's Oncology Group. Phase II Study of Pre-Irradiation Chemotherapy for Childhood Intracranial Ependymoma. Children's Cancer Group Protocol 9942: A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.*
84. Wisoff JH, Sanford RA, Heier LA, et al. Primary neurosurgery for pediatric low-grade gliomas: A prospective multi-institutional study from the children's oncology group. *Neurosurgery.* 2011;68(6):1548-1554. doi:10.1227/NEU.0b013e318214a66e

85. Mishra KK, Squire S, Lamborn K, et al. Phase II TPDCV protocol for pediatric low-grade hypothalamic/chiasmatic gliomas: 15-Year update. *J Neurooncol.* 2010;100(1):121-127.
doi:10.1007/s11060-010-0151-7
86. Ater JL, Zhou T, Holmes E, et al. Randomized study of two chemotherapy regimens for treatment of low-grade glioma in young children: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2641-2647. doi:10.1200/JCO.2011.36.6054
87. Cherlow JM, Shaw DW, Margraf LR, et al. HHS Public Access. 2020;103(4):861-868.
doi:10.1016/j.ijrobp.2018.11.004.Conformal
88. Krueger DA, Care MM, Agricola K, Tudor C, Mays M, Franz DN. Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal giant cell astrocytoma. *Neurology.* 2013;80(6):574-580.
doi:10.1212/WNL.0b013e3182815428
89. Melchionda F, Oncology P, Spreafico F, et al. LETTER TO THE EDITOR A Novel WT1 Mutation in Familial Wilms Tumor. *Pediatr Blood Cancerfile:///Users/iremyenidogan/Desktop/garvin2012.pdf.* 2013;(February):1388-1389.
doi:10.1002/pbc
90. Banerjee A, Jakacki RI, Onar-Thomas A, et al. A phase i trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: A Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) study. *Neuro Oncol.* 2017;19(8):1135-1144.
doi:10.1093/neuonc/now282
91. Minniti G, De Sanctis V, Muni R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. *J Neurooncol.* 2008;88(1):97-103.
doi:10.1007/s11060-008-9538-0
92. Cohen KJ, Pollack IF, Zhou T, et al. Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in

children: A report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol.* 2011;13(3):317-323.
doi:10.1093/neuonc/noq191

93. Jakacki RI, Cohen KJ, Buxton A, et al. Phase 2 study of concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and lomustine in the treatment of children with high-grade glioma: A report of the Children's Oncology Group ACNS0423 study. *Neuro Oncol.* 2016;18(10):1442-1450. doi:10.1093/neuonc/nov038
94. Wick W, Brandes AA, Gorlia T, et al. NEURO-ONCOLOGY Abstracts. *Neuro Oncol.* Published online 2015:2015. doi:doi:10.1093/neuonc/nov061.154
95. Grill J, Massimino M, Bouffet E, et al. Phase II, open-label, randomized, multicenter trial (HERBY) of bevacizumab in pediatric patients with newly diagnosed high-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2018;36(10):951-958. doi:10.1200/JCO.2017.76.0611
96. Jennings MT, Sposto R, Boyett JM, et al. Preradiation chemotherapy in primary high-risk brainstem tumors: Phase II study CCG-9941 of the children's cancer group. *J Clin Oncol.* 2002;20(16):3431-3437. doi:10.1200/JCO.2002.04.109
97. Pollack IF, Stewart CF, Kocak M, et al. A phase II study of gefitinib and irradiation in children with newly diagnosed brainstem gliomas: A report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Neuro Oncol.* 2011;13(3):290-297. doi:10.1093/neuonc/noq199
98. Haas-Kogan DA, Banerjee A, Poussaint TY, et al. Phase II trial of tipifarnib and radiation in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol.* 2011;13(3):298-306. doi:10.1093/neuonc/noq202
99. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med.* 2015;21(6):555-559. doi:10.1038/nm.3855
100. Neth BJ, Balakrishnan SN, Carabenciov ID, et al. Panobinostat in adults with H3 K27M-mutant

diffuse midline glioma: a single-center experience. *J Neurooncol*. 2022;157(1):91-100.

doi:10.1007/s11060-022-03950-8

101. Chheda ZS, Kohanbash G, Okada K, et al. Novel and shared neoantigen derived from histone 3 variant H3.3K27M mutation for glioma T cell therapy. *J Exp Med*. 2018;215(1):141-157.
doi:10.1084/jem.20171046
102. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev Cell*. 2009;17(1):87-97.
doi:10.1016/j.devcel.2009.06.013
103. Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. Selective types of autophagy. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:2012-2014. doi:10.1155/2012/156272
104. Adams PD, Ivanov A, Pawlikowski J, et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol*. 2013;202(1):129-143. doi:10.1083/jcb.201212110
105. Khaminets A, Heinrich T, Mari M, et al. Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature*. 2015;522(7556):354-358. doi:10.1038/nature14498
106. Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Dokmeci Emre S. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):1-15. doi:10.1186/s12944-017-0521-7
107. Piacentini M, Kroemer G. Dying to survive - Apoptosis, necroptosis, autophagy as the supreme experiments of nature. *Int J Dev Biol*. 2015;59(1-3):5-9. doi:10.1387/ijdb.150167mp
108. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6(OCT):1-27. doi:10.3389/fcell.2018.00128
109. Liu D, Archer N, Duesing K, Hannan G, Keast R. Mechanism of fat taste perception: Association with diet and obesity. *Prog Lipid Res*. 2016;63:41-49. doi:10.1016/j.plipres.2016.03.002
110. Manuscript A. NIH Public Access. 2016;25(1):37-45. doi:10.1016/j.tcb.2014.09.001. Cellular

111. Galluzzi L, Pietrocola F, Pedro JMB, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. 2015;34(7):856-880.
112. Ho CJ, Gorski SM. Autophagy-Mediated Treatment Resistance in Cancer. Published online 2019:1-49.
113. Vera-ramirez L, Vodnala SK, Nini R, Hunter KW, Green JE. recurrence. *Nat Commun.* (2018). doi:10.1038/s41467-018-04070-6
114. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome : *Nat Publ Gr.* 2013;14(December). doi:10.1038/nrm3696
115. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8 , a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation , Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. Published online 2007:165-178. doi:10.1016/j.cell.2007.05.021
116. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* 2017;61(6):585-596. doi:10.1042/EBC20170021
117. Hollenstein DM, Kraft C. ScienceDirect Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr Opin Cell Biol.* 2020;65:50-57. doi:10.1016/j.ceb.2020.02.012
118. Death C, Dikic I. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(June). doi:10.1038/s41580-018-0003-4
119. Reggiori F, Ungermann C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol.* 2017;429(4):486-496. doi:10.1016/j.jmb.2017.01.002
120. Nascimbeni AC, Codogno P, Morel E. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. 2017;284:1267-1278. doi:10.1111/febs.13987
121. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. 2011;(March):279-296. doi:10.4161/auto.7.3.14487

122. Manuscript A. NIH Public Access. 2014;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152.AMPK
123. Álvarez JB-, Andersen JK. mTORC2 : The other mTOR in autophagy regulation. 2021;(April):1-17. doi:10.1111/accel.13431
124. Alers S, Wesselborg S. Role of AMPK-mTOR-Ulk1 / 2 in the Regulation of Autophagy : Cross. Published online 2012:2-11. doi:10.1128/MCB.06159-11
125. Wang J, Whiteman MW, Lian H, et al. A Non-canonical MEK / ERK Signaling Pathway Regulates Autophagy via Regulating Beclin 1 *. 2009;284(32):21412-21424. doi:10.1074/jbc.M109.026013
126. Errafiy R, Aguado C, Ghislat G, et al. PTEN increases autophagy and inhibits the ubiquitin-proteasome pathway in glioma cells independently of its lipid phosphatase activity. *PLoS One*. 2013;8(12):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0083318
127. Høyer- M, Herrero-martı G, Garcı C, Farkas T. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. 2009;(September 2008):677-685. doi:10.1038/emboj.2009.8
128. Woods A, Dickerson K, Heath R, et al. Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. 2005;2(July):21-33. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.005
129. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A, Foundation A, Brain P, States U. Targeting Autophagy in Cancer. 2018;17(9):528-542. doi:10.1038/nrc.2017.53.Targeting
130. Bago R, Malik N, Munson MJ, et al. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. 2014;427:413-427. doi:10.1042/BJ20140889

131. Ronan B, Flamand O, Vescovi L, et al. alters vesicle trafficking and autophagy. 2014;10(december). doi:10.1038/nchembio.1681
132. Petherick KJ, Conway OJL, Mpamhanga C, et al. Pharmacological Inhibition of ULK1 Kinase Blocks Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) - dependent Autophagy * □. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11376-11383. doi:10.1074/jbc.C114.627778
133. Akin D, Wang SK, Habibzadegah-tari P, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors. 2021;8627. doi:10.4161/auto.32229
134. McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. Published online 2012:1-6. doi:10.1073/pnas.1118193109
135. Jian WL, Bao LJ. Microautophagy: lesser-known self-eating. Published online 2012:1125-1136. doi:10.1007/s00018-011-0865-5
136. Goodall ML, Fitzwalter BE, Zahedi S, et al. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Dev Cell*. 2016;37(4):337-349. doi:10.1016/j.devcel.2016.04.018
137. Manuscript A. NIH Public Access. 2012;4(7):973-983. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0387.Role
138. Sanborn R, Boulmay B, Li R, et al. Preliminary analysis of immune responses in patients enrolled in a Phase II trial of cyclophosphamide with allogeneic dendritic vaccine alone (DPV-001) or with GM-CSF or imiquimod for adjuvant treatment of stage IIIa or IIIb NSCLC. 2015;3(Suppl 2):2-3. doi:10.1186/2051-1426-3-S2-P435

139. Mizushima N. Autophagy : process and function. Published online 2007:2861-2873.
doi:10.1101/gad.1599207.eralize
140. Levy JMM, Thompson JC, Griesinger AM, et al. Autophagy Inhibition Improves Chemosensitivity in BRAF V600E Brain Tumors. (July 2014):773-780. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0049
141. Zou Y, Wang Q, Li B, Xie B, Wang W. Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. *Mol Med Rep.* 2014;10(1):411-416. doi:10.3892/mmr.2014.2151
142. Khan I, Hassan Baig M, Mahfooz S, et al. Resistance Mechanisms in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1318).
143. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):1-14. doi:10.1186/s13046-016-0303-5
144. Petrosyan E, Fares J, Cordero A, et al. Repurposing autophagy regulators in brain tumors. *Int J Cancer.* 2022;151(2):167-180. doi:10.1002/ijc.33965
145. Gatto F, Milletti G, Carai A, Mastronuzzi A, Nazio F. Recent advances in understanding the role of autophagy in paediatric brain tumours. *Diagnostics.* 2021;11(3):1-18.
doi:10.3390/diagnostics11030481
146. Singh SV, Dakhole AN, Deogharkar A, et al. Restoration of miR-30a expression inhibits growth, tumorigenicity of medulloblastoma cells accompanied by autophagy inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;491(4):946-952. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.140
147. Čančer M, Hutter S, Holmberg KO, et al. Humanized Stem Cell Models of Pediatric Medulloblastoma Reveal an Oct4/mTOR Axis that Promotes Malignancy. *Cell Stem Cell.* 2019;25(6):855-870.e11. doi:10.1016/j.stem.2019.10.005

148. Zahedi S, Fitzwalter BE, Morin A, et al. Effect of early-stage autophagy inhibition in BRAFV600E autophagy-dependent brain tumor cells. *Cell Death Dis.* 2019;10(9). doi:10.1038/s41419-019-1880-y
149. Miele E, Buttarelli FR, Arcella A, et al. High-throughput microRNA profiling of pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2014;16(2):228-240. doi:10.1093/neuonc/not215
150. Taylor MA, Das BC, Ray SK. Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma. *Apoptosis.* 2018;23(11-12):563-575. doi:10.1007/s10495-018-1480-9
151. Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: Evidence and issues to resolve. *Br J Cancer.* 2016;114(5):485-496. doi:10.1038/bjc.2016.19
152. Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: A review. *Neurosurgery.* 2000;47(4):888-901. doi:10.1097/00006123-200010000-00020
153. Ainsworth S. The end of the beginning. *Pract Midwife.* 2012;15(6):46. doi:10.1038/nrc3410.Medulloblastomics
154. Petherick KJ, Williams AC, Lane JD, et al. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J.* 2013;32(13):1903-1916. doi:10.1038/emboj.2013.123
155. Northcott PA, Jones DTW, Kool M, et al. Medulloblastomics: The end of the beginning. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(12):818-834. doi:10.1038/nrc3410
156. Chaturvedi NK, Kling MJ, Coulter DW, et al. Improved therapy for medulloblastoma: Targeting hedgehog and PI3K-mTOR signaling pathways in combination with chemotherapy. *Oncotarget.* 2018;9(24):16619-16633. doi:10.18632/oncotarget.24618

157. Malhotra A, Dey A, Prasad N, Kenney AM. Sonic hedgehog signaling drives mitochondrial fragmentation by suppressing mitofusins in cerebellar granule neuron precursors and medulloblastoma. *Mol Cancer Res.* 2016;14(1):114-124. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0278
158. Shih DJH, Northcott PA, Remke M, et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol.* 2014;32(9):886-896. doi:10.1200/JCO.2013.50.9539
159. Bai RY, Staedtke V, Lidov HG, Eberhart CG, Riggins GJ. OTX2 represses myogenic and neuronal differentiation in medulloblastoma cells. *Cancer Res.* 2012;72(22):5988-6001. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0614
160. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature.* 2017;547(7663):311-317. doi:10.1038/nature22973
161. Nazio F, Po A, Abballe L, et al. Targeting cancer stem cells in medulloblastoma by inhibiting AMBRA1 dual function in autophagy and STAT3 signalling. *Acta Neuropathol.* 2021;142(3):537-564. doi:10.1007/s00401-021-02347-7
162. Kilday JP, Rahman R, Dyer S, et al. Pediatric ependymoma: Biological perspectives. *Mol Cancer Res.* 2009;7(6):765-786. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0584
163. Ebert C, Von Haken M, Meyer-Puttlitz B, et al. Molecular genetic analysis of ependymal tumors: NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am J Pathol.* 1999;155(2):627-632. doi:10.1016/S0002-9440(10)65158-9
164. Pajtler KW, Pfister SM. A Mouse Ependymoma Model Provides Molecular Insights into Tumor Formation. *Cell Rep.* 2018;23(13):3699-3700. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.062
165. Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Sci Rep.* 2012;2. doi:10.1038/srep00878
166. Riehn M, Klopocki E, Molkentin M, Reinhardt R, Burmeister T. A BACH2-BCL2L1 Fusion

Gene Resulting from a Lymphoma Cell Line BLUE-1. *Cancer*. 2011;396(January):389-396.
doi:10.1002/gcc

167. Wolf J, Dewi DL, Fredebohm J, et al. A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype. *Breast Cancer Res*. 2013;15(6).
doi:10.1186/bcr3576
168. Su K, Cao J, Tang Z, et al. To Combat Stress and Promote Growth. 2017;18(5):527-539.
doi:10.1038/ncb3335.HSF1
169. Dewi FRP, Jiapaer S, Kobayashi A, et al. Nucleoporin TPR (translocated promoter region, nuclear basket protein) upregulation alters MTOR-HSF1 trails and suppresses autophagy induction in ependymoma. *Autophagy*. 2021;17(4):1001-1012.
doi:10.1080/15548627.2020.1741318
170. Applegate LA, Pioletti D. From bench to bedside. *Eur Pharm Contract*. 2010;12(SPRING):28-32.
doi:10.1097/ppo.0000000000000523
171. Cj P, Hv E, Vijayakurup V, R Menon G, Nair S, Gopala S. High LC3/Beclin Expression Correlates with Poor Survival in Glioma: a Definitive Role for Autophagy as Evidenced by In Vitro Autophagic Flux. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(1):137-148. doi:10.1007/s12253-017-0310-7
172. Wang H, Sun T, Hu J, et al. miR-33a promotes Glioma-initiating cell self-renewal via PKA and NOTCH pathways. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4489-4502. doi:10.1172/JCI75284
173. Li H, Chen L, Li JJ, et al. MiR-519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1-16.
doi:10.1186/s13045-018-0618-0
174. Wen ZP, Zeng WJ, Chen YH, et al. Knockdown ATG4C inhibits gliomas progression and promotes temozolomide chemosensitivity by suppressing autophagic flux. *J Exp Clin Cancer Res*.

2019;38(1):1-15. doi:10.1186/s13046-019-1287-8

175. Gammoh N, Fraser J, Puente C, et al. Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. *Autophagy*. 2016;12(9):1431-1439.
doi:10.1080/15548627.2016.1190053
176. Feng X, Zhang H, Meng L, et al. Hypoxia-induced acetylation of PAK1 enhances autophagy and promotes brain tumorigenesis via phosphorylating ATG5. *Autophagy*. 2021;17(3):723-742.
doi:10.1080/15548627.2020.1731266
177. Helfferich J, Nijmeijer R, Brouwer OF, et al. Neurofibromatosis type 1 associated low grade gliomas: A comparison with sporadic low grade gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;104:30-41. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.05.008
178. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015;129(6):775-788. doi:10.1007/s00401-015-1410-7
179. Nobre L, Zapotocky M, Ramaswamy V, et al. Outcomes of BRAF V600E Pediatric Gliomas Treated With Targeted BRAF Inhibition. *JCO Precis Oncol*. 2020;(4):561-571.
doi:10.1200/po.19.00298
180. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(14):4790-4798.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0034
181. Levy JMM, Thompson JC, Griesinger AM, et al. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAFV600E brain tumors. *Cancer Discov*. 2014;4(7):773-780.
doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0049
182. Barinfeld O, Zahavi A, Weiss S, Toledano H, Michowiz S, Goldenberg-Cohen N. Genetic Alteration Analysis of IDH1, IDH2, CDKN2A, MYB and MYBL1 in Pediatric Low-Grade

Gliomas. *Front Surg*. 2022;9(April):1-11. doi:10.3389/fsurg.2022.880048

183. Escamilla-ram A, Castillo-rodr RA, Zavala-vega S, et al. Autophagy as a Potential Therapy for Malignant Glioma. (grade II).
184. Olsen BB, Svenstrup TH, Guerra B. Downregulation of protein kinase CK2 induces autophagic cell death through modulation of the mTOR and MAPK signaling pathways in human glioblastoma cells. Published online 2012:1967-1976. doi:10.3892/ijo.2012.1635
185. Chatwin H V, Cruz JC, Green AL. Pediatric high-grade glioma : moving toward subtype- specific multimodal therapy. 2021;288:6127-6141. doi:10.1111/febs.15739
186. Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, et al. Neuro-Oncology in need of new thinking. 2017;19(June 2016):153-161. doi:10.1093/neuonc/now101
187. Muskens IS, Smith AJ De, Zhang C, et al. Neuro-Oncology Germline cancer predisposition variants and pediatric glioma : a population-based study in California. 2020;22(January):864-874. doi:10.1093/neuonc/noaa014
188. Liu X, Mceachron TA, Schwartzentruber J. Histone H3 Mutations in Pediatric Brain Tumors. Published online 2014:1-4.
189. Wu G, Broniscer A, Mceachron TA, et al. b r i e f c o m m u n i c a t i o n s Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine. 2012;44(3):2011-2013. doi:10.1038/ng.1102
190. Tagami H, Ray-gallet D, Nakatani Y. Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. 2004;116:51-61.
191. Jacob Y, Bergamin E, Donoghue MTA, et al. NIH Public Access. 2014;343(6176):1249-1253. doi:10.1126/science.1248357.Selective
192. Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Article Integrated Molecular Meta-Analysis and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Published

- online 2017:520-537. doi:10.1016/j.ccell.2017.08.017
193. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA. cIMPACT-NOW update 6 : new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. Published online 2020:1-13. doi:10.1111/bpa.12832
 194. Harutyunyan AS, Krug B, Chen H, et al. is essential for glioma tumorigenesis. Published online 2019. doi:10.1038/s41467-019-09140-x
 195. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic. 2014;14. doi:10.1038/nrc3811
 196. Shi L, Wen H, Shi X. NU Department of Epigenetics and Molecular Carcinogenesis , The University of Texas MD. *J Mol Biol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.jmb.2016.11.019
 197. Oakhill JS, Steel R, Chen Z, et al. AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase. 2011;332(June):2008-2010.
 198. Huang R, Xu Y, Lippincott-schwartz J, et al. Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation Article Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Mol Cell*. 2015;57(3):456-466. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.013
 199. Sarikaya SD, Akkoc Y, Turgut S, Bilir SE. OPEN A novel ATG5 interaction with Ku70 potentiates DNA repair upon genotoxic stress. *Sci Rep*. Published online 2022:1-11. doi:10.1038/s41598-022-11704-9
 200. Bhattacharjee S, Bose P, Patel K. Transcriptional and epigenetic modulation of autophagy promotes EBV oncoprotein EBNA3C induced B-cell survival. *Cell Death Dis*. Published online 2018. doi:10.1038/s41419-018-0668-9
 201. Zhou Q, Zhang J, Cui Q, Li X. GSK1904529A , an insulin - like growth factor - 1 receptor inhibitor , inhibits glioma tumor growth , induces apoptosis and inhibits migration. Published online 2015:3381-3385. doi:10.3892/mmr.2015.3869

202. Lindh MB, Pen C, Garcia-echeverria C, Niste M, Hofmann F, Arne O. *N e u r o - o n c o l o g y*. 2010;12(9):967-975.
203. Wilson CB, Rosenblum ML. *Acta Neuropathologm derived from human malignant gliomas **. Published online 1987:92-103.
204. Trent J, Meltzert P, Rosenblum M, et al. Evidence for rearrangement , amplification , and expression of c-myc in a human glioblastoma. 1986;83(January):470-473.
205. Bax DA, Little SE, Gaspar N, et al. Molecular and Phenotypic Characterisation of Paediatric Glioma Cell Lines as Models for Preclinical Drug Development. 2009;4(4).
doi:10.1371/journal.pone.0005209
206. Nakamura M, Shimada K, Ishida E, et al. Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors 1. Published online 2007. doi:10.1215/15228517-2006-036
207. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. NIH Public Access. 2010;321(5897).
doi:10.1126/science.1164382.An
208. Cancer T, Atlas G. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. 2008;455(October). doi:10.1038/nature07385
209. Schroeder KM, Hoeman CM, Becher OJ, France I. understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. 2014;75(1):205-209. doi:10.1038/pr.2013.194
210. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, et al. NIH Public Access. 2014;340(6134):857-861.
doi:10.1126/science.1232245.Inhibition
211. Hashizume R, Andor N, Ihara Y, et al. *b r i e f c o m m u n i c a t i o n s* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med*. 2014;20(12):1394-1396. doi:10.1038/nm.3716
212. Jain SU, Rashoff AQ, Krabbenhoft SD, et al. HHS Public Access. 2021;80(4):726-735.

doi:10.1016/j.molcel.2020.09.028.H3

213. Castel D, Kergrohen T, Tauziède-Espariat A, et al. Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. *Acta Neuropathol.* 2020;139(6):1109-1113. doi:10.1007/s00401-020-02142-w
214. Yu S, Ping Y, Yi L, et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. 2008;265:124-134. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.010
215. Diserens AC, Tribolet N De, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S. Characterization of an Established Human Malignant Glioma Cell Line : LN-18 *. Published online 1981.
216. Grube S, Walter J, Freitag D, Kalff R, Ewald C. Characterization of adherent primary cell lines from fresh human glioblastoma tissue , defining glial fibrillary acidic protein as a reliable marker in establishment of glioblastoma cell culture. 2021;(November 2020):1-12.
doi:10.1002/cnr2.1324
217. Ashley DM, Riffkin CD, Lovric MM, et al. In vitro sensitivity testing of minimally passaged and uncultured gliomas with TRAIL and / or chemotherapy drugs. Published online 2008:294-304.
doi:10.1038/sj.bjc.6604459
218. Gu X, Ma Y, Liu Y, Wan Q. Measurement of mitochondrial respiration in adherent cells by Seahorse XF96 Cell Mito Stress Test. *STAR Protoc.* 2021;2(1):100245.
doi:10.1016/j.xpro.2020.100245
219. Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic Drugs: A Novel Means to Combat Apoptosis-Resistant Cancers, with a Special Emphasis on Glioblastomas. *Oncologist.* 2007;12(12):1395-1403. doi:10.1634/theoncologist.12-12-1395
220. Howarth A, Madureira PA, Lockwood G, et al. Modulating autophagy as a therapeutic strategy

for the treatment of paediatric high-grade glioma. *Brain Pathol.* 2019;29(6):707-725.

doi:10.1111/bpa.12729

221. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res.* 2012;72(7):1773-1783. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3831
222. Su W, Liao M, Tan H, et al. Identification of autophagic target RAB13 with small-molecule inhibitor in low-grade glioma via integrated multi-omics approaches coupled with virtual screening of traditional Chinese medicine databases. *Cell Prolif.* 2021;54(12):1-15. doi:10.1111/cpr.13135
223. Logan PGB and GD, Boykin S, Diez-Roux A V, et al. 基因的改变NIH Public Access. *Bone.* 2014;23(1):1-7. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0049.Autophagy
224. Xipell E, Gonzalez-Huarriz M, Martinez de Irujo JJ, et al. Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. *Oncotarget.* 2016;7(21):30626-30641. doi:10.18632/oncotarget.8905
225. Yu J, Wu SW, Wu WP. A tumor-suppressive microRNA, miRNA-485-5p, inhibits glioma cell proliferation and invasion by down-regulating TPD52L2. *Am J Transl Res.* 2017;9(7):3336-3344.
226. Shao N, Mao J, Xue L, Wang R, Zhi F, Lan Q. Carnosic acid potentiates the anticancer effect of temozolomide by inducing apoptosis and autophagy in glioma. *J Neurooncol.* 2019;141(2):277-288. doi:10.1007/s11060-018-03043-5
227. Trejo-Solís C, Serrano-Garcia N, Escamilla-Ramírez Á, et al. Autophagic and apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12). doi:10.3390/ijms19123773
228. Shukla S, Patric IRP, Patil V, et al. Methylation silencing of ULK2, an autophagy gene, is

- essential for astrocyte transformation and tumor growth. *J Biol Chem*. 2014;289(32):22306-22318. doi:10.1074/jbc.M114.567032
229. Peng Y, Zhang M, Jiang Z, Jiang Y. TRIM28 activates autophagy and promotes cell proliferation in glioblastoma. *Onco Targets Ther*. 2019;12:397-404. doi:10.2147/OTT.S188101
 230. Kang C, Elledge SJ. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy*. 2016;12(5):898-899. doi:10.1080/15548627.2015.1121361
 231. Sanati M, Binabaj MM, Ahmadi SS, et al. Recent advances in glioblastoma multiforme therapy: A focus on autophagy regulation. *Biomed Pharmacother*. 2022;155:113740. doi:10.1016/j.biopha.2022.113740
 232. Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res*. 2004;64(12):4286-4293. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3084
 233. Xu X, Wang Z, Liu N, et al. Association between SOX9 and CA9 in glioma, and its effects on chemosensitivity to TMZ. *Int J Oncol*. 2018;53(1):189-202. doi:10.3892/ijo.2018.4382
 234. Servante J, Estranero J, Meijer L, Layfield R, Grundy R. Chemical modulation of autophagy as an adjunct to chemotherapy in childhood and adolescent brain tumors. *Oncotarget*. 2018;9(81):35266-35277. doi:10.18632/oncotarget.26186
 235. Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M, Blasiak J. An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme—role in pathogenesis and therapeutic perspective. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3). doi:10.3390/ijms19030889
 236. Hsu SPC, Kuo JS, Chiang HC, et al. Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells. *Oncotarget*. 2018;9(6):6883-6896. doi:10.18632/oncotarget.23855

237. Yuan X, Du J, Hua S, et al. Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on human glioma cells. *Exp Cell Res*. 2015;330(2):267-276.
doi:10.1016/j.yexcr.2014.09.006
238. Zhang X, Li W, Wang C, et al. Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells. *Mol Cell Biochem*. 2014;385(1-2):265-275. doi:10.1007/s11010-013-1835-z
239. Shen J, Zheng H, Ruan J, et al. Autophagy inhibition induces enhanced proapoptotic effects of ZD6474 in glioblastoma. *Br J Cancer*. 2013;109(1):164-171. doi:10.1038/bjc.2013.306
240. Sun H, Zhang M, Cheng K, et al. Resistance of glioma cells to nutrient-deprived microenvironment can be enhanced by CD133-mediated autophagy. *Oncotarget*. 2016;7(46):76238-76249. doi:10.18632/oncotarget.12803
241. Isakovic AM, Dulovic M, Markovic I, et al. Autophagy suppression sensitizes glioma cells to IMP dehydrogenase inhibition-induced apoptotic death. *Exp Cell Res*. 2017;350(1):32-40.
doi:10.1016/j.yexcr.2016.11.001
242. Yang Z, Bian E, Xu Y, et al. Meg3 Induces EMT and Invasion of Glioma Cells via Autophagy [Retraction]. *Onco Targets Ther*. 2022;Volume 15(July):777-778. doi:10.2147/ott.s382060
243. Zhang C, Zhang X, Xu R, et al. Retraction Note: TGF- β 2 initiates autophagy via Smad and non-Smad pathway to promote glioma cells' invasion. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):13046.
doi:10.1186/s13046-021-02219-8
244. Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, et al. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol*. 2004;70(1):3-15. doi:10.1023/B:NEON.0000040811.14908.f2
245. Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol*. 2015;9(8):1612-1625.

doi:10.1016/j.molonc.2015.04.016

246. Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*. 2017;36(12):1619-1630. doi:10.1038/onc.2016.333
247. Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, Gandolfi G, Ciarrocchi A. Autophagy and epithelial–mesenchymal transition: An intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis*. 2016;7(12):1-12. doi:10.1038/cddis.2016.415
248. Andradas C, Byrne J, Kuchibhotla M, et al. Assessment of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in mouse models of medulloblastoma and ependymoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):1-26. doi:10.3390/cancers13020330
249. Pilarski F, Rossini AJ, Ceccarelli PS. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian J Biol*. 2008;68(2):409-414. doi:10.1590/S1519-69842008000200025
250. Parker SJ, Metallo CM. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacol Ther*. 2015;152:54-62. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.003
251. Melhem JM, Detsky J, Lim-Fat MJ, Perry JR. Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. *Neurotherapeutics*. Published online 2022:1705-1723. doi:10.1007/s13311-022-01251-6
252. Shen H, Yu M, Tsoi M, et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol*. 2020;22(1):139-151. doi:10.1093/neuonc/noz140
253. Qu F, Wang P, Zhang K, et al. Manipulation of Mitophagy by “All-in-One” nanosensitizer augments sonodynamic glioma therapy. *Autophagy*. 2020;16(8):1413-1435. doi:10.1080/15548627.2019.1687210
254. Huang T, Xu T, Wang Y, et al. Cannabidiol inhibits human glioma by induction of lethal

mitophagy through activating TRPV4. *Autophagy*. 2021;17(11):3592-3606.

doi:10.1080/15548627.2021.1885203

1. Hashizume R, Andor N, Ihara Y, et al. HHS Public Access. 2015;20(12):1394-1396.
doi:10.1038/nm.3716.Pharmacologic
2. Kebudi R. Pediatric oncology in Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34(SUPPL. 1):12-14.
doi:10.1097/MPH.0b013e318249aaac
3. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):719-731.
doi:10.1016/S1470-2045(17)30186-9
4. Hegi ME, Murat A, Lambiv WL, Stupp R. Brain tumors: Molecular biology and targeted therapies. *Ann Oncol*. 2006;17(SUPPL. 10):x191-x197. doi:10.1093/annonc/mdl259
5. Wells EM, Packer RJ. Pediatric brain tumors. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2015;21(2):373-396.
doi:10.1212/01.CON.0000464176.96311.d1
6. Magrath I, Steliarova-Foucher E, Epelman S, et al. Paediatric cancer in low-income and middle-income countries. *Lancet Oncol*. 2013;14(3):e104-e116. doi:10.1016/S1470-2045(13)70008-1
7. Barone G, Maurizi P, Tamburrini G, Riccardi R. Role of temozolomide in pediatric brain tumors. *Child's Nerv Syst*. 2006;22(7):652-661. doi:10.1007/s00381-006-0081-z
8. Riaz Q, Naeem E, Fadoo Z, Lohano M, Mushtaq N. Intracranial tumors in children: a 10-year review from a single tertiary health-care center. *Child's Nerv Syst*. 2019;35(12):2347-2353.
doi:10.1007/s00381-019-04260-7
9. Perla A, Fratini L, Cardoso PS, et al. Histone Deacetylase Inhibitors in Pediatric Brain Cancers:

Biological Activities and Therapeutic Potential. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(July):1-14.

doi:10.3389/fcell.2020.00546

10. Rogers HA, Estranero J, Gudka K, Grundy RG. The therapeutic potential of targeting the PI3K pathway in pediatric brain tumors. *Oncotarget.* 2017;8(2):2083-2095.
doi:10.18632/oncotarget.13781
11. Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):94-101. doi:10.1038/s41556-018-0249-2
12. Hu F, Song D, Yan Y, et al. IL-6 regulates autophagy and chemotherapy resistance by promoting BECN1 phosphorylation. *Nat Commun.* 2021;12(1):1-14. doi:10.1038/s41467-021-23923-1
13. Levy JMM, Zahedi S, Griesinger AM, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *Elife.* 2017;6:1-24.
doi:10.7554/eLife.19671
14. Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, et al. The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene.* 2013;32(6):699-712.
doi:10.1038/onc.2012.111
15. Paul R, Bharambe H, Shirsat NV. Autophagy inhibition impairs the invasion potential of medulloblastoma cells. *Mol Biol Rep.* 2020;47(7):5673-5680. doi:10.1007/s11033-020-05603-3
16. Kaza N, Kohli L, Roth KA. Autophagy in brain tumors: A new target for therapeutic intervention. *Brain Pathol.* 2012;22(1):89-98. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00544.x
17. Stevens M. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* Vol 65.; 1990.
doi:10.1136/adc.65.5.563-a
18. Kutluk MT, Yeşilipek A. Pediatric Cancer Registry in Turkey 2009-2021 (TPOG & TPHD). *J Clin Oncol.* 2022;40(16_suppl):e22020-e22020. doi:10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e22020

19. CBTRUS. Central Brain Tumor Registry of the United States (2004-2007). *Cbtrus*. 2011;(February):3831.
20. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013;15(SUPPL.2). doi:10.1093/neuonc/not151
21. Hulsebos TJM, Plomp AS, Wolterman RA, Robanus-Maandag EC, Baas F, Wesseling P. Germline mutation of INI1/SMARCB1 in familial schwannomatosis. *Am J Hum Genet*. 2007;80(4):805-810. doi:10.1086/513207
22. Roach ES, Walsh T. Intracranial neoplasms in children. *Am Fam Physician*. 1986;33(2):243-253.
23. Connelly JM, Malkin MG. Environmental risk factors for brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007;7(3):208-214. doi:10.1007/s11910-007-0032-4
24. Khafaga Y, Hassounah M, Kandil A, et al. Optic gliomas: A retrospective analysis of 50 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;56(3):807-812. doi:10.1016/S0360-3016(02)04512-1
25. Honig PJ, Charney EB. Children With Brain Tumor Headaches: Distinguishing Features. *Am J Dis Child*. 1982;136(2):121-124. doi:10.1001/archpedi.1982.03970380033008
26. Gilard V, Tebani A, Dabaj I, et al. Diagnosis and management of glioblastoma: A comprehensive perspective. *J Pers Med*. 2021;11(4). doi:10.3390/jpm11040258
27. Goldman RD, Cheng S, Cochrane DD. Improving diagnosis of pediatric central nervous system tumours: Aiming for early detection. *Cmaj*. 2017;189(12):E459-E463. doi:10.1503/cmaj.160074
28. Agaoglu FY, Ayan I, Dizdar Y, Kebudi R, Gorgun O, Darendeliler E. Ependymal tumors in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45(3):298-303. doi:10.1002/pbc.20212
29. Dang M, Phillips PC. Pediatric Brain Tumors. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2017;23(6, Neuro-oncology):1727-1757. doi:10.1212/CON.0000000000000545

30. Tsai ML, Chen CL, Hsieh KLC, et al. Seizure characteristics are related to tumor pathology in children with brain tumors. *Epilepsy Res.* 2018;147:15-21. doi:10.1016/j.eplesyres.2018.08.007
31. Sánchez Fernández I, Gaínza-Lein M, Abend NS, et al. Factors associated with treatment delays in pediatric refractory convulsive status epilepticus. *Neurology.* 2018;90(19):E1692-E1701. doi:10.1212/WNL.00000000000005488
32. Wessling C, Bartels S, Sassen R, Schoene-Bake JC, von Lehe M. Brain tumors in children with refractory seizures—a long-term follow-up study after epilepsy surgery. *Child's Nerv Syst.* 2015;31(9):1471-1477. doi:10.1007/s00381-015-2825-0
33. Lamba N, Wen PY, Aizer AA. Epidemiology of brain metastases and leptomeningeal disease. *Neuro Oncol.* 2021;23(9):1447-1456. doi:10.1093/neuonc/noab101
34. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
35. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2020;139(3):603-608. doi:10.1007/s00401-020-02127-9
36. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathol.* 2018;136(5):805-810. doi:10.1007/s00401-018-1913-0
37. Louis DN, Wesseling P, Paulus W, et al. cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC). *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):481-484. doi:10.1007/s00401-018-1808-0
38. Louis DN, Giannini C, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for

- diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol.* 2018;135(4):639-642. doi:10.1007/s00401-018-1826-y
39. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF V600E mutation. *Acta Neuropathol.* 2019;137(4):683-687. doi:10.1007/s00401-019-01987-0
 40. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2020;30(4):844-856. doi:10.1111/bpa.12832
 41. Ellison DW, Aldape KD, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol.* 2020;30(5):863-866. doi:10.1111/bpa.12866
 42. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106
 43. Ryall S, Tabori U, Hawkins C. Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):1-22. doi:10.1186/s40478-020-00902-z
 44. Chan KM, Fang D, Gan H, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 2013;27(9):985-990. doi:10.1101/gad.217778.113
 45. Ryall S, Zapotocky M, Fukuoka K, et al. Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas. *Cancer Cell.* 2020;37(4):569-583.e5. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.011
 46. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-450. doi:10.1038/ng.2938
 47. Jain SU, Do TJ, Lund PJ, et al. PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2

- activity through a H3 K27M-like mechanism. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-09981-6
48. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 2012;124(3):439-447. doi:10.1007/s00401-012-0998-0
 49. Korshunov A, Capper D, Reuss D, et al. Histologically distinct neuroepithelial tumors with histone 3 G34 mutation are molecularly similar and comprise a single nosologic entity. *Acta Neuropathol.* 2016;131(1):137-146. doi:10.1007/s00401-015-1493-1
 50. Shantanam S, MUELLER. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139-148. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1030
 51. Guerreiro Stucklin AS, Ryall S, Fukuoka K, et al. Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-13. doi:10.1038/s41467-019-12187-5
 52. Korshunov A, Schrimpf D, Ryzhova M, et al. H3-/IDH-wild type pediatric glioblastoma is comprised of molecularly and prognostically distinct subtypes with associated oncogenic drivers. *Acta Neuropathol.* 2017;134(3):507-516. doi:10.1007/s00401-017-1710-1
 53. Sievers P, Sill M, Schrimpf D, et al. A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of EGFR. *Neuro Oncol.* 2021;23(1):34-43. doi:10.1093/neuonc/noaa251
 54. Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014;24(5):429-435. doi:10.1111/bpa.12171
 55. Clarke M, Mackay A, Ismer B, et al. Infant high-grade gliomas comprise multiple subgroups

- characterized by novel targetable gene fusions and favorable outcomes. *Cancer Discov.* 2020;10(7):942-963. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1030
56. Di Ruscio V, Carai A, Del Baldo G, et al. Molecular Landscape in Infant High-Grade Gliomas: A Single Center Experience. *Diagnostics.* 2022;12(2):1-16. doi:10.3390/diagnostics12020372
 57. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(9):878-887. doi:10.1097/NEN.0b013e3181845622
 58. Ding C, Tihan T. Recent progress in the pathology and genetics of pilocytic and pilomyxoid astrocytomas. *Balkan Med J.* 2019;36(1):3-11. doi:10.4274/balkanmedj.2018.1001
 59. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008;68(21):8673-8677. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2097
 60. Kulac I, Tihan T. Pilomyxoid astrocytomas: a short review. *Brain Tumor Pathol.* 2019;36(2):52-55. doi:10.1007/s10014-019-00343-0
 61. Yeo YH, Byrne NP, Counelis GJ, Perry A. Adult with cerebellar anaplastic pilocytic astrocytoma associated with BRAF v600e mutation and p16 loss. *Clin Neuropathol.* 2013;32(3):159-164. doi:10.5414/NP300564
 62. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Burger PC, Jenkins S, Giannini C. Anaplasia in pilocytic astrocytoma predicts aggressive behavior. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(2):147-160. doi:10.1097/PAS.0b013e3181c75238
 63. Gareton A, Tauziède-Espariat A, Dangouloff-Ros V, et al. The histomolecular criteria established for adult anaplastic pilocytic astrocytoma are not applicable to the pediatric population. *Acta Neuropathol.* 2020;139(2):287-303. doi:10.1007/s00401-019-02088-8

64. Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: Reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. *J Negat Results Biomed.* 2011;10(1):1-13. doi:10.1186/1477-5751-10-7
65. Vera-Bolanos E, Aldape K, Yuan Y, et al. Clinical course and progression-free survival of adult intracranial and spinal ependymoma patients. *Neuro Oncol.* 2015;17(3):440-447. doi:10.1093/neuonc/nou162
66. Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):958-971. doi:10.1016/S1470-2045(17)30243-7
67. Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Northcott PA. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(1):42-56. doi:10.1038/s41568-019-0223-8
68. Mynarek M, von Hoff K, Pietsch T, et al. Nonmetastatic medulloblastoma of early childhood: Results from the prospective clinical trial hit-2000 and an extended validation cohort. *J Clin Oncol.* 2020;38(18):2028-2040. doi:10.1200/JCO.19.03057
69. Robinson GW, Gajjar A. Genomics paves the way for better infant medulloblastoma therapy. *J Clin Oncol.* 2020;38(18):2010-2013. doi:10.1200/JCO.20.00593
70. Louis DN, Ellison DW, Brat DJ, et al. cIMPACT-NOW: a practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol.* 2019;29(4):469-472. doi:10.1111/bpa.12732
71. Resende LL, Alves CAPF. Imaging of brain tumors in children: The basics—a narrative review. *Transl Pediatr.* 2021;10(4):1138-1168. doi:10.21037/TP-20-285
72. Yu S, He L, Zhuang X, Luo B. Pleomorphic xanthoastrocytoma: MR imaging findings in 19 patients. *Acta radiol.* 2011;52(2):223-228. doi:10.1258/ar.2010.100221

73. Yeom KW, Bouffet E, Fisher PG, et al. MRI Surrogates for Molecular Subgroups of Medulloblastoma. *Am J Neuroradiol*. 2014;35(7):1263.
<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.a3990>
<http://www.ajnr.org/doi/pdf/10.3174/ajnr.A3990>
74. Stock A, Mynarek M, Pietsch T, et al. Imaging characteristics of wingless pathway subgroup medulloblastomas: Results from the German HIT/SIOP-trial cohort. *Am J Neuroradiol*. 2019;40(11):1811-1817. doi:10.3174/ajnr.A6286
75. Lau CSM, Mahendraraj K, Chamberlain RS. Atypical teratoid rhabdoid tumors: A population-based clinical outcomes study involving 174 patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973–2010). *Cancer Manag Res*. 2015;7:301-309.
doi:10.2147/CMAR.S88561
76. Mangalore S, Aryan S, Prasad C, Santosh V. Imaging characteristics of supratentorial ependymomas: Study on a large single institutional cohort with histopathological correlation. *Asian J Neurosurg*. 2015;10(04):276-281. doi:10.4103/1793-5482.162702
77. Shantanam S, MUELLER. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2018;176(1):139-148. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.002.Molecular
78. Napieralska A, Krzywon A, Mizia-malarz A, Sosna-zieli J. High-Grade Gliomas in Children—A Multi-Institutional Polish Study 3 ,. Published online 2021.
79. Packer RJ, Gajjar A, Vezina G, et al. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(25):4202-4208. doi:10.1200/JCO.2006.06.4980
80. Biterge Sut B. Somatic Missense Mutations of Histone Variant H3.3 in Central Nervous System Cancers. *Eur J Biol*. 2020;79(2):75-82. doi:10.26650/eurjbiol.2020.0019

81. Komotar RJ, Otten ML, Garrett MC, Anderson RCE. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone - A critical review. *Clin Med Oncol*. 2009;2009(3):13-14. doi:10.4137/cmo.s392
82. Lin FY, Chintagumpala M. Advances in Management of Pediatric Ependymomas. *Curr Oncol Rep*. 2015;17(10):1-7. doi:10.1007/s11912-015-0470-0
83. James H. Garvin Jr., 1 Michael T. Selch, 2 Emi Holmes, 3 Mitchell S. Berger, 4 Jonathan L. Finlay, 5* Ann Flannery, 6 Joel W. Goldwein, 7 Roger J. Packer, 8 Lucy B. Rorke-Adams, 9 Tania Shiminski-Maher, 10 Richard Sposto, 3, 11 Philip Stanley, 12 Raymond 13Ian F. Pollack14 and for the Children's Oncology Group. Phase II Study of Pre-Irradiation Chemotherapy for Childhood Intracranial Ependymoma. Children's Cancer Group Protocol 9942: A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*.
84. Wisoff JH, Sanford RA, Heier LA, et al. Primary neurosurgery for pediatric low-grade gliomas: A prospective multi-institutional study from the children's oncology group. *Neurosurgery*. 2011;68(6):1548-1554. doi:10.1227/NEU.0b013e318214a66e
85. Mishra KK, Squire S, Lamborn K, et al. Phase II TPDCV protocol for pediatric low-grade hypothalamic/chiasmatic gliomas: 15-Year update. *J Neurooncol*. 2010;100(1):121-127. doi:10.1007/s11060-010-0151-7
86. Ater JL, Zhou T, Holmes E, et al. Randomized study of two chemotherapy regimens for treatment of low-grade glioma in young children: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2641-2647. doi:10.1200/JCO.2011.36.6054
87. Cherlow JM, Shaw DW, Margraf LR, et al. HHS Public Access. 2020;103(4):861-868. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.11.004.Conformal
88. Krueger DA, Care MM, Agricola K, Tudor C, Mays M, Franz DN. Everolimus long-term safety

and efficacy in subependymal giant cell astrocytoma. *Neurology*. 2013;80(6):574-580.
doi:10.1212/WNL.0b013e3182815428

89. Melchionda F, Oncology P, Spreafico F, et al. LETTER TO THE EDITOR A Novel WT1 Mutation in Familial Wilms Tumor. *Pediatr Blood Cancerfile:///Users/iremyenidogan/Desktop/garvin2012.pdf*. 2013;(February):1388-1389.
doi:10.1002/pbc
90. Banerjee A, Jakacki RI, Onar-Thomas A, et al. A phase i trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: A Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) study. *Neuro Oncol*. 2017;19(8):1135-1144.
doi:10.1093/neuonc/now282
91. Minniti G, De Sanctis V, Muni R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. *J Neurooncol*. 2008;88(1):97-103.
doi:10.1007/s11060-008-9538-0
92. Cohen KJ, Pollack IF, Zhou T, et al. Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: A report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol*. 2011;13(3):317-323.
doi:10.1093/neuonc/noq191
93. Jakacki RI, Cohen KJ, Buxton A, et al. Phase 2 study of concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and lomustine in the treatment of children with high-grade glioma: A report of the Children's Oncology Group ACNS0423 study. *Neuro Oncol*. 2016;18(10):1442-1450. doi:10.1093/neuonc/now038
94. Wick W, Brandes AA, Gorlia T, et al. NEURO-ONCOLOGY Abstracts. *Neuro Oncol*. Published online 2015:2015. doi:doi:10.1093/neuonc/nov061.154
95. Grill J, Massimino M, Bouffet E, et al. Phase II, open-label, randomized, multicenter trial

- (HERBY) of bevacizumab in pediatric patients with newly diagnosed high-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2018;36(10):951-958. doi:10.1200/JCO.2017.76.0611
96. Jennings MT, Sposto R, Boyett JM, et al. Preradiation chemotherapy in primary high-risk brainstem tumors: Phase II study CCG-9941 of the children's cancer group. *J Clin Oncol*. 2002;20(16):3431-3437. doi:10.1200/JCO.2002.04.109
97. Pollack IF, Stewart CF, Kocak M, et al. A phase II study of gefitinib and irradiation in children with newly diagnosed brainstem gliomas: A report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Neuro Oncol*. 2011;13(3):290-297. doi:10.1093/neuonc/noq199
98. Haas-Kogan DA, Banerjee A, Poussaint TY, et al. Phase II trial of tipifarnib and radiation in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol*. 2011;13(3):298-306. doi:10.1093/neuonc/noq202
99. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med*. 2015;21(6):555-559. doi:10.1038/nm.3855
100. Neth BJ, Balakrishnan SN, Carabenciov ID, et al. Panobinostat in adults with H3 K27M-mutant diffuse midline glioma: a single-center experience. *J Neurooncol*. 2022;157(1):91-100. doi:10.1007/s11060-022-03950-8
101. Chheda ZS, Kohanbash G, Okada K, et al. Novel and shared neoantigen derived from histone 3 variant H3.3K27M mutation for glioma T cell therapy. *J Exp Med*. 2018;215(1):141-157. doi:10.1084/jem.20171046
102. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev Cell*. 2009;17(1):87-97. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.013
103. Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. Selective types of autophagy. *Int J Cell Biol*.

2012;2012:2012-2014. doi:10.1155/2012/156272

104. Adams PD, Ivanov A, Pawlikowski J, et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol.* 2013;202(1):129-143. doi:10.1083/jcb.201212110
105. Khaminets A, Heinrich T, Mari M, et al. Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature.* 2015;522(7556):354-358. doi:10.1038/nature14498
106. Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Dokmeci Emre S. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):1-15. doi:10.1186/s12944-017-0521-7
107. Piacentini M, Kroemer G. Dying to survive - Apoptosis, necroptosis, autophagy as the supreme experiments of nature. *Int J Dev Biol.* 2015;59(1-3):5-9. doi:10.1387/ijdb.150167mp
108. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6(OCT):1-27. doi:10.3389/fcell.2018.00128
109. Liu D, Archer N, Duesing K, Hannan G, Keast R. Mechanism of fat taste perception: Association with diet and obesity. *Prog Lipid Res.* 2016;63:41-49. doi:10.1016/j.plipres.2016.03.002
110. Manuscript A. NIH Public Access. 2016;25(1):37-45. doi:10.1016/j.tcb.2014.09.001. Cellular
111. Galluzzi L, Pietrocola F, Pedro JMB, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. 2015;34(7):856-880.
112. Ho CJ, Gorski SM. Autophagy-Mediated Treatment Resistance in Cancer. Published online 2019:1-49.
113. Vera-ramirez L, Vodnala SK, Nini R, Hunter KW, Green JE. recurrence. *Nat Commun.* (2018). doi:10.1038/s41467-018-04070-6
114. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome : *Nat Publ Gr.* 2013;14(December). doi:10.1038/nrm3696
115. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8 , a Ubiquitin-like Protein Required for

- Autophagosome Formation , Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. Published online 2007;165-178. doi:10.1016/j.cell.2007.05.021
116. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* 2017;61(6):585-596. doi:10.1042/EBC20170021
 117. Hollenstein DM, Kraft C. ScienceDirect Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr Opin Cell Biol.* 2020;65:50-57. doi:10.1016/j.ceb.2020.02.012
 118. Death C, Dikic I. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(June). doi:10.1038/s41580-018-0003-4
 119. Reggiori F, Ungermann C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol.* 2017;429(4):486-496. doi:10.1016/j.jmb.2017.01.002
 120. Nascimbeni AC, Codogno P, Morel E. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. 2017;284:1267-1278. doi:10.1111/febs.13987
 121. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. 2011;(March):279-296. doi:10.4161/auto.7.3.14487
 122. Manuscript A. NIH Public Access. 2014;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152.AMPK
 123. Álvarez JB-, Andersen JK. mTORC2 : The other mTOR in autophagy regulation. 2021;(April):1-17. doi:10.1111/accel.13431
 124. Alers S, Wesselborg S. Role of AMPK-mTOR-Ulk1 / 2 in the Regulation of Autophagy : Cross. Published online 2012:2-11. doi:10.1128/MCB.06159-11
 125. Wang J, Whiteman MW, Lian H, et al. A Non-canonical MEK / ERK Signaling Pathway Regulates Autophagy via Regulating Beclin 1 *. 2009;284(32):21412-21424. doi:10.1074/jbc.M109.026013
 126. Errafiy R, Aguado C, Ghislat G, et al. PTEN increases autophagy and inhibits the ubiquitin-

- proteasome pathway in glioma cells independently of its lipid phosphatase activity. *PLoS One*. 2013;8(12):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0083318
127. Høyer- M, Herrero-martí G, Garcí C, Farkas T. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. 2009;(September 2008):677-685. doi:10.1038/emboj.2009.8
 128. Woods A, Dickerson K, Heath R, et al. Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. 2005;2(July):21-33. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.005
 129. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A, Foundation A, Brain P, States U. Targeting Autophagy in Cancer. 2018;17(9):528-542. doi:10.1038/nrc.2017.53.Targeting
 130. Bago R, Malik N, Munson MJ, et al. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. 2014;427:413-427. doi:10.1042/BJ20140889
 131. Ronan B, Flamand O, Vescovi L, et al. alters vesicle trafficking and autophagy. 2014;10(december). doi:10.1038/nchembio.1681
 132. Petherick KJ, Conway OJL, Mpamhanga C, et al. Pharmacological Inhibition of ULK1 Kinase Blocks Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) - dependent Autophagy * □. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11376-11383. doi:10.1074/jbc.C114.627778
 133. Akin D, Wang SK, Habibzadegah-tari P, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors. 2021;8627. doi:10.4161/auto.32229
 134. McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor

- activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. Published online 2012;1-6. doi:10.1073/pnas.1118193109
135. Jian WL, Bao LJ. Microautophagy: lesser-known self-eating. Published online 2012;1125-1136. doi:10.1007/s00018-011-0865-5
 136. Goodall ML, Fitzwalter BE, Zahedi S, et al. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Dev Cell*. 2016;37(4):337-349. doi:10.1016/j.devcel.2016.04.018
 137. Manuscript A. NIH Public Access. 2012;4(7):973-983. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0387.Role
 138. Sanborn R, Boulmay B, Li R, et al. Preliminary analysis of immune responses in patients enrolled in a Phase II trial of cyclophosphamide with allogeneic dendritic vaccine alone (DPV-001) or with GM-CSF or imiquimod for adjuvant treatment of stage IIIa or IIIb NSCLC. 2015;3(Suppl 2):2-3. doi:10.1186/2051-1426-3-S2-P435
 139. Mizushima N. Autophagy : process and function. Published online 2007;2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207.eralize
 140. Levy JMM, Thompson JC, Griesinger AM, et al. Autophagy Inhibition Improves Chemosensitivity in BRAF V600E Brain Tumors. (July 2014):773-780. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0049
 141. Zou Y, Wang Q, Li B, Xie B, Wang W. Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. *Mol Med Rep*. 2014;10(1):411-416. doi:10.3892/mmr.2014.2151
 142. Khan I, Hassan Baig M, Mahfooz S, et al. Resistance Mechanisms in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1318).

143. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):1-14. doi:10.1186/s13046-016-0303-5
144. Petrosyan E, Fares J, Cordero A, et al. Repurposing autophagy regulators in brain tumors. *Int J Cancer.* 2022;151(2):167-180. doi:10.1002/ijc.33965
145. Gatto F, Milletti G, Carai A, Mastronuzzi A, Nazio F. Recent advances in understanding the role of autophagy in paediatric brain tumours. *Diagnostics.* 2021;11(3):1-18. doi:10.3390/diagnostics11030481
146. Singh SV, Dakhole AN, Deogharkar A, et al. Restoration of miR-30a expression inhibits growth, tumorigenicity of medulloblastoma cells accompanied by autophagy inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;491(4):946-952. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.140
147. Čančer M, Hutter S, Holmberg KO, et al. Humanized Stem Cell Models of Pediatric Medulloblastoma Reveal an Oct4/mTOR Axis that Promotes Malignancy. *Cell Stem Cell.* 2019;25(6):855-870.e11. doi:10.1016/j.stem.2019.10.005
148. Zahedi S, Fitzwalter BE, Morin A, et al. Effect of early-stage autophagy inhibition in BRAFV600E autophagy-dependent brain tumor cells. *Cell Death Dis.* 2019;10(9). doi:10.1038/s41419-019-1880-y
149. Miele E, Buttarelli FR, Arcella A, et al. High-throughput microRNA profiling of pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2014;16(2):228-240. doi:10.1093/neuonc/not215
150. Taylor MA, Das BC, Ray SK. Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma. *Apoptosis.* 2018;23(11-12):563-575. doi:10.1007/s10495-018-1480-9
151. Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with

- radiation and temozolomide in glioblastoma: Evidence and issues to resolve. *Br J Cancer*. 2016;114(5):485-496. doi:10.1038/bjc.2016.19
152. Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: A review. *Neurosurgery*. 2000;47(4):888-901. doi:10.1097/00006123-200010000-00020
 153. Ainsworth S. The end of the beginning. *Pract Midwife*. 2012;15(6):46. doi:10.1038/nrc3410.Medulloblastomics
 154. Petherick KJ, Williams AC, Lane JD, et al. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J*. 2013;32(13):1903-1916. doi:10.1038/emboj.2013.123
 155. Northcott PA, Jones DTW, Kool M, et al. Medulloblastomics: The end of the beginning. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):818-834. doi:10.1038/nrc3410
 156. Chaturvedi NK, Kling MJ, Coulter DW, et al. Improved therapy for medulloblastoma: Targeting hedgehog and PI3K-mTOR signaling pathways in combination with chemotherapy. *Oncotarget*. 2018;9(24):16619-16633. doi:10.18632/oncotarget.24618
 157. Malhotra A, Dey A, Prasad N, Kenney AM. Sonic hedgehog signaling drives mitochondrial fragmentation by suppressing mitofusins in cerebellar granule neuron precursors and medulloblastoma. *Mol Cancer Res*. 2016;14(1):114-124. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0278
 158. Shih DJH, Northcott PA, Remke M, et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol*. 2014;32(9):886-896. doi:10.1200/JCO.2013.50.9539
 159. Bai RY, Staedtke V, Lidov HG, Eberhart CG, Riggins GJ. OTX2 represses myogenic and neuronal differentiation in medulloblastoma cells. *Cancer Res*. 2012;72(22):5988-6001. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0614
 160. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma

- subtypes. *Nature*. 2017;547(7663):311-317. doi:10.1038/nature22973
161. Nazio F, Po A, Abballe L, et al. Targeting cancer stem cells in medulloblastoma by inhibiting AMBRA1 dual function in autophagy and STAT3 signalling. *Acta Neuropathol*. 2021;142(3):537-564. doi:10.1007/s00401-021-02347-7
 162. Kilday JP, Rahman R, Dyer S, et al. Pediatric ependymoma: Biological perspectives. *Mol Cancer Res*. 2009;7(6):765-786. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0584
 163. Ebert C, Von Haken M, Meyer-Puttlitz B, et al. Molecular genetic analysis of ependymal tumors: NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am J Pathol*. 1999;155(2):627-632. doi:10.1016/S0002-9440(10)65158-9
 164. Pajtler KW, Pfister SM. A Mouse Ependymoma Model Provides Molecular Insights into Tumor Formation. *Cell Rep*. 2018;23(13):3699-3700. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.062
 165. Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Sci Rep*. 2012;2. doi:10.1038/srep00878
 166. Riehn M, Klopocki E, Molkentin M, Reinhardt R, Burmeister T. A BACH2-BCL2L1 Fusion Gene Resulting from a Lymphoma Cell Line BLUE-1. *Cancer*. 2011;396(January):389-396. doi:10.1002/gcc
 167. Wolf J, Dewi DL, Fredebohm J, et al. A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype. *Breast Cancer Res*. 2013;15(6). doi:10.1186/bcr3576
 168. Su K, Cao J, Tang Z, et al. To Combat Stress and Promote Growth. 2017;18(5):527-539. doi:10.1038/ncb3335.HSF1
 169. Dewi FRP, Jiapaer S, Kobayashi A, et al. Nucleoporin TPR (translocated promoter region, nuclear basket protein) upregulation alters MTOR-HSF1 trails and suppresses autophagy

induction in ependymoma. *Autophagy*. 2021;17(4):1001-1012.

doi:10.1080/15548627.2020.1741318

170. Applegate LA, Pioletti D. From bench to bedside. *Eur Pharm Contract*. 2010;12(SPRING):28-32.
doi:10.1097/ppo.0000000000000523
171. Cj P, Hv E, Vijayakurup V, R Menon G, Nair S, Gopala S. High LC3/Beclin Expression Correlates with Poor Survival in Glioma: a Definitive Role for Autophagy as Evidenced by In Vitro Autophagic Flux. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(1):137-148. doi:10.1007/s12253-017-0310-7
172. Wang H, Sun T, Hu J, et al. miR-33a promotes Glioma-initiating cell self-renewal via PKA and NOTCH pathways. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4489-4502. doi:10.1172/JCI75284
173. Li H, Chen L, Li JJ, et al. MiR-519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1-16.
doi:10.1186/s13045-018-0618-0
174. Wen ZP, Zeng WJ, Chen YH, et al. Knockdown ATG4C inhibits gliomas progression and promotes temozolomide chemosensitivity by suppressing autophagic flux. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):1-15. doi:10.1186/s13046-019-1287-8
175. Gammoh N, Fraser J, Puente C, et al. Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. *Autophagy*. 2016;12(9):1431-1439.
doi:10.1080/15548627.2016.1190053
176. Feng X, Zhang H, Meng L, et al. Hypoxia-induced acetylation of PAK1 enhances autophagy and promotes brain tumorigenesis via phosphorylating ATG5. *Autophagy*. 2021;17(3):723-742.
doi:10.1080/15548627.2020.1731266
177. Helfferich J, Nijmeijer R, Brouwer OF, et al. Neurofibromatosis type 1 associated low grade gliomas: A comparison with sporadic low grade gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;104:30-

41. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.05.008
178. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):775-788. doi:10.1007/s00401-015-1410-7
179. Nobre L, Zapotocky M, Ramaswamy V, et al. Outcomes of BRAF V600E Pediatric Gliomas Treated With Targeted BRAF Inhibition. *JCO Precis Oncol.* 2020;(4):561-571. doi:10.1200/po.19.00298
180. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(14):4790-4798. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0034
181. Levy JMM, Thompson JC, Griesinger AM, et al. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAFV600E brain tumors. *Cancer Discov.* 2014;4(7):773-780. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0049
182. Barinfeld O, Zahavi A, Weiss S, Toledano H, Michowiz S, Goldenberg-Cohen N. Genetic Alteration Analysis of IDH1, IDH2, CDKN2A, MYB and MYBL1 in Pediatric Low-Grade Gliomas. *Front Surg.* 2022;9(April):1-11. doi:10.3389/fsurg.2022.880048
183. Escamilla-ram A, Castillo-rodr RA, Zavala-vega S, et al. Autophagy as a Potential Therapy for Malignant Glioma. (grade II).
184. Olsen BB, Svenstrup TH, Guerra B. Downregulation of protein kinase CK2 induces autophagic cell death through modulation of the mTOR and MAPK signaling pathways in human glioblastoma cells. Published online 2012:1967-1976. doi:10.3892/ijo.2012.1635
185. Chatwin H V, Cruz JC, Green AL. Pediatric high-grade glioma : moving toward subtype- specific multimodal therapy. 2021;288:6127-6141. doi:10.1111/febs.15739
186. Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, et al. Neuro-Oncology in need of new thinking.

- 2017;19(June 2016):153-161. doi:10.1093/neuonc/now101
187. Muskens IS, Smith AJ De, Zhang C, et al. Neuro-Oncology Germline cancer predisposition variants and pediatric glioma : a population-based study in California. 2020;22(January):864-874. doi:10.1093/neuonc/noaa014
 188. Liu X, Mceachron TA, Schwartzentruber J. Histone H3 Mutations in Pediatric Brain Tumors. Published online 2014:1-4.
 189. Wu G, Broniscer A, Mceachron TA, et al. b r i e f c o m m u n i c a t i o n s Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine. 2012;44(3):2011-2013. doi:10.1038/ng.1102
 190. Tagami H, Ray-gallet D, Nakatani Y. Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. 2004;116:51-61.
 191. Jacob Y, Bergamin E, Donoghue MTA, et al. NIH Public Access. 2014;343(6176):1249-1253. doi:10.1126/science.1248357.Selective
 192. Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Article Integrated Molecular Meta-Analysis and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Published online 2017:520-537. doi:10.1016/j.ccell.2017.08.017
 193. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA. cIMPACT-NOW update 6 : new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. Published online 2020:1-13. doi:10.1111/bpa.12832
 194. Harutyunyan AS, Krug B, Chen H, et al. is essential for glioma tumorigenesis. Published online 2019. doi:10.1038/s41467-019-09140-x
 195. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic. 2014;14. doi:10.1038/nrc3811
 196. Shi L, Wen H, Shi X. NU Department of Epigenetics and Molecular Carcinogenesis , The University of Texas MD. *J Mol Biol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.jmb.2016.11.019

197. Oakhill JS, Steel R, Chen Z, et al. AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase. 2011;332(June):2008-2010.
198. Huang R, Xu Y, Lippincott-schwartz J, et al. Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation Article Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Mol Cell*. 2015;57(3):456-466. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.013
199. Sarikaya SD, Akkoc Y, Turgut S, Bilir SE. OPEN A novel ATG5 interaction with Ku70 potentiates DNA repair upon genotoxic stress. *Sci Rep*. Published online 2022:1-11. doi:10.1038/s41598-022-11704-9
200. Bhattacharjee S, Bose P, Patel K. Transcriptional and epigenetic modulation of autophagy promotes EBV oncoprotein EBNA3C induced B-cell survival. *Cell Death Dis*. Published online 2018. doi:10.1038/s41419-018-0668-9
201. Zhou Q, Zhang J, Cui Q, Li X. GSK1904529A , an insulin - like growth factor - 1 receptor inhibitor , inhibits glioma tumor growth , induces apoptosis and inhibits migration. Published online 2015:3381-3385. doi:10.3892/mmr.2015.3869
202. Lindh MB, Pen C, Garcia-echeverria C, Niste M, Hofmann F, Arne O. N e u r o - o n c o l o g y. 2010;12(9):967-975.
203. Wilson CB, Rosenblum ML. Acta Neuropathologm derived from human malignant gliomas *. Published online 1987:92-103.
204. Trent J, Meltzert P, Rosenblum M, et al. Evidence for rearrangement , amplification , and expression of c-myc in a human glioblastoma. 1986;83(January):470-473.
205. Bax DA, Little SE, Gaspar N, et al. Molecular and Phenotypic Characterisation of Paediatric Glioma Cell Lines as Models for Preclinical Drug Development. 2009;4(4). doi:10.1371/journal.pone.0005209

206. Nakamura M, Shimada K, Ishida E, et al. Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors 1. Published online 2007. doi:10.1215/15228517-2006-036
207. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. NIH Public Access. 2010;321(5897). doi:10.1126/science.1164382.An
208. Cancer T, Atlas G. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. 2008;455(October). doi:10.1038/nature07385
209. Schroeder KM, Hoeman CM, Becher OJ, France I. understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. 2014;75(1):205-209. doi:10.1038/pr.2013.194
210. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, et al. NIH Public Access. 2014;340(6134):857-861. doi:10.1126/science.1232245.Inhibition
211. Hashizume R, Andor N, Ihara Y, et al. b r i e f c o m m u n i c a t i o n s Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med*. 2014;20(12):1394-1396. doi:10.1038/nm.3716
212. Jain SU, Rashoff AQ, Krabbenhoft SD, et al. HHS Public Access. 2021;80(4):726-735. doi:10.1016/j.molcel.2020.09.028.H3
213. Castel D, Kergrohen T, Tauziède-Espariat A, et al. Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. *Acta Neuropathol*. 2020;139(6):1109-1113. doi:10.1007/s00401-020-02142-w
214. Yu S, Ping Y, Yi L, et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. 2008;265:124-134. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.010
215. Diserens AC, Tribolet N De, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S. Characterization of an Established Human Malignant Glioma Cell Line : LN-18 *. Published online 1981.

216. Grube S, Walter J, Freitag D, Kalff R, Ewald C. Characterization of adherent primary cell lines from fresh human glioblastoma tissue , defining glial fibrillary acidic protein as a reliable marker in establishment of glioblastoma cell culture. 2021;(November 2020):1-12.
doi:10.1002/cnr2.1324
217. Ashley DM, Riffkin CD, Lovric MM, et al. In vitro sensitivity testing of minimally passaged and uncultured gliomas with TRAIL and / or chemotherapy drugs. Published online 2008:294-304.
doi:10.1038/sj.bjc.6604459
218. Gu X, Ma Y, Liu Y, Wan Q. Measurement of mitochondrial respiration in adherent cells by Seahorse XF96 Cell Mito Stress Test. *STAR Protoc.* 2021;2(1):100245.
doi:10.1016/j.xpro.2020.100245
219. Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic Drugs: A Novel Means to Combat Apoptosis-Resistant Cancers, with a Special Emphasis on Glioblastomas. *Oncologist.* 2007;12(12):1395-1403. doi:10.1634/theoncologist.12-12-1395
220. Howarth A, Madureira PA, Lockwood G, et al. Modulating autophagy as a therapeutic strategy for the treatment of paediatric high-grade glioma. *Brain Pathol.* 2019;29(6):707-725.
doi:10.1111/bpa.12729
221. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res.* 2012;72(7):1773-1783.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3831
222. Su W, Liao M, Tan H, et al. Identification of autophagic target RAB13 with small-molecule inhibitor in low-grade glioma via integrated multi-omics approaches coupled with virtual screening of traditional Chinese medicine databases. *Cell Prolif.* 2021;54(12):1-15.
doi:10.1111/cpr.13135

223. Logan PGB and GD, Boykin S, Diez-Roux A V, et al. 基因的改变NIH Public Access. *Bone*. 2014;23(1):1-7. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0049.Autophagy
224. Xipell E, Gonzalez-Huarriz M, Martinez de Irujo JJ, et al. Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(21):30626-30641. doi:10.18632/oncotarget.8905
225. Yu J, Wu SW, Wu WP. A tumor-suppressive microRNA, miRNA-485-5p, inhibits glioma cell proliferation and invasion by down-regulating TPD52L2. *Am J Transl Res*. 2017;9(7):3336-3344.
226. Shao N, Mao J, Xue L, Wang R, Zhi F, Lan Q. Carnosic acid potentiates the anticancer effect of temozolomide by inducing apoptosis and autophagy in glioma. *J Neurooncol*. 2019;141(2):277-288. doi:10.1007/s11060-018-03043-5
227. Trejo-Solís C, Serrano-Garcia N, Escamilla-Ramírez Á, et al. Autophagic and apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12). doi:10.3390/ijms19123773
228. Shukla S, Patric IRP, Patil V, et al. Methylation silencing of ULK2, an autophagy gene, is essential for astrocyte transformation and tumor growth. *J Biol Chem*. 2014;289(32):22306-22318. doi:10.1074/jbc.M114.567032
229. Peng Y, Zhang M, Jiang Z, Jiang Y. TRIM28 activates autophagy and promotes cell proliferation in glioblastoma. *Onco Targets Ther*. 2019;12:397-404. doi:10.2147/OTT.S188101
230. Kang C, Elledge SJ. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy*. 2016;12(5):898-899. doi:10.1080/15548627.2015.1121361
231. Sanati M, Binabaj MM, Ahmadi SS, et al. Recent advances in glioblastoma multiforme therapy: A focus on autophagy regulation. *Biomed Pharmacother*. 2022;155:113740. doi:10.1016/j.biopha.2022.113740

232. Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* 2004;64(12):4286-4293. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3084
233. Xu X, Wang Z, Liu N, et al. Association between SOX9 and CA9 in glioma, and its effects on chemosensitivity to TMZ. *Int J Oncol.* 2018;53(1):189-202. doi:10.3892/ijo.2018.4382
234. Servante J, Estranero J, Meijer L, Layfield R, Grundy R. Chemical modulation of autophagy as an adjunct to chemotherapy in childhood and adolescent brain tumors. *Oncotarget.* 2018;9(81):35266-35277. doi:10.18632/oncotarget.26186
235. Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M, Blasiak J. An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme—role in pathogenesis and therapeutic perspective. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3). doi:10.3390/ijms19030889
236. Hsu SPC, Kuo JS, Chiang HC, et al. Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells. *Oncotarget.* 2018;9(6):6883-6896. doi:10.18632/oncotarget.23855
237. Yuan X, Du J, Hua S, et al. Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on human glioma cells. *Exp Cell Res.* 2015;330(2):267-276. doi:10.1016/j.yexcr.2014.09.006
238. Zhang X, Li W, Wang C, et al. Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells. *Mol Cell Biochem.* 2014;385(1-2):265-275. doi:10.1007/s11010-013-1835-z
239. Shen J, Zheng H, Ruan J, et al. Autophagy inhibition induces enhanced proapoptotic effects of ZD6474 in glioblastoma. *Br J Cancer.* 2013;109(1):164-171. doi:10.1038/bjc.2013.306
240. Sun H, Zhang M, Cheng K, et al. Resistance of glioma cells to nutrient-deprived

- microenvironment can be enhanced by CD133-mediated autophagy. *Oncotarget*. 2016;7(46):76238-76249. doi:10.18632/oncotarget.12803
241. Isakovic AM, Dulovic M, Markovic I, et al. Autophagy suppression sensitizes glioma cells to IMP dehydrogenase inhibition-induced apoptotic death. *Exp Cell Res*. 2017;350(1):32-40. doi:10.1016/j.yexcr.2016.11.001
 242. Yang Z, Bian E, Xu Y, et al. Meg3 Induces EMT and Invasion of Glioma Cells via Autophagy [Retraction]. *Onco Targets Ther*. 2022;Volume 15(July):777-778. doi:10.2147/ott.s382060
 243. Zhang C, Zhang X, Xu R, et al. Retraction Note: TGF- β 2 initiates autophagy via Smad and non-Smad pathway to promote glioma cells' invasion. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):13046. doi:10.1186/s13046-021-02219-8
 244. Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, et al. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol*. 2004;70(1):3-15. doi:10.1023/B:NEON.0000040811.14908.f2
 245. Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol*. 2015;9(8):1612-1625. doi:10.1016/j.molonc.2015.04.016
 246. Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*. 2017;36(12):1619-1630. doi:10.1038/onc.2016.333
 247. Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, Gandolfi G, Ciarrocchi A. Autophagy and epithelial–mesenchymal transition: An intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis*. 2016;7(12):1-12. doi:10.1038/cddis.2016.415
 248. Andradas C, Byrne J, Kuchibhotla M, et al. Assessment of cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabinol in mouse models of medulloblastoma and ependymoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):1-26. doi:10.3390/cancers13020330

249. Pilarski F, Rossini AJ, Ceccarelli PS. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian J Biol.* 2008;68(2):409-414. doi:10.1590/S1519-69842008000200025
250. Parker SJ, Metallo CM. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacol Ther.* 2015;152:54-62. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.003
251. Melhem JM, Detsky J, Lim-Fat MJ, Perry JR. Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. *Neurotherapeutics*. Published online 2022:1705-1723. doi:10.1007/s13311-022-01251-6
252. Shen H, Yu M, Tsoli M, et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2020;22(1):139-151. doi:10.1093/neuonc/noz140
253. Qu F, Wang P, Zhang K, et al. Manipulation of Mitophagy by “All-in-One” nanosensitizer augments sonodynamic glioma therapy. *Autophagy.* 2020;16(8):1413-1435. doi:10.1080/15548627.2019.1687210
254. Huang T, Xu T, Wang Y, et al. Cannabidiol inhibits human glioma by induction of lethal mitophagy through activating TRPV4. *Autophagy.* 2021;17(11):3592-3606. doi:10.1080/15548627.2021.1885203

