



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DÜŞÜK DERECELİ GLİOMALARDA EGFR, PTEN,
PDGFR- α , MGMT İFADELERİNDEKİ, TP53 VE P53
YOLAĞI (MDM-2 VE P14ARF) GENLERİNDEKİ
DÜZENSİZLİKLER VE KLİNİK ETKİLERİ**

PINAR EREN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. BEYAZIT ÇIRAKOĞLU

İSTANBUL-2006

ÖNSÖZ

Kanser tedavisinde karşılaşılan güçlükler artık tümör dokusunun moleküler karakterinin fenotipik karakterinden daha büyük önem taşıdığını göstermiştir. Beyin tümörleri, özellikle moleküler değişikliklerin birbirini yakından etkilediği ve uygulanacak olan tedavi biçimiyle bu değişikliklerin yakın ilişkide olduğu bir tümör grubudur. Bu çalışma ile saptanacak olan moleküler değişiklik-tedavi-sağkalım etkileşimleri, bu alanda mevcut olan birikime ekleneceği gibi hastalara uygulanacak tedavinin seçiminde de yardımcı olacaktır. Gelecekte artık sadece moleküler karakterine göre değerlendirilecek olan gliomaların özgün tedavilerinde de problem olan moleküler yolağın hedeflendiği biyoteknolojik çözümlerin ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

Doktora tez çalışmaları ve yazımı sırasında değerli bilgi, görüş ve katkıları ile beni yönlendiren, her zaman örnek aldığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu'na, bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ayşe Özer'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İltar Güney'e, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi A.D.'dan Sayın Doç. Dr. Türker Kılıç'a ve katkılarıyla çalışmalarına ışık tutan Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.'dan Sayın Prof. Dr. Aydın Sav'a, Yrd. Doç. Dr. Süheyla Bozkurt'a, Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Sayın Dr. Berrin Erdağ'a, Marmara Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji A.D.'dan Sayın Prof. Dr. Jülide Akbuğa, Yrd. Doç. Dr. Kadir Turan'a tez sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında yardımını esirgemeyen Marmara Üniversitesi Halk Sağlığı A.B.D.'dan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Topuzoğlu'na, çalışma arkadaşlarım Dr. Can Erzik, Dr. Mustafa Akkiprik, Koray Balcıoğlu, Aylin Özdemir'e ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Her aşamada yanımda olan ve beni bugünlere hazırlayan aileme, eşime ve yaşama sevincim sevgili kızım Aslı'ya sonsuz teşekkür ve sevgiler...

II) İÇİNDEKİLER

I. Önsöz	II
II.İçindekiler	III
III. Kısaltmalar	V
1. Özet	1
2. Summary	3
3. Giriş ve Amaç	5
4. Genel Bilgiler	7
4.1. Glial Tümörler ve Moleküler Düzensizlikleri	7
4.2. Gliomagenez	12
4.3. P53 Tümör Baskılayıcı Geni	17
4.3.1. P53'ün Yapısı	17
4.3.2. P53 Yolağı (MDM-2 ve P14ARF)	19
4.3.3. P53 Mutasyonları	20
4.4. PTEN ve Reseptör Tirozin Kinazlar	22
4.5. MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)	26
5. Gereç ve Yöntem	29
5.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Mevcut Olanaklar	29
5.2. Çözeltiler	30
5.3. Hasta Grubu	33
5.4. Taze Dokudan DNA İzolasyonu	33
5.5. Parafin Dokudan DNA İzolasyonu	34
5.6. P53 PZR-SSCP Tekniği	34
5.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi	37
5.6.2. SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) Analizi	37
5.6.3. Gümüş Boyama Tekniği	38
5.7. DNA Dizi Analizi	38
5.7.1. Floresan İşaretle Otomatik Dizileme	40
5.8. P14ARF- MDM-2 Multipleks PZR	41

5.9. İmmunohistokimyasal Çalışma	42
5.9.1. Yöntem	42
5.9.2. Kullanılan Primer Antikorlar ve Görüntüleme	43
5.10. İstatiksel Analiz	43
6. Bulgular	44
6.1. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm Analizi	44
6.2. Saptanan Mutasyonlar	46
6.3. Multipleks PZR (p14-mdm2)	49
6.4. İmmunohistokimyasal Analizler	50
6.5. Bulguların Analizi	54
6.5.1. İstatistiksel Sonuçlar	54
7. Tartışma ve Sonuç	65
8. Kaynaklar	72
9. Özgeçmiş	81
10. Etik Kurul Onayı	83
11. Tez İsim Değişikliği Onayı	84

KISALTMALAR

A	Adenine (Adenin)
C	Cytosine (Sitozin)
DAB	Diaminobenzidine (Diaminobenzidin)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
EtBr	Ethidium Bromide (Etidium Bromid)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
G	Guanine (Guanin)
GBM	Glioblastoma Multiforme (Glioblastom Multiform)
Mdm-2	Mouse Double Minute-2
MGMT	Methyl Guanine Methyl Transferase (Metil Guanin Metil Transferaz)
O-2A	Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (Oligodendrosit tip 2 Astrosit)
PDGFR- α	Platelet Derived Growth Factor Receptor-Alpha (Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü- Alfa)
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten (Kromozom On Üzerinde Kayıp olan Fosfataz ve Tensin Homoloğu)
PCR(PZR)	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Rb	Retinoblastoma Proteini
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)
T1A	Type-1 Astrocyte (Tip 1 Astrosit)
T	Thymidine (Timin)
TBE	Tris Boric Acid EDTA
TE	Tris EDTA
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1.ÖZET

Düşük dereceli gliomaların seyrinde önemi ispatlanan değişkenler yaş ve operasyonla tümörün çıkartılmasıdır; ancak glial tümörlerin biyolojik özelliklerinin gün ışığına çıkartılabilmesi de gerek tedavinin seçilmesinde, gerekse sağkalımın uzatılabilmesinde etkili olacaktır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar erken evre gliomaların %60'ının TP53 geni mutasyonu taşıdığını ve p53 işlev kaybının %70-80 oranında olduğunu göstermiştir. p53 işlevini etkileyen p14ARF ve mdm-2'nin düzensizlikleri erken evre tümörün ileri evreye geçişini kolaylaştıran unsurlardır.

Hücrelere farklılaşma ve büyüme sinyali ileten PDGFR- α , EGFR ve bu yolları baskılayan PTEN proteinleri gliomaların tedavisini değiştirebilecek değişkenlerdendir. Tüm bu moleküler değişimler, histopatolojik olarak tanımlanması güç olan bu tümör grubunun genetik tanısının doğrulanması veya histopatolojik tanının tekrar gözden geçirilmesini sağlamanın yanında prognoz hakkında bilgi alınabilmesine de imkan verecektir.

Bu çalışmada Nisan 1999- Ocak 2005 arasında araştırmaya katılmayı kabul eden, glioma cerrahisi geçiren, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin Cerrahisi AD kontrolündeki 39 ve Haydarpaşa Numune Hastanesi kontrolündeki dokuz hastanın tümör dokuları alınmış; DNA izolasyonunu takiben SSCP tekniği kullanılarak TP53 mutasyonları saptanmıştır. mdm2 amplifikasyonu ve p14 delesyonu multipleks PZR yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca tümörlerin parafin dokularında p53, MGMT, EGFR, PDGFR- α ve PTEN proteinlerinin varlığı immunohistokimyasal yöntemle araştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 12'si astrositoma, 16'sı oligodendroglioma ve 20'si oligoastrositoma tanısı konulan 48 hastadan 22'sinde TP53 mutasyonu saptanmıştır. p53 proteini anlatımının üç histopatolojik grupta da mutasyonlu örneklerde mutasyon taşımayanlara oranla anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Sağkalım analizlerinden TP53 mutasyonu taşıyanların sağkalım süresinin taşımayanlara göre daha kısa olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara ek olarak astrositoma ve oligoastrositomalarda EGFR, PDGFR- α ve PTEN anlatımlarının arttığı saptanmıştır. Ayrıca MGMT ve p53 anlatımlarının tümör yerleşimine göre değişiklik gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler; Düşük dereceli glioma, TP53 mutasyonları, EGFR-PDGFR- α -PTEN anlatımı, MGMT anlatımı, sağkalım.

2.SUMMARY

ABERRATIONS IN EGFR, PTEN, PDGFR- α , MGMT EXPRESSIONS, TP53 AND p53 PATHWAY (MDM-2 AND P14ARF) GENES IN LOW GRADE GLIOMAS AND THEIR CLINICAL EFFECTS

Age and surgical resection of tumor mass are accepted variables effective on glioma progression but distinction of biological properties of glial tumours is important for both selection of appropriate treatment and prolongation of the survival. Researches confirmed that TP53 mutations are present in 60% of the initial stage gliomas and 70-80 % of all gliomas had loss of TP53 gene function. p14ARF and mdm2 aberrations especially found on progression through higher grade gliomas.

Differentiation and growth signal transmission modulator PDGFR- α and EGFR and their suppressor PTEN create faith of glioma cells. Determination of these aberrations could help verifying the genetic diagnosis and reviewing histopathological diagnosis in this complex tumour group. Not only confirmation of the diagnosis but also getting idea about the prognosis could be possible.

In this study, tumour tissues of 39 and nine patients, accepted informed consent and had glioma surgery, applied to Marmara University Neurosurgery Department and Haydarpasa Numune Hospital between April 1999- January 2005 respectively are used; Following DNA isolation TP53 mutations were detected by SSCP. mdm2 amplifications and p14 deletions were studied with multiplex PCR. Simultaneously from the paraffin tissues, p53, MGMT, EGFR, PDGFR- α and PTEN expressions were detected immunohistochemically.

Of the 48 cases, composed of 12 astrocytomas, 16 oligodendrogliomas and 20 oligoastrocytomas, 22 patients had TP53 mutations. p53 expression was increased in mutation positive specimens. TP53 mutation carriers lived shorter compared to non-carriers. PDGFR- α , EGFR, PTEN expressions were increased in astrocytomas and oligoastrocytomas and according to tumour location MGMT and p53 expressions were different.

Key Words; Low grade glioma, TP53 mutations, EGFR-PDGFR- α -PTEN expressions, MGMT expression, survival.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Beynin merkezi rolü ve nöronal yıkımın yol açtığı işlevsel kayıplar primer beyin tümörlerinin önemini göstermektedir. Tüm intrakranial tümörler, en iyi huylu olanlarının bile invazyon ve ileri evreye dönüşebilme özellikleri nedeniyle, öldürücüdürler. Tümör örneklenmesi yetersizliği nedeniyle değişik fenotipte hücreleri birlikte bulunduran tümörlerin tanımlanmasında tümör bileşenlerinin oranlarına göre geliştirilen sınıflandırma yöntemleri göreceli kalabilmektedir (12, 24). Bu nedenle histolojik tanının tek başına yeterli olmadığı düşünülmektedir (12, 22, 24, 33). Sağkalım süresi ortalama olarak astrositomalarda 5-8 yıl, oligodendrogliomalarda ise 12-16 yıldır (23).

Gliomalarda histopatolojik tanı dışında prognozu etkileyen iki ana etken yaş ve cerrahi yoluyla tümörün çıkartılmasıdır (85). Genç yaş grubunda gliomaların iyi prognozlu olduğu bilinmektedir (15, 85). Son yıllarda glioma insidansının artış gösterdiği yaşlı popülasyonda sağkalım süresi oldukça kısadır (15).Biyolojik değişkenler araştırıldığında bu tümörlerin % 60'ında TP53 mutasyonlarının bulunduğu, ayrıca %70-80'inde ise p53'e bağlanarak yıkımına yol açan mdm-2'nin artışı nedeniyle işlev kaybı olduğu saptanmıştır. p53'ün DNA'ya bağlanma bölgesini etkileyen mutasyonların %75'i G:C den A:T'ye dönüşüme yol açan mutasyonlardır ve bu mutasyonların %50'si CpG adacıklarında konuşlanmıştır (71, 77). Bu durum metillenme sonrası devreye girip TP53'ün bu bölgelerinde oluşan O⁶-metilguaninin demetilasyonu için gerekli olan MGMT enzimine dikkat çekmektedir. Kromozom 9p21 bölgesinden alternatif kırılma ile oluşan p16 ve p14ARF proteinleri, hücre döngüsünü G1 ve G2 safhalarında duraklatarak kontrolsüz hücre çoğalmasının engellenmesini sağlarlar. Hücre döngüsünü kontrol eden p53 ve Rb yollarının kavşak noktasını oluşturan bu iki proteinin kodlandığı 9p21 bölgesinin mutasyon ve küçük delesyonları ileri evre (anaplastik) gliomalar ve GBM'de saptanmıştır. Bu gen ürünlerinin inaktivasyonu düşük dereceli gliomalarda daha büyük bir oranda p16 ve p14ARF metillenmesi ile gerçekleşmektedir (91). Gliomagenezde etkin olan çift etkili fosfataz enzimi olan PTEN'in veya bulunduğu lokus 10q23'ün delesyonu özellikle GBM'lerde %70-80 gibi yüksek oranlarda saptanmıştır (90, 91). Lipid fosfataz özelliği ile hücre içinde fosfatidil 3 fosfatı azalttığından PTEN inaktivasyonu Akt yolağını aktif hale

getirir ve böylece hücre çoğalmasına yol açar. Yapısal olarak hücre iskeletinde etkin olan Tensin'e benzerlik göstermektedir ve hücre yayılımı ve hareketliliğini önlediği düşünülmektedir (19). PTEN'in baskıladığı Akt'nin Mdm2'yi fosforile ederek p53 yıkımına dolaylı olarak katkıda bulunduğu gösterilmiştir (75). Tümör baskılayıcı genler dışında büyüme faktörlerinin değişimi de tümör alt tiplerinin belirlenebilmesi ve tümöre etkin tedavi geliştirilmesi için araştırılmaktadır. Büyüme faktörü reseptörleri PDGFR- α ve EGFR birer tirozin kinazdırlar. PDGFR- α anlatımının ventral alanda 11. embriyonik günden sonra oligodendrosit öncüllerinde bulunduğu histolojik çalışmalarla gösterilmiştir (5). Düşük dereceli gliomalarda PDGFR- α anlatım artışı ve TP53 mutasyonunun varlığı arasında önemli bir ilişkinin bulunması dikkat çekicidir (88).EGFR geni GBM lerin %35'inde amplifiye olmuştur. EGFR amplifikasyonunun yabanıl tip TP53 bulundurmeyen tümör hücrelerinde daha sık gerçekleştiği saptanmıştır. p53 ve büyüme faktörleri arasındaki bu ilişki gliomagenezde genetik olarak iki farklı yolağın bulunduğunu göstermektedir (18). Gliomalarda tedavi konusunda da bugüne kadar standart bir protokol saptanamamıştır. Astrositomaların radyoterapiye, oligodendrogliomaların ise kemoterapiye duyarlı olduğu bilinmektedir (12, 23, 24).

Kemoterapiye direnç bir DNA tamir proteini olan MGMT'nin anlatımının azalmasıyla gelişmektedir (84). TP53 mutasyonu taşıyan astrositomalarda ise radyoterapiye direnç söz konusudur (84). Özellikle TP53 mutasyonlarının sık karşılaştığı düşük evre tümörlerde radyoterapiye yanıtın değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu yaklaşımla MGMT proteinin artışı ile kemoterapiye dirençli olabilecek vakalar önceden tayin edilebilir. p53'ün etkilediği PTEN ve onun baskı altına aldığı büyüme faktörleri EGFR ve PDGFR- α yolağları tümörün prognozu yönünden çok önemli noktaları açıklığa kavuşturacaktır. Yukarıda özetlenen bilgilerin ışığında planlanan ve yürütülen bu tez çalışmasında tanı konulması güç olan ve tedavi biçimleri, klinik seyirleri konusunda standart bir görüş bulunmayan gliomaların moleküler kimliklerinin tanımlanması ve klinik seyre etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Gliomaların farklı histolojik tiplerinin oluşum nedenlerinin yanında tedaviye yanıtta da etkili olan moleküler değişimler bu tümörlerin hem tanımlanmalarında hem de takiplerinde yol gösterecektir. Bu çalışmada TP53 mutasyonu varlığı ve hedef proteinlerin anlatımlarının sağkalım ile arasındaki ilişki araştırılarak üç düşük dereceli histolojik glioma grubunda bu değişimlerin prognoza, sağkalıma ve birbirlerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Glial Tümörler ve Moleküler Düzensizlikler

Beyin tümörlerinin %60'ını oluşturan, nöron destek dokusundan kaynaklanan gliomalar fenotipik olarak Oligodendroglioma, Astrositoma ve Oligoastrocitoma şeklinde üç ana gruba ayrılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2000'de geliştirmiş olduğu sınıflandırma ile Gliomalar dört ana derece grubu oluşturacak şekilde, anaplastik değişiklikler olan mitoz, nekroz, çekirdek atipisi, mikrodamar artışı değerlendirilerek sınıflandırılır(Tablo.1)(8, 25, 43).

Tablo 1. GLİOMALARIN WHO DERECE (GRADE) SINIFLANDIRMASI

- ASTROSİTOMALAR
- Piloitik WHO DERECE I
- Astrositom WHO DERECE II
- Anaplastik WHO DERECE III
- Glioblastoma Multiform WHO DERECE IV

- OLİGODENDROGLİOMALAR
- Oligodendroglioma WHO DERECE II
- Anaplastik Oligodendroglioma WHO DERECE III
- Glioblastoma Multiform WHO DERECE IV

- EPENDİMOMALAR
- Subependimoma WHO DERECE I
- Ependimoma WHO DERECE II
- Anaplastik Ependimoma WHO DERECE III

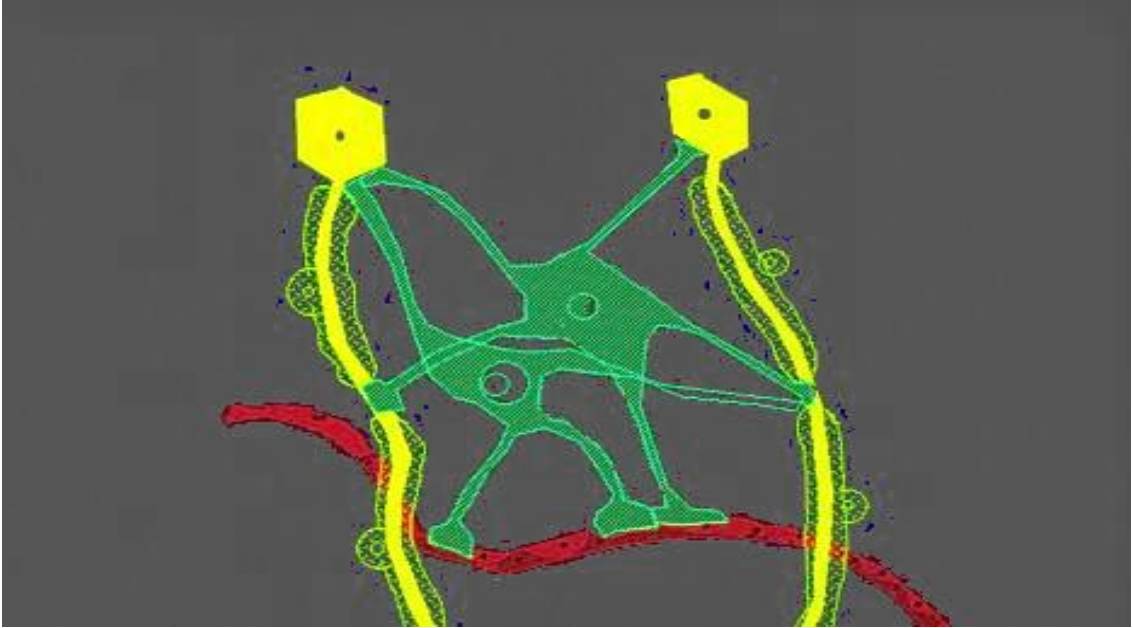
- KARMA GLİOMALAR
- Oligoastrozitoma WHO DERECE II
- Anaplastik Oligoastrozitoma WHO DERECE III
- Glioblastoma Multiform WHO DERECE IV

Astrozitomalar içerdikleri hücrelerin morfolojilerine göre 3 alt gruba ayrılırlar (25):

Fibriler Astrozitoma yaygın sitoplazması ve ince uzantıları bulunan hücrelerin oluşturduğu fibrilden zengin tümör stroması ile tanımlanır.

Protoplazmik Astrozitoma mikrokistik veya mukoid matriks içine gömülmüş seyrek uzantıları bulunan küçük eozinofilik sitoplazmalı neoplastik astrozitlerden oluşur.

Gemistositik Astrozitomada tanı, tümör bütünü içinde bulunan gemistositik neoplastik astrozitlerin tüm hücrelerinin %20'si ve üzerinde bulunması ile yapılabilir (Şekil 1).



Şekil 1. Astrozitler (yeşil renkli hücreler) ve Oligodendrositler (aksonların çevrelerinde yerleşen sarı taralı alanla gösterilen hücreler)

Derece I, çocuk yaşlarda saptanabilen, prognozu iyi olan pilositik astrozitoma olarak da adlandırılan evreyi oluşturur. Derece II, 20'li 30'lu yaşlarda saptanan, yavaş ilerleyerek Derece III ve IV'e dönüşebilen evredir (18). Derece III anaplastik değişimlerin sık görüldüğü ve hızla derece IV'e geçiş gösteren tümörlerdir (12). Derece IV, gliomalarda yolun sonu olarak değerlendirilir. Sağkalım 1-2 ay ile sınırlıdır.

Glioblastoma Multiform (GBM) olarak da isimlendirilir. GBM'ler iki ayrı yolla oluşur: Primer GBM (de novo); 50 yaş üzeri hastalarda saptanır . Sekonder GBM ise düşük dereceli gliomaların zaman içinde değişime uğraması ile oluşan TP53 mutasyonlarından kaynaklanır ve daha çok genç yaş grubunu etkiler (8, 49).

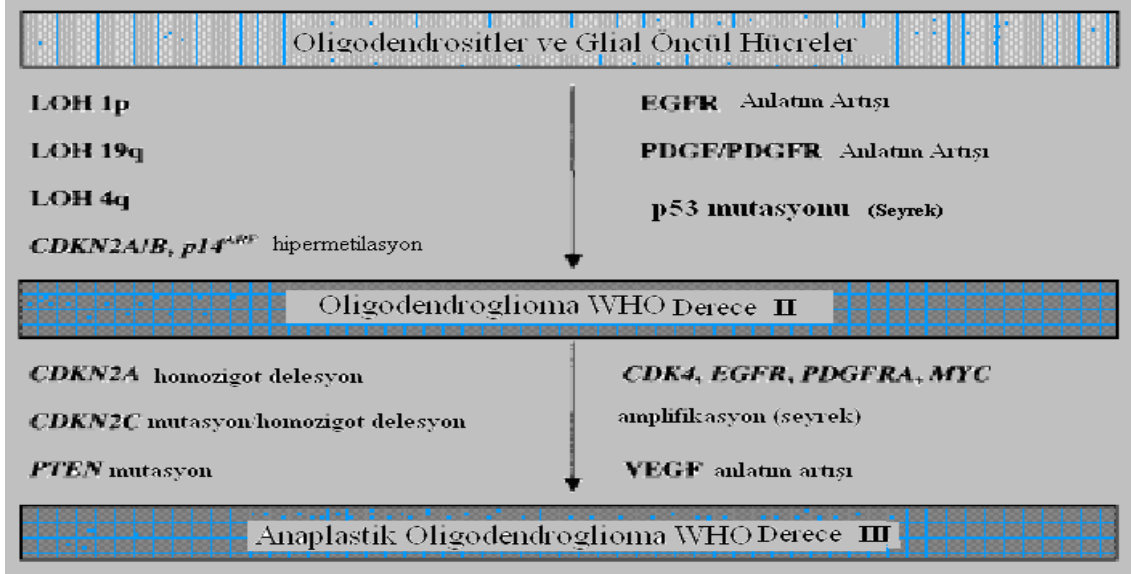
Gliomaların cerrahi olarak tümüyle çıkartılması, normal beyin dokusunun içine yoğun olarak nüfuz etmiş olmaları nedeniyle güçtür. Ayrıca diğer sistem tümörlerinin cerrahi yaklaşımının tersine tümör dokusunun yanında normal beyin dokusuna olabildiğince dokunulmaması hastaların ameliyat sonrası yaşam kalitesi ve ölüm oranlarının belirlenmesinde etkilidir. Bu nedenle ameliyat sonrası görüntüleme yöntemleri ile kalıntı tümör kitlesi saptanması genel bir yaklaşımdır. Bu durum rekürrens ve prognozda etkili bulunmuştur (31, 40, 85).

Johannesen ve arkadaşlarının yaptıkları uzun izlem süreli, populasyon kaynaklı çalışmada, 1970-1981 ile 1981-1993 zaman dilimleri karşılaştırıldığında, 15-49 yaşları arasındaki genç, nöro-epitelial tümörlü yetişkinlerin sağkalım sürelerinin uzadığı (%16.5 ve %33.1) saptanmıştır. Bu farklılığın cerrahi sonrasındaki kalıntı tümör kitlesinin görüntüleme teknikleri ile daha doğru olarak saptanması ve tümör örneklemesinin daha doğru yapılabilmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (40). Tümörün histolojik olarak 'iyi' tanımlanabilmesi ile sağkalımda kaydedilen başarı moleküler karakterinin belirlenmesi ile de tedaviye yönelik açılımlar getirecektir (40).

Sağkalım ile bu iki değişken dışında ilişkilendirilebilecek biyolojik unsurlar araştırıldığında bu tümörlerin % 60'ında TP53 mutasyonlarının bulunduğu ayrıca %70-80'inde ise p53'e bağlanarak yıkımına yol açan mdm-2'nin artışı nedeniyle işlev kaybı olduğu saptanmıştır. Başlangıçta yapılan yayınlarda TP53 mutasyonlarının glioma hastalarının sağkalım sürelerine etkisi konusunda tartışmalı sonuçlara ulaşılmıştır, ancak daha sonra yapılan çalışmalarda tümörün hayli heterojenik olması nedeniyle bu çelişkinin doğduğu sonucuna varılmıştır (60). Astrositomalarda fenotipik olarak eliptik hücrelerin oluşturduğu gemistositik astrositoma grubunda sağkalım süresinin diğer gruba göre daha kısa olduğu bilinmektedir. Gemistositik astrositomalarda TP53 mutasyonları siktir. Bu kötü prognozlu astrositoma alt grubunda TP53 mutasyonlarının kötü prognoza işaret ettiği belirlenmiştir (60).

Oligodendrogliomalarda 1p, 19q delesyonu, astrositomalarda ise TP53 mutasyonu en sık rastlanan moleküler düzensizliklerdir. Tablo 2 ve 3’de sırasıyla oligodendroglioma ve astrositomadaki moleküler düzensizlikler görülmektedir.

Tablo 2. Oligodendrogliomaların derecelere göre taşıdıkları moleküler özellikler (25, 61)



Tablo 3. Astrositomaların derecelere göre taşıdıkları moleküler özellikler

	Düşük Dereceli Astrositoma	→	Anaplastik Astrositoma	→	Glioblastoma	
Sağkalım	2-10 yıl		2-3 yıl		9-12 ay	
Proliferasyon	+/-		++		+++	
İnvazyon	++		++		+++	
Anjiogenez	-		-		+++	
Nekroz	-		-		+++	
Tedaviye Cevap	-		++		-	
	<p>p53 mutasyonları PDGF/R anlatım artışı</p>		<p>RB mutasyonu CDK4 amplifikasyonu INK4a/ARF kaybı PTEN kaybı DMBT1 kaybı 19q kaybı 11p kaybı</p>		<p>EGFR amplifikasyonu EGFR mutasyonu INK4a/ARF kaybı PTEN kaybı RB mutasyonu PTEN mutasyonu</p>	

TP53 mutasyonlarından kodon 175 Arg →Gly değişiminin özellikle kısa sağkalım süresiyle ilişkili olduğu bulunmuştur(32, 36). Aynı şekilde kodon 175 mutasyonu taşıyan kolon ve meme tümörlerinde de sağkalım süresinin belirgin olarak kısa olduğu bilinmektedir (38, 51). Diğer yoğun mutasyon noktaları olan kodon 248 ve kodon 273 değişimleri sonunda ise p53'ün DNA'ya kısmen bağlanabildiği ve tümör baskılama özelliğinin tamamen ortadan kalkmadığı gösterilmiştir (15, 18). Bu grupta prognoz kodon 175 mutasyonu taşıyan gruba göre daha iyidir. DNA'ya bağlanma bölgesini etkileyen mutasyonların %75'i G:C den A:T'ye dönüşüme yol açan mutasyonlardır ve bu mutasyonların %50'si CpG adacıklarında yerleşmiştir (71, 77). Bu durum metillenme sonrası devreye girip TP53'ün bu bölgelerinde oluşan O⁶ metilguaninin guanine dönüştürülebilmesi için gerekli olan MGMT enzimine dikkat çekmektedir. MGMT proteini guaninin 6. oksijen atomuna bağlanan alkil gruplarını kendi sistin aminoasidine bağlayarak guaninin normal yapısına kavuşmasını sağlar. TP53 mutasyonları değerlendirilirken intron bölgeleri mutasyonlarının özellikle intron 3 ve 7'de bulunması dikkat çekicidir (71, 77). Ancak bu mutasyonlar proteinin merkez bölgesinde yerleşim gösteren mutasyonlara oranla daha seyrek.

4.2.Gliomagenез

Dış ya da iç kaynaklı bir onkogenik uyarı gerçekteştiğinde normal hücre, hücre döngüsü duraklaması ve DNA hasarı tamiri veya hasar büyük ise programlı hücre ölümü mekanizmalarını çalıştırırken, kanser hücresi genom kararsızlığına rağmen yaşamını devam ettirir. şekil 2' deki moleküler düzensizlikler, gliomaların kaynaklandıkları nöroglial hücrelerde genomik kararsızlık oluşmasında rol oynayan başlıca düzensizliklerdir.

Nöroglial hücreler astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücrelerden oluşurlar. Bu hücreler sinir hücrelerinin korunması ve devamlılığı için önemlidir. Tüm merkezi sinir sistemi hücreleri embriyonun oluşumu sırasında nöroektodermden veya nöral plaktan gelişir. İki öncül hücre dizisinden T1A ve O2A farklılaşarak astrositler ve oligodendrositleri oluşurmaktadır ve T1A'nın sinir sisteminde yapısal anlamda rol

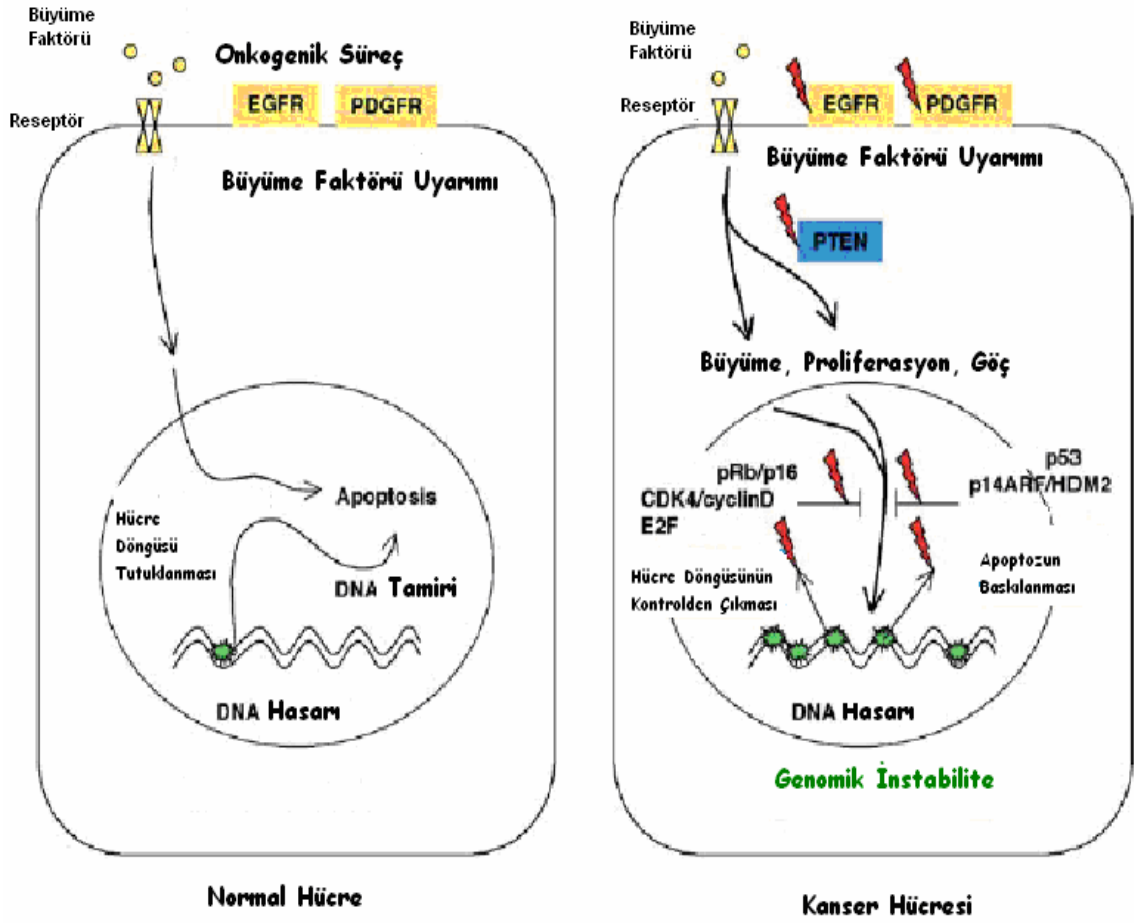
oynadığı ve O2A'nın aksonal iletide işlevsel görevi olan özelleşmiş hücreleri oluşturduğu düşünülmektedir (59).

Astrositler sinir hücrelerine, fiziksel ve biyokimyasal destek sağlanması, nöronların alıcı yüzeylerinin yalıtımı ve kılcal damar endotel hücreleriyle kan-beyin sınırının oluşturulmasında görev alırlar ve bunun yanında hasarlanmış beyinde gliosis denilen "iz" dokusunu oluştururlar. Ayrıca bu hücreler nöronal hücrelerin göçlerinde, sinaptik geçişin düzenlenmesinde, sinaps sayısının kontrol edilmesinde ve nöronun enerji metabolizmasında rol oynarlar.

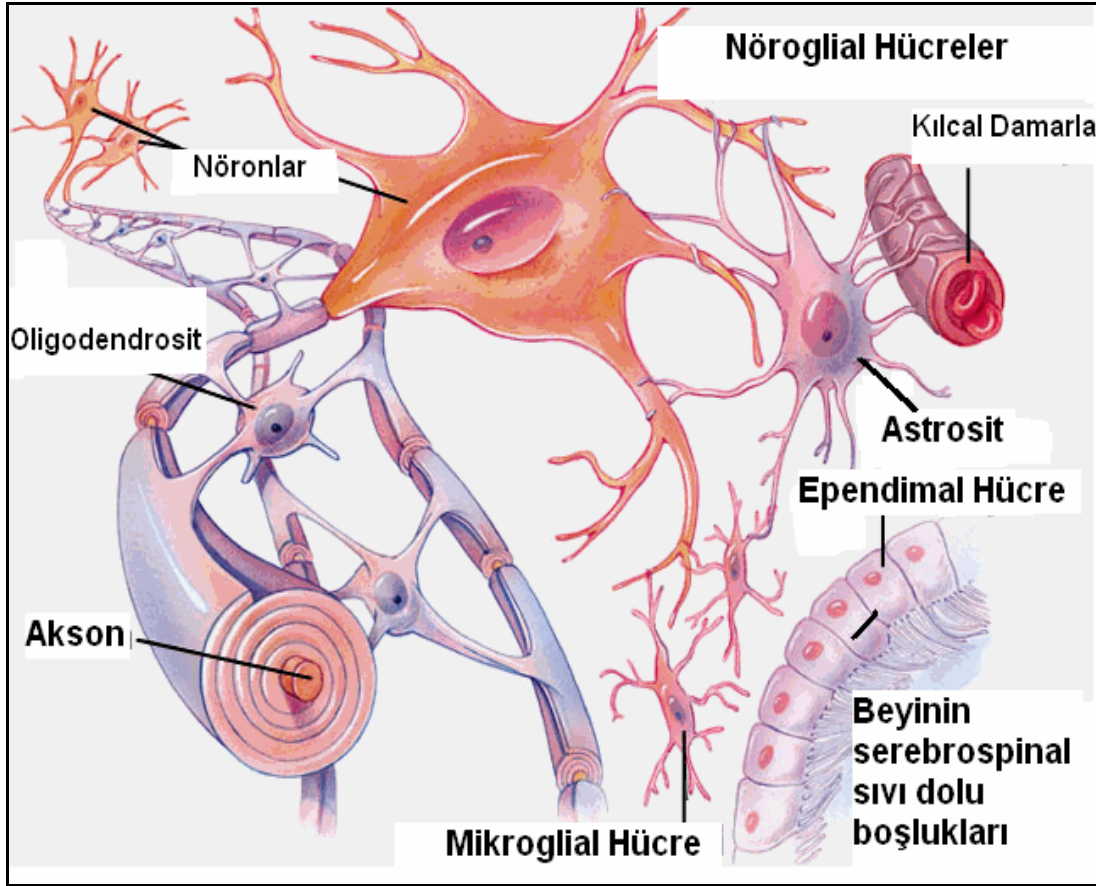
Oligodendrositler merkezi sinir sisteminde myelinin üretilmesini ve devamlılığını sağlarlar ve periferik sinir sistemindeki Schwann hücrelerinin benzerleridirler.

Ependimal hücreler ise tek katlı hücre tabakası oluşturarak serebral ventriküllerin yüzeyini kaplarlar. Ayrıca düzenli sıvı alış-verişi kan-beyin bariyerinde ve ventriküler ependimada gerçekleşir (59).

Gliyal hücreler ve yerleşimlerini gösteren Şekil 3'de sinir hücreleri aksonlarını çepeçevre saran oligodendrositler, uzantıları ile damarları çevreleyerek nöronlar ve kan damarları arasında köprü oluşturan astrositler ve ventriküler boşlukların yaygısını oluşturan sıvı değişiminde etkin olan ependimal hücreler izlenmektedir.

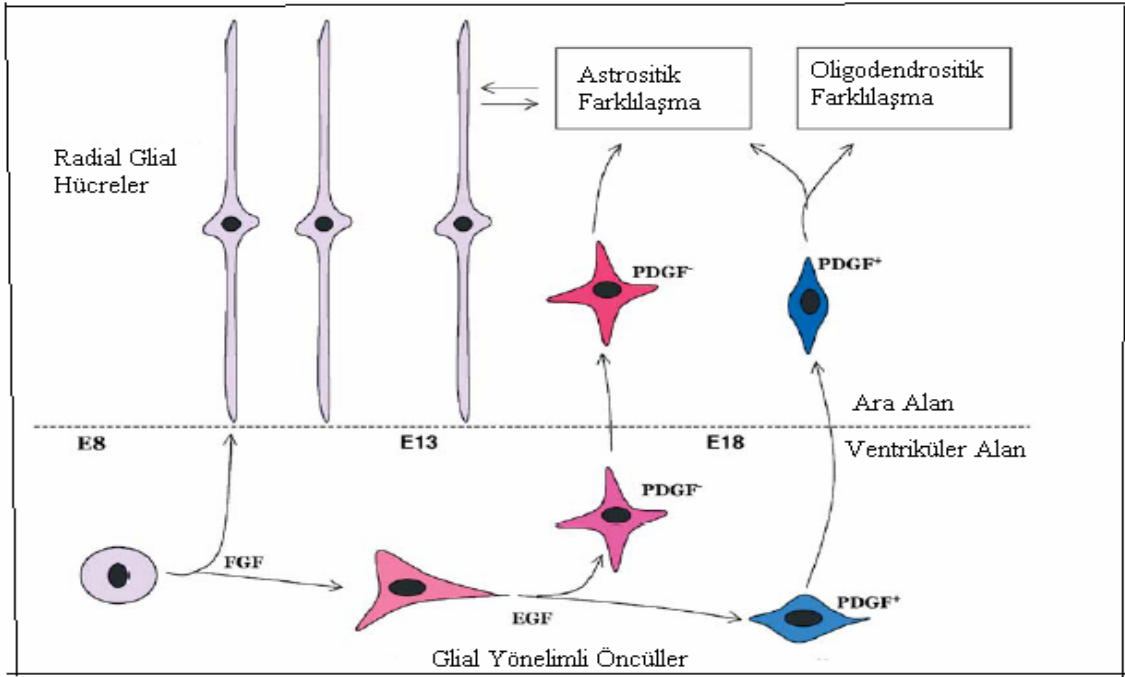


Şekil 2. Normal hücre ve kanser hücresinin onkogenik strese verdikleri cevaplar. Dış veya iç kaynaklı stres durumunda normal hücre, DNA tamiri ve programlı hücre ölümü mekanizmalarını aktif duruma getirirken, kanser hücresi yeterli hücre döngüsü tutuklanması ve apoptoz gerçekleştiremediğinden genomik kararsızlığına rağmen yaşamına devam eder (49).

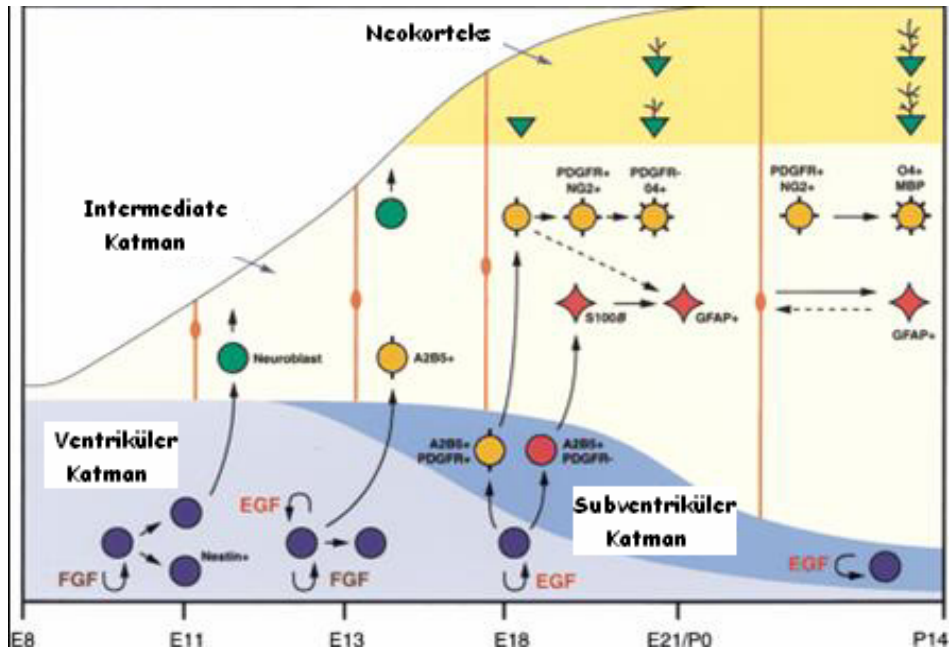


Şekil 3. Glial destek dokusunu oluşturan hücre tipleri ve yerleşimleri (81).

Sekizinci embriyonik günde ventriküler alandaki kök hücreler Fibroblast Büyüme Faktörü 'ne (FGF) cevap vererek ara alandaki radial glial hücreleri oluştururlar. Radial glial hücreler ise ventriküler alandan göç ederken nöronal ve glial hücrelerin öncüllerini oluştururlar. Onüçüncü embriyonik günde pluripotent kök hücreler Epidermal Büyüme Faktörü'ne (EGF) daha duyarlı hale gelerek glia yönlenimli öncülleri oluştururlar. Onsekizinci günde ventriküler alandaki kök hücreler sadece EGF'e duyarlıdır ve glia yönlenimli PDGF R⁺ ve PDGFR⁻ öncülleri oluştururlar (Şekil 4, Şekil 5). Bu hücreler de ventriküler alandan ara alana göç ederek oligodendroglial veya astrositik farklılaşma sürecine girerler. Oligodendrosit öncülleri astrositleri ve astrositler ise tekrar farklılaşarak radial glial hücreleri oluşturabilirler. Radial glial hücrelerin astrositlere ya da astrositlerin radial glial hücrelere dönüşebilmeleri hücre potansiyelinden çok çevre uyarıların etkileriyle oluşmaktadır (49).

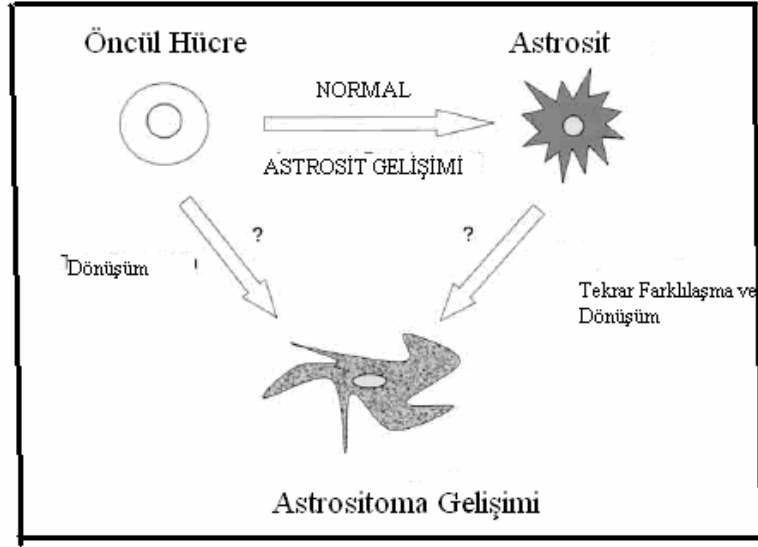


Şekil.4. Glial Hücrelerin Embriyonik Gelişimi. Şekilde glial tanımlanmış öncüllerin büyüme faktörleri etkisiyle embriyonik günler 8, 13, 18’ de değişimleri görülmektedir (49).



Şekil 5. Embriyonik gelişim sırasında kök hücreler, büyüme faktörleri etkisi altında ventriküler katmandan subventriküler, intermediate katmana ve neokortekse göç edişleri sırasında farklılaşarak nöronları (yeşil), oligodendrositleri (sarı) ve astrositleri (kırmızı) oluştururlar (2, 20).

Astroditomaların ve oligodendrositomaların gelişim basamaklarında kaynak aldıkları hücre tipinin sorgulanması iki ayrı hipotezi ortaya çıkartmıştır. Birincisi tümör hücrelerinin doğrudan öncül hücreden geliştiği diğeri ise tümör hücrelerinin gelişim sürecini tamamlamış olan olgun astrositten tekrar farklılaşma ile oluştuğu hipotezidir. Bu hipotezlerin doğruluğu henüz kanıtlanamamıştır (Şekil 6). Ancak olgun astrositlerin deneysel olarak embriyoya ekilmesiyle sadece ekim bölgesindeki hücrelerin değil ayrıca ekim bölgesinden farklı bölgede de radial glial hücrelere tekrar farklılaştıkları gözlemlenmiştir (44,49). Holland ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada nöronal öncül hücrelerden glioma hücrelerine dönüşüm gösterilmiştir (44). Ancak Depinho ve arkadaşları aynı dönüşümün olgun astrositlerde de geçerli olduğunu kanıtlayarak hem nöronal kök hücre kimliği taşıyan nestin+ ve hem de astrositoma kimliği taşıyan GFAP+ hücrelerin glioma hücrelerine dönüşebildiklerinin anlaşılmasını sağlamışlardır (44).

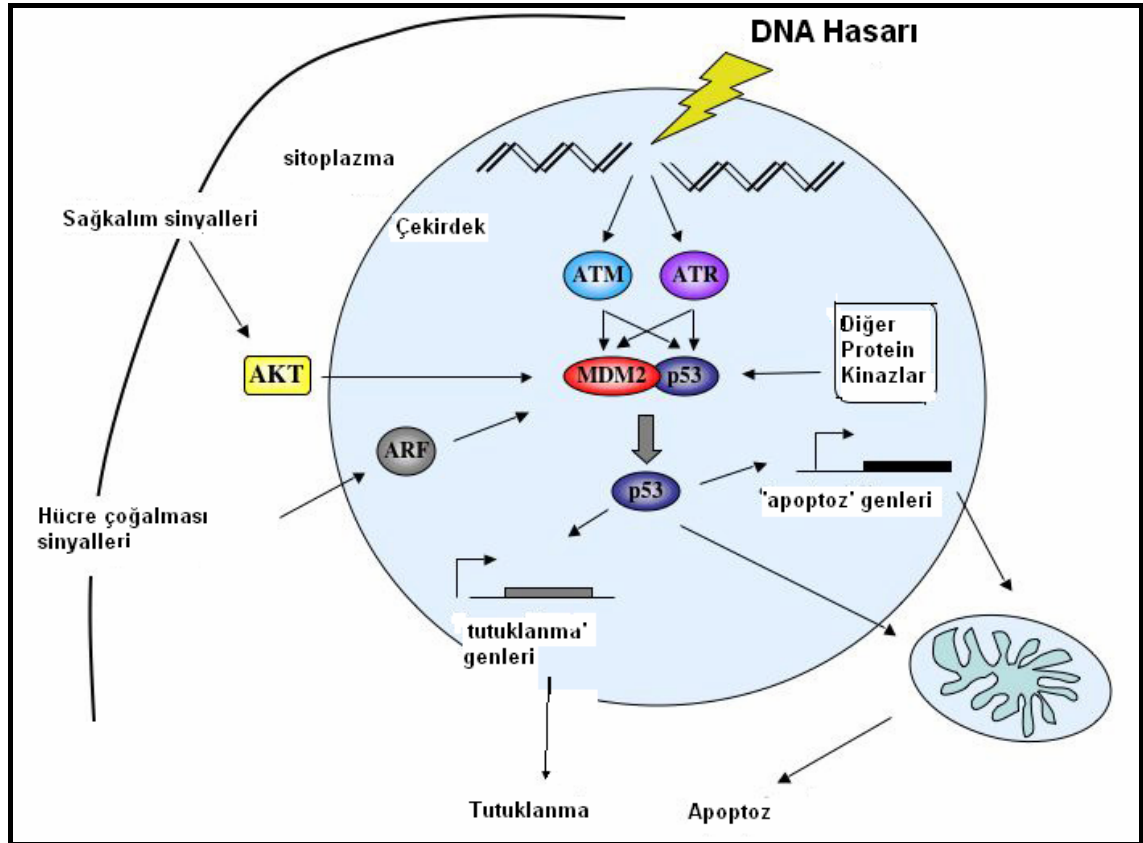


Şekil 6. Astroditomaların gelişimi hipotezleri (44).

4.3. TP53 Tümör Baskılayıcı Geni

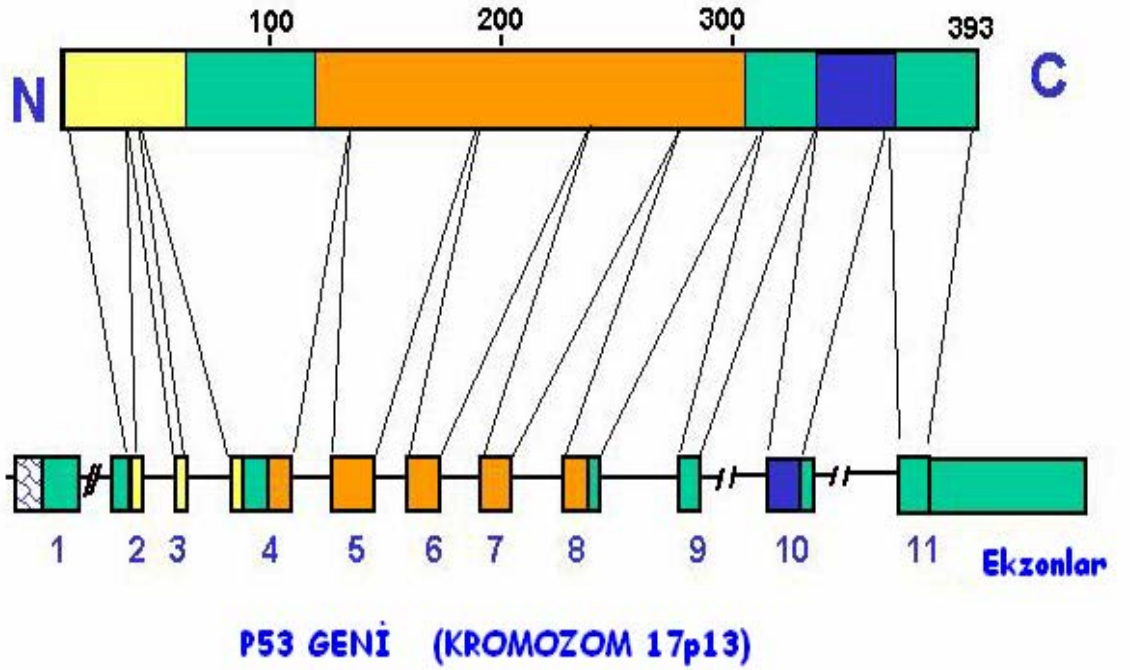
4.3.1. p53 Yapısı

P53 DNA'ya diziye özgü bağlanan 393 aminoasitten oluşan bir transkripsiyon faktörüdür. Normal hücre gelişiminde önemli olan DNA hasar tamiri, hücre döngüsü duraklaması, apoptoza gidiş, anjiogenez, redox düzenlenmesi, metastaz, nitrik oksit üretimi ve protein yıkımında etkili geniş gen paneli ürünlerinin anlatımını artırır (35). Anlatımı transkripsiyon sonrası düzenlenir ve normal hücrelerde çok az miktarda bulunur. Mdm-2 p53'e bağlanarak aktivasyon işlevsel alt biriminin işlevini bozar. Böylece mdm-2 ubiquitin-proteozom yolağı ile p53 proteinin yıkımını sağlar. DNA hasarı olduğunda p53'ün mdm-2 ile bağlanan bölgesine fosfor bağlanır. p53 mdm-2 bağı zayıflar ve p53 mdm-2 baskısından kurtulur. mdm-2 geni, p53'ün transkripsiyonel hedeflerinden biridir (Şekil 7) (80).



Şekil 7. Sağkalım sinyalleri nükleus içinde p53'ün mdm-2 ile bağlanmasını sağlarken aşırı hücre çoğalması sinyalleri p14ARF etkisiyle mdm-2'nin neden olacağı p53 yıkımını sağlar (82).

Amino ucundan başlayarak sırasıyla; Transkripsiyon-aktivasyon, DNA'ya diziye özgü bağlanan merkez ve özgül olmayan DNA ile etkileşim işlevsel birimlerinden oluşur. Görevini yerine getirebilmesi için karboksil ucundaki işlevsel birimi yardımıyla tetramerler oluşturur.

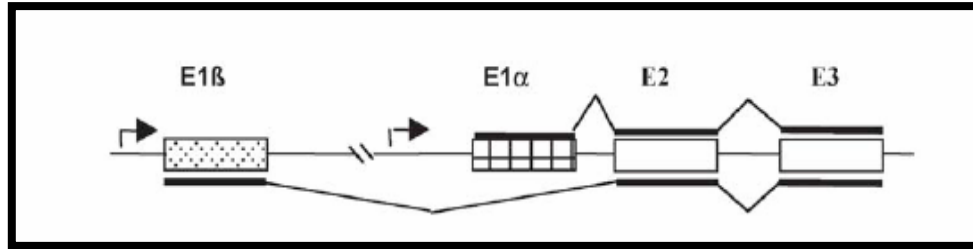


Şekil 8. TP53 geni ekzonları ve kodladıkları bölgeler.

Onbir ekzondan oluşan TP53 geninin DNA'ya diziye özgü bağlanmasını sağlayan merkez işlevsel birimi 5, 6, 7 ve 8. ekzonlarca kodlanır ve DNA'ya bağlanma bölgesi 100. ve 300. aminoasitler arasında kalan bölgesini içermektedir (Şekil 8) (80).

4.3.2. p53 Yolağı (mdm-2 ve p14ARF)

mdm-2'nin yanısıra bu yolağın önemli diğeri bir düzenleyicisi olan p14 ARF proteini 9p21 lokusundan kodlanır. (CDKN2A) p14ARF, p53/mdm2 bileşimine bağlanarak mdm2 yoluyla oluşan p53 yıkımını önler. p53 olumsuz geribesleme yolu ile p14 ARF nin ekspresyonunu azaltıcı etki gösterir. E1β ekzonu tarafından kodlanan p14 ARF nin amino uç işlevsel alt birimi mdm-2 ye bağlanıp G1 tutuklanmasını sağlar. Şekil 9'da görüldüğü üzere CDKN2A bölgesindeki ekzon 1α, ekzon 2, ekzon 3 p16'yı kodlarken, ekzon 1β, ekzon 2 ve ekzon 3 p14ARF'yi kodlamaktadır (49).



Şekil 9. CDKN2A geni yapısı. Alternatif kırılma ile p14ARF proteininin oluşması. (49).

Ichimura ve ark. çalışmalarında primer astrositik gliomalarda G1-S kontrol sistemindeki bozuklukların hemen hemen her zaman p53 yolağı inaktivasyonu ile birlikte olduğunu göstermişlerdir (36).

Yüz doksan astrositik gliomada yapılan çalışmada TP53 mutasyonu Glioblastomaların %36'sında, Anaplastik Astrositomaların %67'de ve Astrositomaların %67'sinde saptanmıştır (36).

mdm-2 amplifikasyonu Glioblastomaların %8'inde saptanırken anaplastik astrositoma veya astrositomaların hiçbirinde bulunmamıştır. P14 ARF nin 4 mutasyonu CDKN2A'nın 2. ekzonunda bulunmuştur ve 48 glioblastoma ve 3 anaplastik astrositomada homozigot E1B delesyonu saptanmıştır. mdm-2 amplifikasyonu olan tümörlerin hiçbirisinde TP53 mutasyonu veya p14ARF delesyon/mutasyonu saptanmamıştır. Tüm üç gendeki anormallikler birleştirildiğinde glioblastomaların %76'sında, anaplastik astrositomaların %72'sinde ve astrositomaların %67'sinde ya TP53 mutasyonu, ya mdm-2 amplifikasyonu ya da p14 ARF'nin mutasyon veya homozigot delesyonuna rastlanmıştır. p53 yolağının ve G1-S kontrol genlerinin düzensizlikleri arasındaki ilişki tüm tümör safhalarında anlamlı bulunmuştur (36)

mdm-2 amplifikasyonunun hemen her zaman RB1 mutasyonu veya CDK4 amplifikasyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür.(cdk4 ve mdm2 12q13-15 bölgesinde birbirlerinden 4Mb uzaklıktadırlar) (80).

p53 mutasyonunun glioblastomaya göre astrositomalar ve anaplastik astrositomalarda daha sık bulunduğu, TP53 mutasyonu bulunduran astrositomaların tekrarlamaya ve evrede ilerlemeye eğilimli olduğu bilinmektedir (37).

Astrositik gliomaların progresyonunda TP53 mutasyonu tümörün erken evresinde, G1-S geçişini kontrol eden genlerdeki anormallikler ise geç evresinde ortaya çıkmaktadır (36).

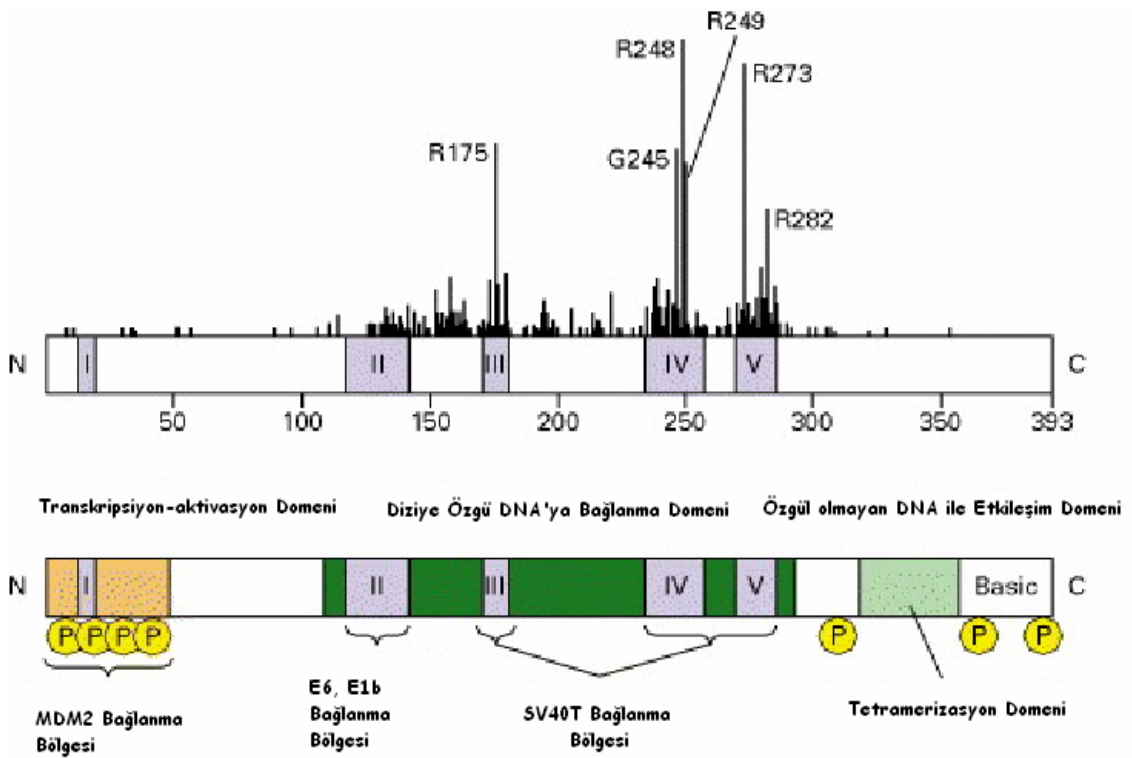
4.3.3. TP53 Mutasyonları

TP53 allellerinin biri ya da her ikisinin kaybı tetramer oluşumunu azaltarak büyümeyi baskılayıcı genlerin ifadelerinde düşüşe neden olur. Bu mekanizma pek çok tümör tipinde bulunmaktadır. Proteinin yapısında kesilmeye neden olan anlamsız veya kırılma bölgesi mutasyonları oligomerleşmeyi engelleyerek p53 tetramerlerin aynı şekilde azalmasına yol açar. Bu mutasyonlar özellikle akciğer, özofagus, ve diğer kanserlerde daha sıktır. Üçüncü bir mekanizma mutant TP53'ün baskın negatif etkisi ile işlevsel olarak aktif tetramer oluşumunda daha büyük düşüş yapan anlamsız mutasyonlardır. Bu tür mutasyonlar ise kolon, beyin, akciğer, meme, cilt, mesane kanserlerinde etkindir (80). p53'ün onkogeneze katkıda bulunduğu dördüncü bir mekanizma ise servikal kanserlerde HPV'nin E6 geni ürününün p53'e bağlanarak p53'de işlevsel kayba ve proteinin yıkımına yol açmasıdır (80).

Gliomalarda en sık rastlanan mutasyon tipi nokta mutasyonları ya da anlamsız mutasyonlardır. Mutasyon frekansı, düşük evre astrositomalarda %53 ila 83 arasındadır (74). Watanabe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada saptanan TP53 mutasyonlarının % 88'inin anlamsız olduğunu saptamışlardır. Mutasyon tipi değişik zaman dilimleri içinde alınan biyopsilerde aynı kalırken p53 proteininin birikimi tümör evresi ilerledikçe artmaktadır. Çalışma grubundaki vakalarda tümörün evre olarak ilerlemesi TP53 mutasyonu varlığı ve yokluğu durumlarında eşit frekanslarda gerçekleşmiştir (83).

TP53 mutasyonu astrositomalarda %58 anaplastik astrositomalarda %67 glioblastomalarda %72 oranında saptanmıştır (80).

Histolojik evreden bağımsız olarak TP53 mutasyonlarının saptanması, mutasyonların astrositomların ilerlemesinden çok tekrarlaması ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. TP53 mutasyonu ilk biyopside saptanmaktadır ve immunreaktivitesi hasta sağkalımı ile ters orantılıdır. Kodon 175 mutasyonu bulunan tümörlerin özellikle agresif seyrettiği saptanmıştır (80). Anaplastik astrositoma olarak tekrarlayan astrositomaların TP53 mutasyonu taşıdıkları, ancak glioblastoma olarak tekrarlayan astrositomalarda p53'ün sağlam olduğu bulunmuştur. Bu nedenle tümör progresyonunda birden fazla yolağın bulunduğu düşünülmektedir (83).



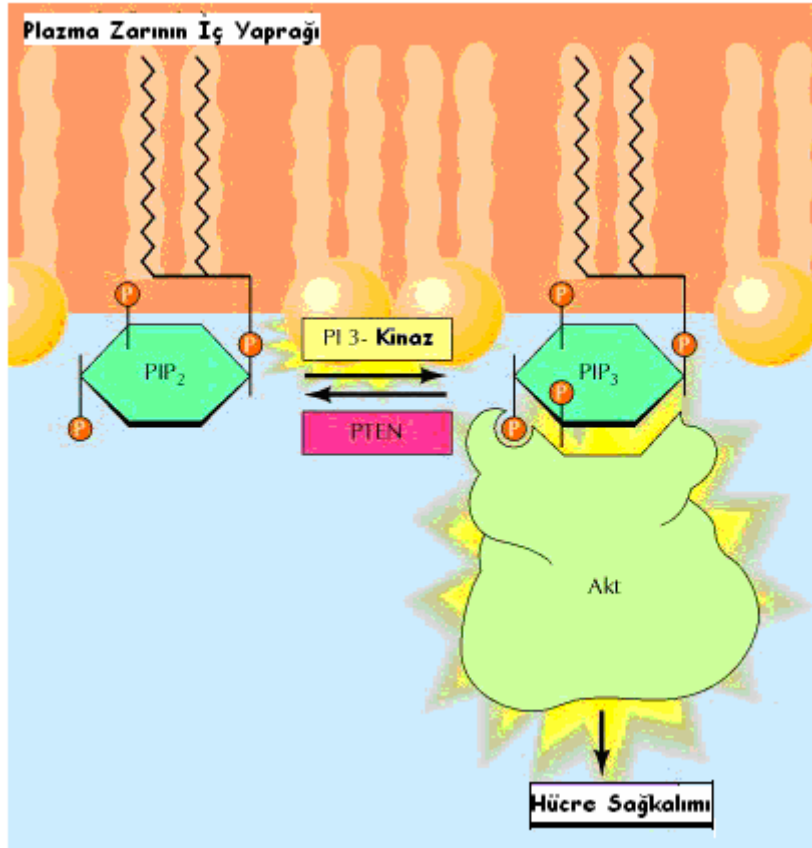
Şekil 10. TP53 geni ve mutasyonların sık rastlandığı bölgeler

TP53 immunreaktivitesinin evre ile artış göstermesinin kesin mutasyon varlığını göstermediği bilinmektedir. Aksine immunreaksiyondaki artışın genotoksik stres veya ilave genetik düzenlemelerin varlığı ile birlikte olduğu düşünülmektedir (83). Schiebe ve ark. (65) 11p15 te heterozigosite kaybı ve TP53 mutasyonu varlığının iyi prognoz bulgusu olduğunu göstermişlerdir. Aynı şekilde Tribolet ve ark. (78) TP53 mutasyonu taşıyan hastaların tümör proliferasyonu olmadan yaşadıkları sürenin daha uzun

olduğunu göstermişlerdir (38). Ancak Peraud ve arkadaşları, Chen ve arkadaşları ve Stander ve arkadaşları çalışmalarında TP53 mutasyonlarının kötü prognozistik etkileri olduğu, fonksiyon kaybı oluşturan mutasyonlarda toplam sağkalım, hastalıktan bağımsız sağkalım sürelerinin mutasyon taşıyıcılarında anlamlı oranda kısa olduğu saptanmıştır (15, 60, 73). Ancak bu çalışmaların bir kısmında çalışmaya alınan hasta grubunun evre olarak heterojen bir grubu içerdiği bilinmektedir. Bu durum TP53 mutasyonunun sağkalıma etkisi konusunda çıkan sonuçların çelişkili olmasına neden olmaktadır.

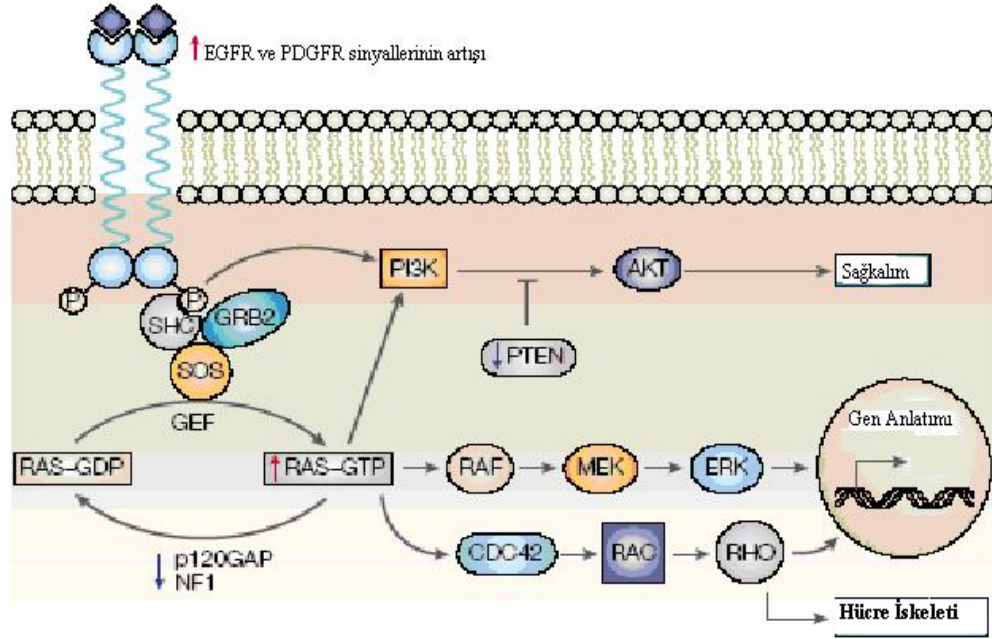
4.4. PTEN ve Reseptör Tirozin Kinazlar

PTEN çift yönlü özellik gösteren protein fosfataz (fosfo-serin\treonin ve fosfo-tirozin alt gruplarına karşı sadece tirozin fosfataz aktivitesi in-vivo olarak gösterilmiştir) ve fosfoinositid 3-fosfatazdır (19). AKT ise fosforile durumda hücrenin devamlılığını ve hücre siklusuna girişini düzenleyen bir serin\treonin-kinazdır. Bu nedenle PTEN, AKT'nin aktivitesini başlatan lipidleri defosforile ederek AKT'yi dolaylı olarak inhibe eder (Şekil 11). Böylece PTEN hem proteinleri hem de PI 3- kinaz tarafından katalize edilen lipid ikinci mesajcı fosfotidilinositol-3,4,5 trifosfat (PIP₃)'i defosforile eder. PTEN hücre proliferasyonu, adezyonu, göçü ve devamlılığında rol alır. Onuncu kromozomda yerleşen PTEN'in mutasyonu ve delesyonu, glioblastomalardaki en sık genetik düzensizliktir.



Şekil 11. PTEN hücre zarı intrasitoplazmik yüzeyinde fosfoinositol-3-fosfat'ı defosforile ederek Akt yolağını baskılar (75).

PTEN mutasyonları ya da delesyonu GBM'lerde en sık rastlanan genetik değişikliktir ve GBM'lerin %27-44' ünde saptanmıştır (75). PTEN mutasyonlarının primer (de novo) GBM (32%) lere özgü olduğu ve nadiren sekonder (önceki düşük evreli tümörden köken alan) GBM'lerde bulunduğu (4%) bilinmektedir. PTEN mutasyonları yüksek evreli astrositomlarda daha siktir (39) (Şekil 12).

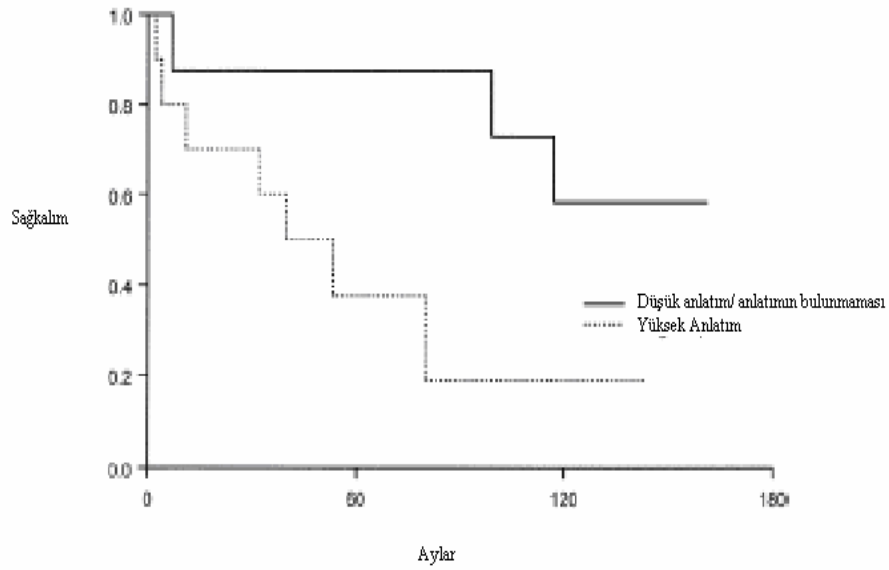


Şekil 12. Glioma oluşumunda reseptör tirozin kinaz yapısındaki EGFR ve PDGFR- α uyarımını takiben tümör hücrelerinin sağkalm yolları aktifleşir. PTEN işlevini kaybetmiş ise hasarlı genetik yapıya sahip olan hücrenin canlılığını sürdürmesine engel olamaz (92).

PDGFR onkogenik özellik gösteren bir reseptör tirozin kinazdır. Homo- ve heterodimerik protein tiplerini oluşturan iki alt üniteden oluşur. PDGFR- α geni 4. kromozomun uzun kolunda bulunur. Gliomalarda artmış anlatımı sıklıkla bulunur. PDGF:PDGFR otokrin bir etkileşim zinciri oluşturarak tümör hücrelerinin malign karakterinde rol oynarlar. PDGFler PDGF-AA, PDGF-BB ve PDGF-AB şeklinde, reseptörleri ise PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ ve PDGFR- $\alpha\beta$ şeklinde 3 farklı dimer oluştururlar. PDGFR beta ekspresyonu neoplastik olmayan normal beyin dokusundaki tek PDGFR alt grubudur. PDGFR beta mRNA'sı anlatım artışının endotel artışı bulunan bölgelerde belirgin olduğu saptanmıştır. TP53 mutasyonu bulunan

astrozitomalarda PDGFR amplifikasyonunun olmadığı ve PDGFR amplifikasyonu bulunduğunda ise TP53 mutasyonunun bulunmadığı bilinmektedir (27, 88).

EGFR geni 7p12 bölgesinde bulunmaktadır. EGFR/ErbB-1, erbB-2, erbB-3 ve erbB-4'ten oluşan erbB reseptör ailesinin bir üyesidir. Büyüme faktörü ile etkileştiklerinde dimerize olarak pek çok sinyal yolağını uyarırlar (1). Anlatımındaki artış özellikle ileri dereceli tümörlerde belirgindir ancak derece II gliomalarda anlatım artışı saptandığında sağkalım süresinin kısa olması özellikle dikkat çekicidir (Şekil 13).

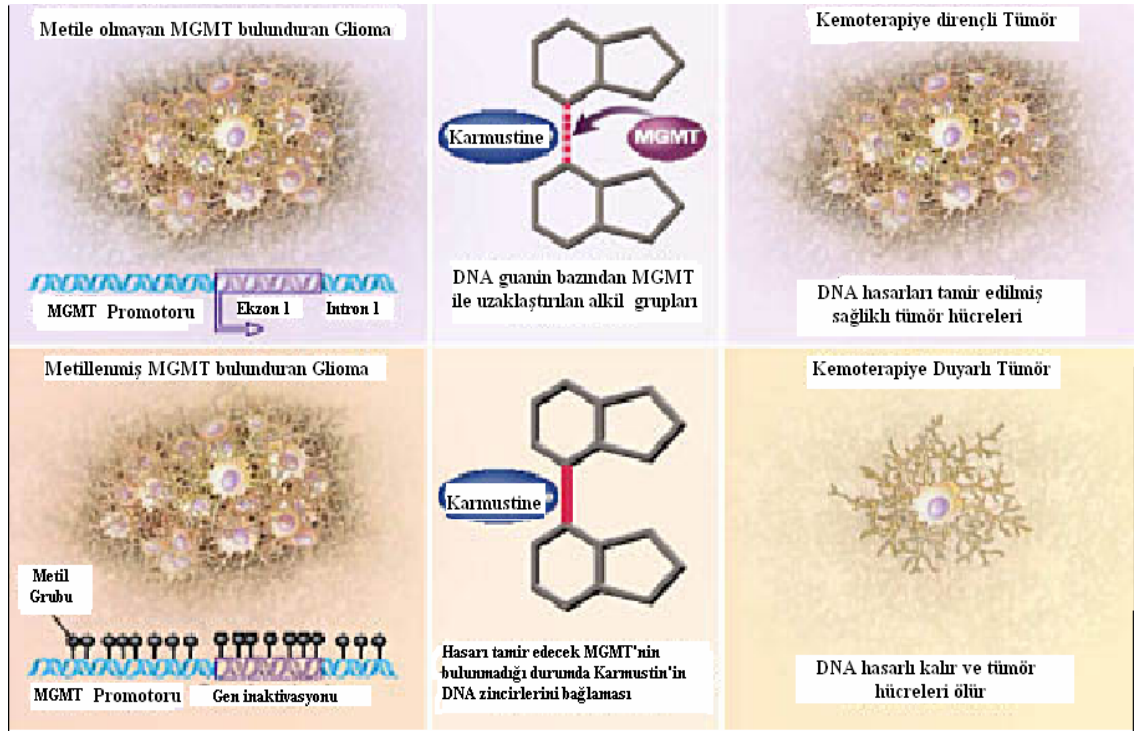


Şekil 13. EGFR anlatımının arttığı düşük evre gliomalı hastalarda sağkalım oranı aylar içinde azalmaktayken anlatımın düşük olduğu veya hiç bulunmadığı grupta sağkalım diğer gruptan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (51).

EGFR anlatım artışı gösteren düşük dereceli tümörlerin yüksek dereceye geçiş döneminde bulunduğu düşünülmektedir. Bu gruptaki hastaların sağkalım sürelerinin belirgin olarak düşük olduğu bilinmektedir. EGFR anlatım artışının bulunması düşük dereceli tümörlerin tümör cerrahisi sonrası tedavilerinde öngörü sağlanabilmesi için önemli bir bulgudur (34, 51).

4.5. MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)

Gliomaların tedavisinde kullanılan alkilizan nitrozürelere guaninin 6. oksijen atomuyla birleşerek hücreye zararlı DNA bileşikleri oluştururlar. DNA bileşikleri çaprazında bulunan sitozin ile de bağlanarak DNA zincir kırılmasına yol açar. O⁶-Metil Guanin Metil Transferaz (MGMT) hücreye zararlı olan alkil gruplarını guaninin 6. pozisyonundan kesip çıkartmadan kendi sistin birimine bağlayarak uzaklaştıran bir DNA tamir proteini'dir. Üzerindeki sistine alkil grubunun bağlanması ile MGMT inaktif olur. Böylece proteinin bir intihar molekülü gibi görev yapması ve hasarı tamir ederken kendi işlevini kaybetmesi söz konusudur. Bu nedenle MGMT anlatım düzeyi hasarlı hücrelerde önem taşımaktadır. Proteinin translasyonu promotor bölgesinin metillenmesi ile kontrol edilmektedir. MGMT geninin metillenerek sessizleştirildiği durumda alkil gruplarının oluşturduğu DNA hasarı engellenemez ve hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 14)(46).



Şekil 14. MGMT enziminin alkil gruplarını DNA molekülünden uzaklaştırarak hasarı tamir etmesi ile tümör hücreleri alkilleyici ilaçlara karşı direnç geliştirirler. Ancak promotor bölgesi metillenerek etkisiz hale getirilen MGMT enzimi hasarlı DNA molekülünü onaramadığı için tümör hücresi apoptoz süreci sonunda kaybedilir (22).

Alkilleyici ilaçlar tümör hücrelerine karşı savaşta sık kullanılırlar. Klinikte kullanılan O⁶ alkilleyici ilaçlarının başlıcaları tablo 4’ de gösterilmiştir. Bu ilaçların oluşturacağı DNA hasarı ile tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. MGMT anlatımı tedaviye verilen yanıtta da önemli rol oynamaktadır. Anlatımın artışı hücrelerin DNA hasarını onararak ilacın etkisinden kurtulmaları ile sonuçlanırken, anlatımın azaldığı, proteinin metillenme yoluyla sessizleştiği hücrelerde yıkım gerçekleşir. Bu nedenle MGMT anlatımının artışı kemoterapiye karşı dirence neden olmaktadır (84). MGMT sessizleşmesi gliomaların %40’ında bulunmaktadır. Düşük evre gliomalardan oluşan sekonder glioblastomalarda MGMT anlatım kaybı primer glioblastomalara oranla daha fazladır (%75’ e karşı %36) (52).

Tablo 4. Klinikte Kullanılan O⁶-Guanin Alkilleyici İlaçlar

Nitrozürelere	Metile eden Ajanlar
BCNU (Karmustin)	DTIC (Dakarbazin)
CCNU (Lomustin)	Prokarbazin
Methyl CCNU (Semustin)	Temozolamid (Temodal)
ACNU	Streptozotosin
Fotemustin (Muforan)	N-metil-N-nitrozüri
Mitozolamid	CB10277(Fenildimetil triazenokarboksilik asit)
Klorozotosin	
Klomesom	

MGMT sessizleşmesi bulunan tümörlerde alkilguanin uzaklaştırılmadığı için replikasyon sırasında alkilguanin, sitozin yerine timin ile eşleşir ve daha sonra hasarlı guaninin yerine adeninin yerleştirilmesi ile G-C den A-T ye dönüşüm gerçekleşir. MGMT metilasyonu bulunan astrositomalarda özellikle G:C→A:T dönüşümüyle oluşan TP53 mutasyonlarının arttığı saptanmıştır (52).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Mevcut Olanaklar:

- Agaroz Jel Elektroforez Düzenegi, ATTO (Japonya)
- Buzdolabı, Profilo (Türkiye)
- Buz Makinası, Scotsman (A.B.D.)
- Derin Dondurucu -20°C, Philco (Türkiye)
- Etüv, Heraeus (Almanya)
- Hassas Terazı, Mettler AT261 (İsviçre)
- Hassas Terazı, Mettler PJ6000 (İsviçre)
- Isı bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)
- Isısal Döngü Cihazı, Biometra (A.B.D.)
- Isısal Döngü Cihazı, Techne Flexigene (A.B.D.)
- Kamera, Polaroid MP-4 (A.B.D.)
- Steril Akımlı Kabin, Özge A.Ş. (Türkiye)
- Manyetik Karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)
- Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
- Otoklav, All American (A.B.D.)
- Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)
- Pastör Etüv, Elektro-Mag (Türkiye)
- pH Metre, WTW (Almanya)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)
- Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D.)
- Spektrofotometre, WPW (İngiltere)
- Su Banyosu, GFL 1083 (Almanya)
- UV Kaynağı, Vilber Lourmat (Fransa)
- Vakumlu Mikrofüj, Savant (İngiltere)
- Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)

5.2. Çözeltiler;

10XTBE (500 ml) 0,89 M Tris
0,89 M Borik Asit
0,02 M EDTA(pH 8.0)

TE Çözeltisi (50 ml)- 10 mM TrisHCL
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

6X Yükleme Çözeltisi % 0,25 Bromofenol mavisi
% 0,25 Ksilen siyanol
% 30 Gliserol

Taze Doku Parçalama Çözeltisi (50 ml)- 0.5 mg/ml Proteinaz K
50 mM Tris-HCl pH 8,5
1mM EDTA
%0.5 Tween 20

Parafin Doku Parçalama Çözeltisi(50 ml)-10mM TrisHCL (pH 8.0)
1mM EDTA (pH 8.0)
%5 Chelex-100

10 mM dNTP Ara Stok(100 µl)
25 mM dATP,
25 mM dCTP,
25 mM dGTP,
25 mM dTTP'den eşit miktarlarda
karıştırılarak 10 mM ara stok hazırlandı.

Akrilamid jel

%30 Akrilamid stok (50 ml) (29:1)

- 14,5 g Akrilamid
- 0,5 g Bisakrilamid
- ddH₂O'da çözüldü ve +4°C'de saklandı.

%12 Akrilamid Jelin Hazırlanması (30 ml)

Akrilamid yüzdesi % 12

% 30 Akrilamid stok 12 mL

10xTBE 1.5 mL

ddH₂O 13.5 mL

Gliserol 3 mL

240 µL % 10 APS ve 30 µL TEMED dikey jel dökümünün hemen öncesinde eklendi.

Denatüre edici yükleme çözeltisi:

% 95 Formamid

10 mM NaOH

% 0,05 ağırlık/hacim Bromofenol mavisi

% 0,05 ağırlık/hacim Ksilen siyanol

Gümüş Boyama:

Fikse etme çözeltisi

% 7.5 Metanol

% 7.5 Asetik asit (Glasial)

Gümüş Boyama çözeltisi

% 0,15 Gümüş nitrat

%0.14 Formalin

Görüntü elde etme çözeltisi

%30 Na₂CO₃

%0.14 Formalin

%0.04 Sodyum tiyosülfat

(Solüsyonlarda ultra saf su kullanıldı.)

5.3. Hasta Grubu;

Bu çalışmaya, Nisan 1999-Ocak 2005 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahi AD'da beyin tümörü nedeniyle ameliyat olan ve çalışmaya katılmayı kabul etmiş hastaların -70°C 'deki tümör bankasından alınan 39 adet taze doku örneği ve 9 vakanın parafin bloklarından alınan örnekler kullanılarak toplam 48 hasta dahil edilmiştir. Vakaların 12'si oligodendroglioma, 16'sı astrositoma ve 20'si oligoastrositomadan oluşmuştur. Hastaların yaşları 11-69 yaş aralığında yer almış ve grubun 27'si kadın, 21'i erkek bireyden oluşmuştur.

Kontrol grubu, tümörü çevreleyen normal beyin dokusunun az olması nedeniyle, hasta grubu ile yaş olarak uyumlu, ölüm nedenleri santral sinir sistemi patolojisine bağlı olmayan 10 postmortem bireyden oluşturulmuştur.

Hasta grubunun WHO'ya göre sınıflandırılması ve immunohistokimyasal araştırma Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji AD da değerlendirilmiştir.

Hastaların izlemi 6 aylık zaman dilimleri içinde kendilerine ulaşılarak yapılmış, almış oldukları tedavi şekilleri dosyalarından, epikrizlerinden ve kendilerinden öğrenilerek belirlenmiştir.

Tez çalışması Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 12.4.2002 tarih ve MAR.YÇ.2002.0016 nolu belge ile onaylanmıştır.

5.4. Taze Dokudan DNA İzolasyonu

Ameliyat ile alınan ve -70°C ye konularak saklanmış olan taze tümör dokusu önce -20°C 'de bekletildikten sonra oda sıcaklığında tutuldu. Küçük parçalara ayrılıp 2 ml. taze doku, taze doku parçalama çözeltisi içine alındıktan sonra 10 μl Proteinaz K eklenip 55°C de 30 dakika bekletildi.

Fenol/kloroform/izoamilalkol karışımı eklenip 10 000 g'de 5 dk. santrifujlandıktan sonra DNA %100 etanol ve 7.5 M amonyum asetat ile çöktürüldü ve %70 etanol ile yıkandı TE çözeltisi içine alındı (53, 57).

5.5. Parafin Dokudan DNA İzolasyonu

Parafine gömülü tümör dokularından alınan 5'er µm kalınlıkta 4 adet kesit ependorf tüplere alındıktan sonra 200 µl. parafin doku parçalama çözeltisi konuldu (Tween 20). Doksandokuz °C'de 10 dakika ısıtılan tüpler 56 °C'de bekletildikten sonra 10500 g'de 15 dakika santrifujlendi. Tüplerdeki parafin tabakası uzaklaştırıldıktan sonra 1 µl. 20mg/ml Proteinaz K (Sigma) eklendi. Ellibeş derecede geceboyu bekletilen tüpler 10500 g'de tekrar 15 dakika santrifujlenip parafin uzaklaştırıldıktan sonra eşit hacimde kloroform eklendi. Santrifuj (10500 g) sonrası üst faz alınıp eşit hacimde %5 *Chelex* içeren TE çözeltisi eklendi. Santrifuj (10500 g) sonrası üst faz kullanım için -20 °C'ye kaldırıldı (16, 63). DNA Miktar Tayini için dokulardan elde edilen DNA ların spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri saptanarak miktarları belirlendi. Bu ölçüme ek olarak ayrıca genomik DNA örnekleri % 0.8'lik jelde yürütüldü ve görüntüldü.

5.6. TP53-PZR-SSCP Tekniği

TP53 geni ekzon 5-8 bölgeleri "nested PZR" ile iki set primer çifti kullanılarak çoğaltıldı (Tablo 5, 6). Yaklaşık 0,1µg DNA , 25µl reaksiyon hacmi içinde her primerden 2.5 pmol, 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl; pH 8.3, 20 mM dNTP ve 0.5 unite Taq polimeraz karıştırıldı. İlk PZR 17 döngü, 94°C de 1 dakika, 52 °C de 45 saniye ve 72 °C de 1 dakika olacak şekilde çalışıldı.

Tablo 5. TP53 geni exon 5-8 bölgeleri için primerler.

Ekson	Primerler 5'-3'	Birleşme sıcaklığı (°C)	Ürün (bp)
5	TTCAAACCTCTGTCTCCTTCCT	52	245
	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG		
	GGAATTCCTCTTCCTGCAGTACTC	58	
	GGAATTCGCCCCAGCTGCTCACC		

6	GCGTCTGATTCCCTCACTGAT	52	166
	TTAACCCCTCCTCCCAGAGA		
	GGAATTCCACGATTGCTCTTAGGT	61	
	GGAATTCACCTCAGGCGGCTCATAG		
7	AGGCGCACTGGCCTCATCTT	52	177
	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC		
	GGAATTCCTAGGTTGGCTCGAC	61	
	GGAATTCAAGTGGCTCCTGAC		
8	TTCCTTACTGCCTCTTGCTT	52	248
	AGGCATAACTGCACCCTTGG		
	GGAATTCCTATCCTGAGTAGTGGT	61	
	GGAATTCGCTTAGTGCTCCCTGG		

İkinci PZR şartları 25 µl toplam hacim içinde 1µl primer PZR ürünü, 10 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM dNTP, 2.5 pmol her primerden ve 0.5 unite Taq polimeraz olarak hazırlandı. İkinci PZR parametreleri 27 döngü 94°C ta 1 dakika, 58/61°C 45 saniye ve 72 °C 1dakika olacak şekilde uygulandı (65).

Belirtilen protokolden farklı olarak DNA miktarları az olan veya PZR ürün miktarı düşük olan örneklerde birinci PZR ürününden 3 µl alındı ve uzama süresi 1 dakika 15 saniye olarak değiştirildi.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan örnek bir tablo.

<i>IX (µL)</i>	<i>Reaksiyon içeriği</i>	<i>Sonuç Konsantrasyonu</i>
2.5	10X PZR Çözeltisi	1X
2	25 mM MgCl ₂	2 mM
0.5	10 mM dNTPs	200 µM
0,25	İleri yönde Primer (10pmol/µl)	2,5 pmol
0,25	Geri Yönde Primer (10pmol/µl)	2,5 pmol
0,1	Taq DNA pol (5U/µL)	1 ünite
13,4	dH ₂ O	-
22 µL Reaksiyon karışımı		
3	genomik DNA	100 - 300 ng
25 µL Toplam hacim		

5.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi DNA molekülünde bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının elektrik alanda anoda doğru hareket etmesi ilkesine dayanmaktadır. Nükleik asitlerin geçebileceği uygun elek aralığı büyüklüğü sağlandığında 10 bazçiftten oluşan miktarların bile elektrik alanda ayrıştırılarak tanımlanmasını sağlar.

Bu çalışmada PZR ile çoğaltılan DNA dizilerinin doğruluğunun ve kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Tablo 5’de gösterilen büyüklükteki PZR ürünlerinin tanımlanabilmesi için %2’lik jel kullanıldı. Kullanılan elektroferez düzeneğine uygun olarak jel, 40 ml’lik 1XTBE çözeltisinde toz halindeki agarozun kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti 55-60 dereceye soğutulduktan sonra 0,25 µg/ml. olacak şekilde EtBr ilave edildi. 6X yükleme boyası ile örnekler 5/1 oranında karıştırılarak yüklendi. Uygulanan akım 5-10 V/cm olacak şekilde elektrik alanda yürütülen PZR ürünleri UV ışık kaynağı üzerinde incelendi.

5.6.2. SSCP (Tek-Zincir Konformasyon Polimorfizmi) Analizi

Üç µl PZR ürünü, 18 µl yükleme çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 95 °C’de 10 dakika ısı bloğunda bekletilerek hemen buza alındı. Tüpler 3 dakika buz üzerinde soğutulduktan sonra, örnekler %12 akrilamid/poliakrilamid %10 gliserol içeren akrilamid jele yüklendi (44).

Jele uygulanan akımın 8-10 V/cm. oranından fazla olmamasına dikkat edilerek 180V ile yürütülen bölge bant uzunluğuna göre 12-15 saat 1 X TBE solüsyonu içinde yürütüldü. Dikey elektroferez işlemi sonunda bantlar gümüş boyama ile görüntülendi. Akrilamid jeller tarayıcı ile taranıp görüntüler bilgisayara aktarıldıktan sonra jeller +4 °C’ye kaldırıldı. (69). SSCP analizinde kontrol örneği ile farklı bant yapısı gösteren örneklerin elektroforezi aynı deney şartları sağlanarak tekrar edildi.

5.6.3. Gümüş Boyama Tekniği

Bantların görüntülenmesi gümüş boyama yöntemiyle yapıldı. Boyamanın her basamağında ultrasaf su kullanıldı.

Fiksasyon; %7,5 glacial asetik asit ve %7,5 metanol olacak şekilde hazırlanan 100 ml. fiksatif solüsyonunda jel 10 dakika bekletildi.

Yıkama; 10 dakika ultrasaf suda yıkanan jel boyamaya alındı.

Boyama; %1,5 gümüş nitrat ve 140 µl. %37'lik formalin ile hazırlanan 100 ml. solüsyon içeren kapta çalkalanarak jel 30 dakika bekletildi.

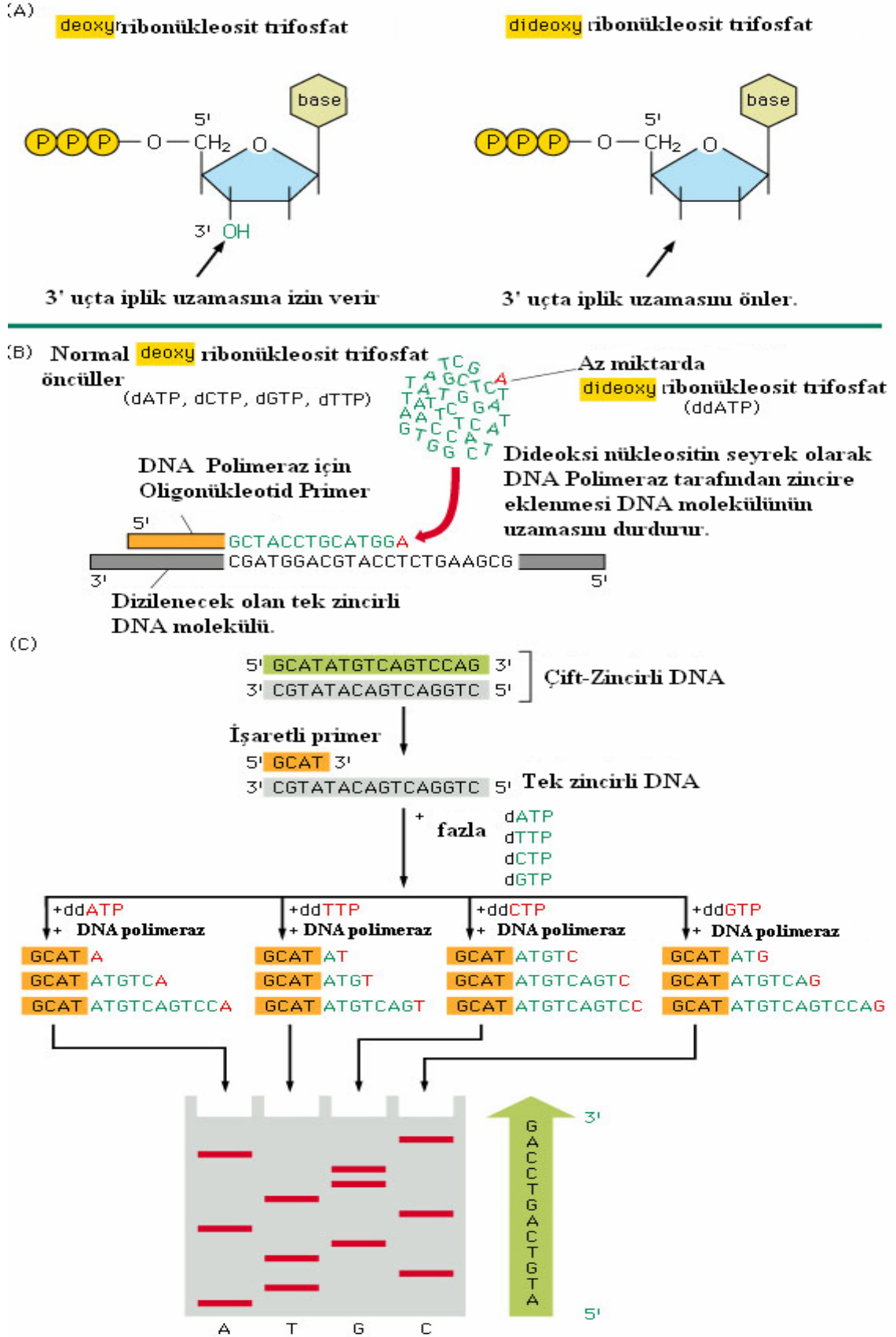
Çalkalama; jel ultrasaf suda 20 saniye çalkalandı.

Görüntünün elde edilmesi; jel görüntü elde etme solüsyonu içinde bantlar iyice belirginleşinceye kadar çalkalandı.

Fiksasyon; bantlar belirginleşince reaksiyon, jel fiksatif içinde 5 dakika bekletildikten sonra reaksiyon durdurularak, bantların sabitlenmesi sağlandı.

5.7. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkartmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Dizilemede Sanger'in enzimatik, dideoksi zincir sonlanması metodu ile Maxam ve Gilbert'in kimyasal yıkım metodu olmak üzere iki klasik yöntem bulunmaktadır. Bunlardan Sanger'in metodu daha pratik olduğu için daha yaygın kullanılmaktadır. Bu metod kalıp olarak tek iplikli DNA molekülünü kullanır ve DNA Polimeraz enzimi ile yeni bir DNA zincirinin sentezini içerir. Sanger'in dizi analizi metodu ddNTP'lerin bilinen dNTP'ler ile aynı yönde uzayan zincir içine dahil olmasına bağlıdır. Fakat ddNTP'lerin dNTP'lerden farkı, zincir uzaması için gerekli olan 3'-OH grubunun olmamasıdır. Bir ddNTP yeni zincirin içine dahil olduğunda, hidroksil grubunun olmaması nedeniyle fosfodiester bağının oluşumunu önler ve zincir uzaması bu noktada sonlanır. Bir reaksiyona DNA Polimeraz ile dört ddNTP' den biri ve bilinen dört dNTP doğru oranlarda uygulanmalıdır. ddNTP'lerin reaksiyona katılması keyfidir ve bunun sonucunda çeşitli uzunluklarda polinükleotid zincir popülasyonu oluşur. Dört farklı reaksiyonda dört farklı ddNTP kullanımı sonrasında tamamlanan dizi bilgisi poliakrilamid jelde, elektroforez sonrası elde edilir (Şekil 15) (65, 76).



Şekil 15. Dideoksi nükleotidlerle zincir sonlandırılarak dizileme metodu (65).

5.7.1. Floresan İşaretli Otomatik Dizileme

Bu metod DNA uzamasını sonlandırmada floresan işaretli dideoksinükleotidleri kullanır. Normal ddNTP ve radyoaktif işaretli dNTP'lerin yerine floresan işaretli uçların kullanımının üç avantajı vardır: Birincisi, radyoaktif çalışmadan kaçınılır ve dizi analizi kolaylaşır. İkincisi, tüm dört sonlandırma reaksiyonunun tek bir tüp içerisinde gerçekleştirilmesi sağlanır ve her dNTP için farklı renkte bir floresan boya kullanılır. Üçüncüsü, kullanılan farklı boyalar ve tüm reaksiyon poliakrilamid jel elektroforezinde tek bir kuyu içerisine yüklenebilir. Bantlar tarayıcıdan geçtiğinde, farklı dalga boylarında ışık absorpsiyon yeteneği ile tanınırlar. Modern dizileme cihazları *Taq* Polimeraz ve boya-işaretli ddNTP'lerin kullanım avantajları ile modern otomatik dizilemenin temelini oluşturmaktadır (65).

Bu çalışmada SSCP ile tanımlanan TP53 geni ekzon 5, 6, 7, 8 olası mutasyonları varlığını doğrulamak ve tanımlamak için DNA dizi analizi yöntemi kullanıldı. Araştırılacak örnek sayısının az olması ve proje bütçesinin sınırlı olması nedeniyle daha ekonomik olduğundan bu yöntem ticari bir firmaya ABI PRISM 3100 Genetik Analizör cihazında yaptırılmıştır.

5.8. p14ARF-mdm2 Multipleks PZR

P14ARF geni ekzon 1 β bölgesi ve mdm-2 geni p53 bağlanma bölgesi aynı reaksiyon şartlarında 50 μ lt. reaksiyon hacminde 10 mmol Tris (pH 8.3), 2 mmol MgCl₂, 50 mmol KCl, 200 μ mol dNTP olacak şekilde, 1U Taq Polimeraz ve her bir primerden 30 μ g. eklenerek oluşan reaksiyon karışımı 95 °C’de 5 dakika başlangıç denaturasyonu sonrası 30 döngü; 95 °C’de 1 dakika denaturasyon, 57 °C’de 1 dakika tekrar bağlanma ve 72 °C’de 1 dakika uzama ile 10 dakika 72 °C’de uzama uygulanarak çoğaltıldı. Baz dizilimleri Tablo 7’de belirtilen primerler kullanıldı;

Tablo 7. *P14ARF ve MDM-2 Primer Dizinleri*

P14ARF

İleri 5’-TCCCAGTCTGCAGTTAAGGG-3’

Geri 5’-ACCACGAAAACCCCTCACTCG-3’

MDM2

İleri 5’-CTCAACACAAGCTGAAGAGG-3’

Geri 5’-ATTGGTTGTCTACATACTGG-3’

p14ARF sonuç ürünü 174 bazçiftlik ekzon 1 β ve mdm-2 sonuç ürünü ise 399 bazçiftlik p53’e bağlanma bölgesinden oluşuyordu (51, 65). Multipleks PZR ile çoğaltılan örnekler, kontrol bant yoğunluğu standart kabul edilerek, Kodak-1D 3.5 programı ile dansitometre analizi yapılarak değerlendirildi (66).

5.9. İmmunohistokimyasal Çalışma

5.9.1. Yöntem:

İmmunohistokimyasal yöntem dokularda hedeflenen belirli bir proteinin antijenik yapısını tanıyan bir antikora bağlanarak oluşan bileşiğin renklendirilmesi ile varlığının gösterilmesini amaç edinmiştir. Çalışmada hedeflenen proteini tanıyan primer antikor, primer antikoru tanıyan sekonder antikor ve sekonder antikora bağlı bir kimyasal belirteç ile o kimyasal belirtecin reaksiyona gireceği ve renk değişikliği oluşturacak olan kromojen bulunur. Çalışmada tümör dokularının parafin bloklarından alınan 5µm'lik kesitler hazırlandı. Kesitler, daha önce, tümör hücrelerinin %80'ini içerecek şekilde seçilen bloklardan alındı. Örnekler ksilende 3 X 10 dakika bekletildikten sonra %100 etanolde 3 X 10 dakika tutuldu. Metanol içinde %3 H₂O₂ içeren solüsyonda bekletildi. Sitrat çözeltisinde (pH=6) antijen geri kazanımı için 10 dakika mikrodalga fırında 350 W'da ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika soğumaya bırakıldı. Kesit yüzeyleri özgün olmayan antijeni yakalama solüsyonu ile kaplanarak 10 dakika bekletildi. Fosfat tamponlu sitrat çözeltisi ile yıkama sonrası primer antikor çözeltisi uygulanarak oda sıcaklığında 20 dk. bekletildi. Yıkama işlemi ardından birinci antikora oluşmuş olduğu türe özgü, biyotinli ikincil antikor ve yıkama sonrası ikincil antikora bağlanacak olan enzim solüsyonu uygulandı. Tekrar yıkama sonrası diaminobenzidin boya solüsyonu uygulandı. Mayer Hematoksilen ile lamlar 3 dakika boyandı (67, 88).

Tez çalışmasında EGFR, PDGFR- α ve PTEN değerlendirilmesi; belirtilen proteinlerin anlatımını %0-20 arasında tümör hücrelerinin gösterdiği vakalar +1, %20-50 arasında gösteren vakalar +2, %50 ve üzerinde tümör hücrelerinin anlatım gösterdiği vakalar +3 şeklinde gruplandırılarak yapılmıştır. Bu çalışmada Spano ve arkadaşlarının değerlendirme yöntemi değiştirilerek kullanılmıştır (72). Ayrıca belirtilen proteinler için pozitif-negatif şeklindeki gruplandırma, PTEN ve EGFR için %15 ve üzerinde anlatım gösteren tümör hücrelerinin bulunması, PDGFR- α için ise %25 ve üzerinde anlatım gösteren hücrelerin bulunması pozitiflik kriteri kabul edilerek yapılmıştır .

5.9.2.Kullanılan Primer Antikorlar ve Görüntüleme Sistemi;

Anti-p53 Ab-8 (Klon DO-7 + BP53-12, Neomarkers) Fare Monoklonal Antikoru (1mg/ml.,1/1)

Anti-MGMT Ab-1(Klon MT 3.1 Neomarkers) Fare Monoklonal Antikoru (1mg/ml.,1/1)

Anti-PDGFR- α (Neomarkers) Tavşan Monoklonal Antikoru (1mg/ml.,1/1)

Anti-EGFR(Klon SP9 Neomarkers) Tavşan Monoklonal Antikoru (1mg/ml.,1/1)

Anti-PTEN (Klon 17.A Neomarkers) Fare Monoklonal Antikoru (1mg/ml.,1/1)

Ultravision Görüntüleme Sistemi Anti- Tavşan HRP-DAB (Labvision, Kanada)

Ultravision Görüntüleme Sistemi Anti-Fare HRP-DAB (Labvision, Kanada)

Hidrojen Peroksit Blok Solüsyonu (Labvision, Kanada)

Ultra V Blok Solüsyonu (Labvision, Kanada)

Biyotinli keçi anti-tavşan sekonder antikoru (Primer antikor tavşan kökenli ise) (Labvision, Kanada)

Biyotinli keçi anti-fare sekonder antikoru (Primer antikor fare kökenli ise) (Labvision, Kanada)

Streptavidin Peroksidaz enzim solüsyonu

Diaminobenzidine (DAB)

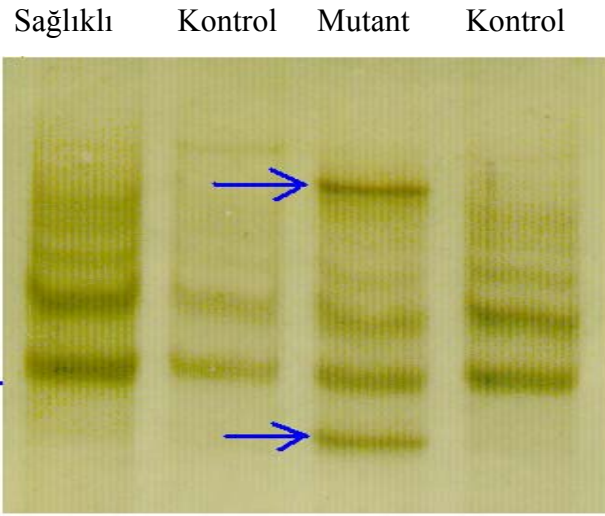
5.10.İstatistiksel Analiz

Genetik değişimler (mutasyonlar, amplifikasyon, delesyon), protein anlatım değişimleri ve tümörün patolojik özellikleri arasındaki ilişki Ki-kare testi kullanılarak değerlendirildi. Univariate survival analiz Kaplan-Meier metoduyla incelendi ve tüm testlerde istatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak alındı. Analizler "*Statistical Package for the Social Services*" (SPSS) software programına taşınarak yapıldı.

6. BULGULAR;

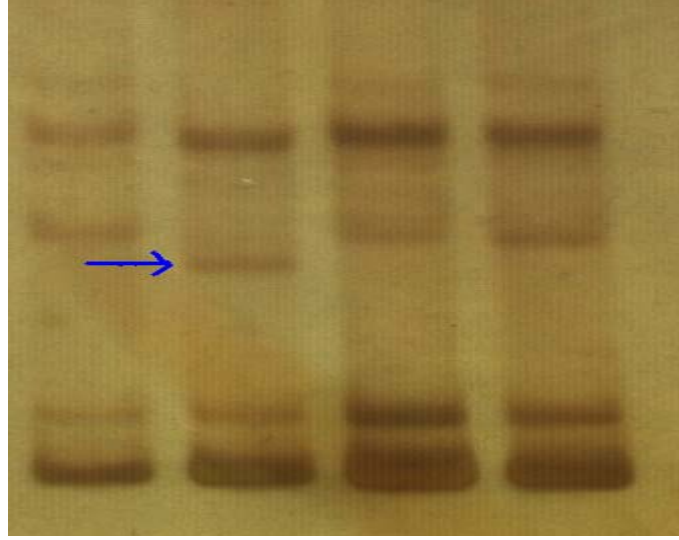
6.1. Tek Zincir Konformasyon Analizi (SSCP)

Çalışmada TP53 geninin ekson 5, 6, 7, 8 bölgelerinde yapılan SSCP analizi sonucunda toplam 36 tane bant kayması gösteren örnek incelenmiş ve bunların 24 tanesinin dizi analizi sonucunda mutasyon olduğu belirlenmiştir. Resim 1’de ekson 5, resim 2’de ekson 6, resim 3’te ise ekson 7 bölgesi SSCP analizleri görülmektedir.



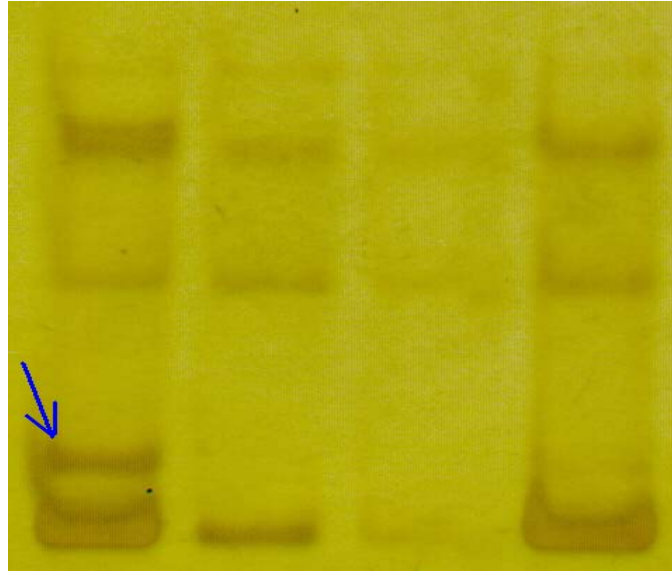
Resim 1. %12’lik poliakrilamid jelde TP53 Ekzon 5 örnekleri

Kontrol Mutant Kontrol Sağlıklı



Resim 2. %12'lik poliakrilamid jelde
TP53 Ekzon 6 örnekleri

Mutant Kontrol Sağlıklı Kontrol



Resim 3. %12'lik poliakrilamid jelde
TP53 Ekzon 7 örnekleri

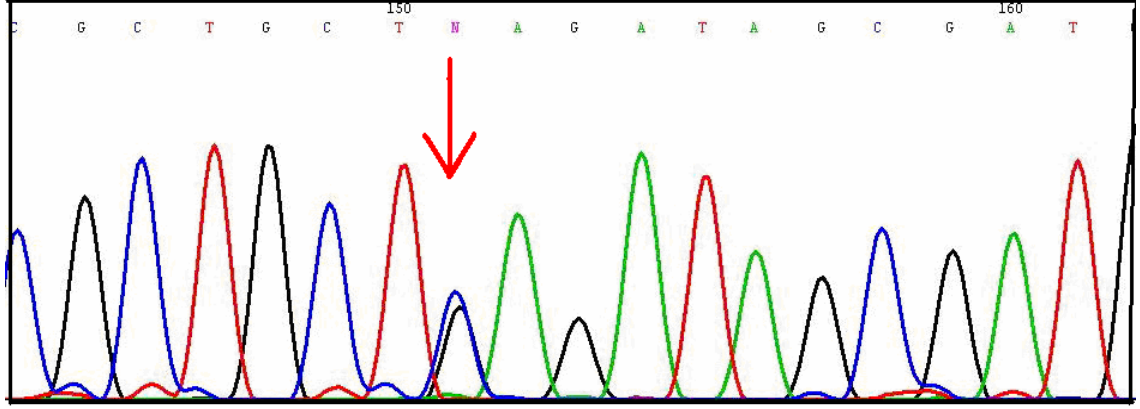
6.2. Saptanan TP53 Mutasyonları

“Nested” PZR ürünlerinden önce SSCP yöntemiyle mutasyon taşıyan grup tanımlandıktan sonra dizileme ile toplam 48 örnekten 22’sinde mutasyon saptandı. Tablo 8’de örneklerin örnek numaraları, ekson bölgeleri, kodon yerleşimleri ve taşıdıkları mutasyon tipleri gösterilmiştir. Kodon 183 ve 175 mutasyonları şekil 16 ve 17’de görülmektedir.

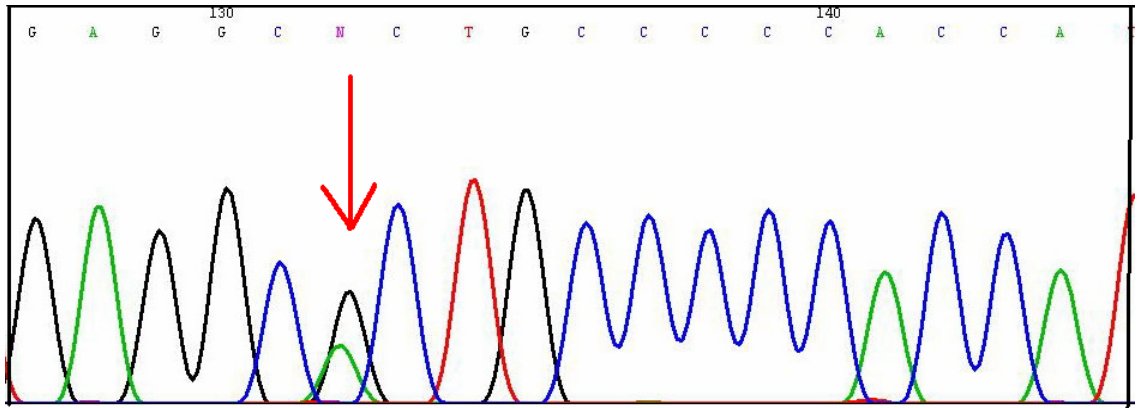
Tablo 8. TP53 Mutasyonu Saptanan Örnekler:

ÖRNEK	Ekson Bölgesi	Kodon	Mutasyon DNA (Aminoasit)
O1	7	251	ATC-ATG (Ile-Met)
O3	8	292	AAA-ATA (Lys-Ile)
O7	8	298	GAG-TAG (Glu-Stp)
O8	7	241	TCC-ACC (Ser-Thr)
O9	8	283	CGC-CAC (Arg-His)
O10	7	233	CAC-AAC (His-Asn)
O11	5	136	CAA-CAC (Gln-His A del)
A1	5	155	ACC-AAC (Thr-Asn)

A2	5	174	AGG-GGG (Arg-Gly)
A7	7	238	TGT-GTG (Cys-Val)
A9	7	233	CAC-GAC (His-Asp)
A11	8	293	GGG-TGG (Gly-Trp)
A12	5,7	183 261	TCA-TGA (Ser-Stp) AGT-AGG (Ser-Arg)
OA1	5	138	GCC-TCC (Ala-Ser)
OA5	6, 8	213 269	CGA-TGA (Arg-STP) AGC-ACG (G ins)
OA8	5	175	CGC-CAC (Arg-His)
OA11	6	196	CGA-GGA (Arg-Gly)
OA15	7	251	ATC-ATG (Ile-Met)
OA17	5	181	CGC-CTC (Arg-Leu)
OA18	6	198	GAA-GAG (Glu-Glu)
OA19	7	244	GGC-GGG (Gly-Gly)
OA20	8	272	CAC-CGC (Val-Ala)



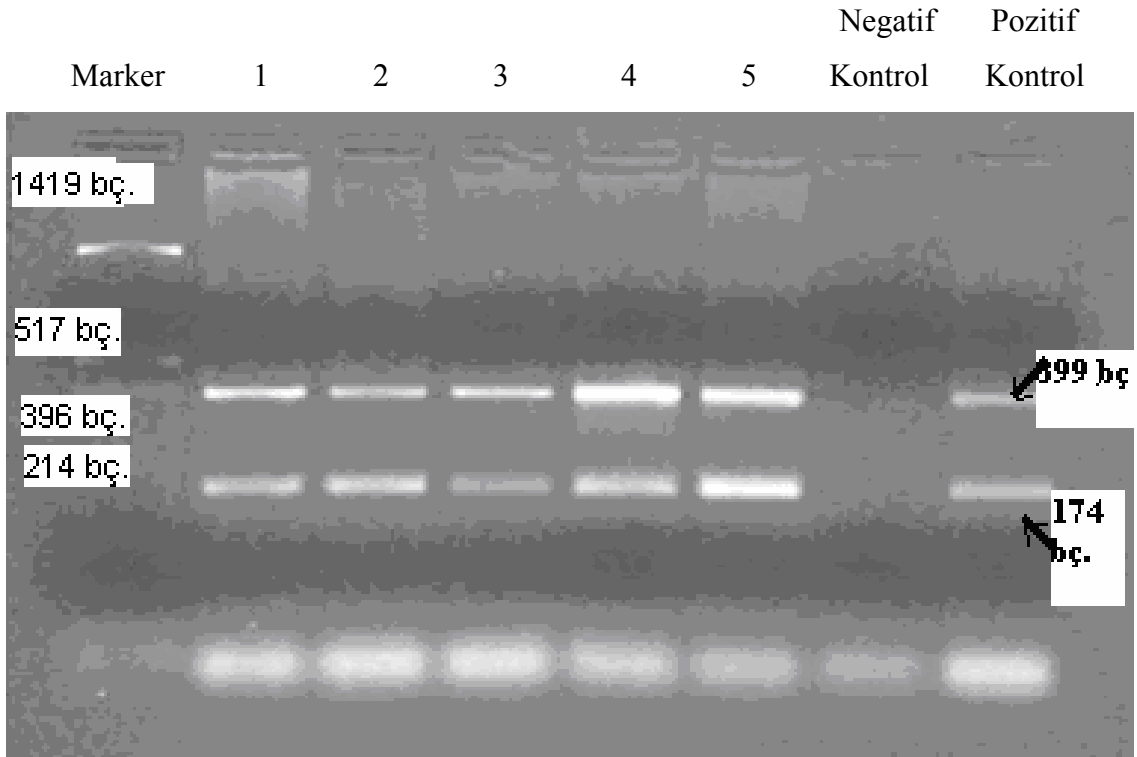
Şekil 16. A12 örneğinde TP53 ekzon 5, 183. kodon bölgesi TCA→TGA mutasyonu



Şekil 17. OA8 örneğinde TP53 ekzon 5 175. kodon CGC → CAC mutasyonu

6.3. Multipleks PZR (p14-mdm2)

Multipleks PZR ile değerlendirilen toplam 48 örnekten birinde p14 delesyonu ve ikisinde mdm-2 amplifikasyonu bulunmuştur. Resim 4'te multipleks PZR reaksiyonunda PZR ürünlerinin bant uzunlukları ve kontrole göre bant yoğunlukları izlenmektedir.

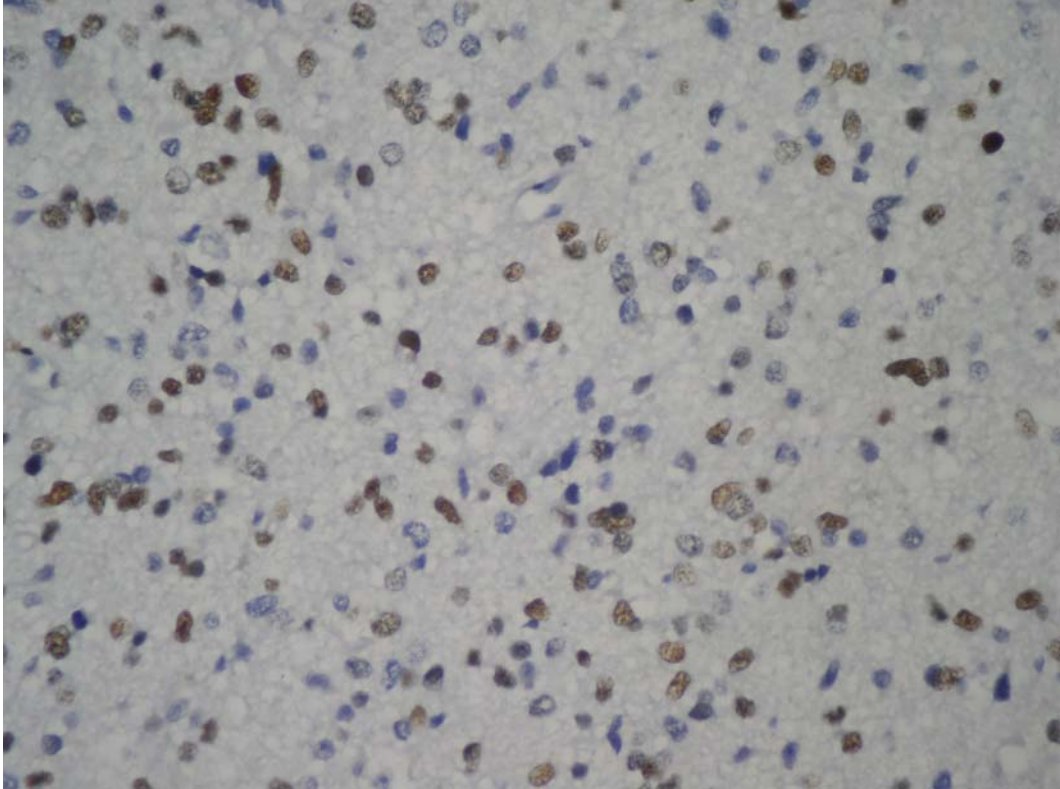


Resim 4. Multipleks PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. MDM2 399 bazçiftlik, P14ARF 174 bazçiftlik sonuç ürünleri çalışmaya alınan aynı miktardaki DNA miktarları ile elde edilmiştir. Dördüncü örnekte mdm2 bant yoğunluğu artmıştır.

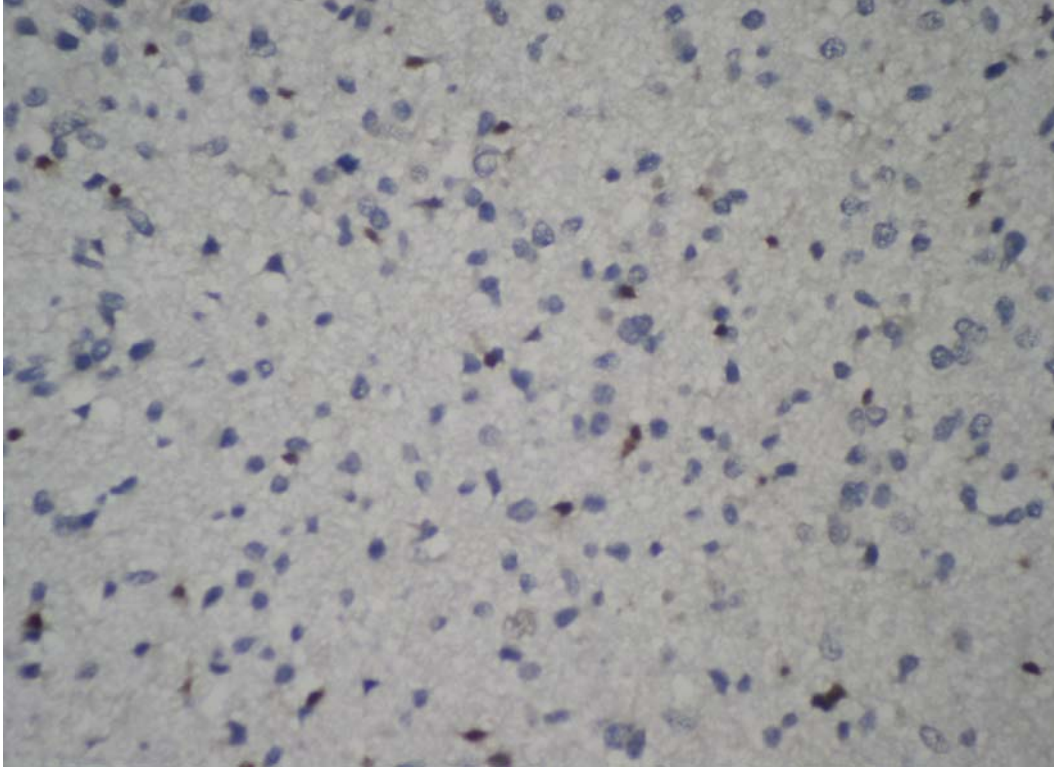
6.4. İmmunohistokimyasal Analizler

Hücre çekirdeğinde bulunan p53 proteini anlatımı tüm tümör örneklerinde TP53 mutasyonu bulunduranlarda bulundurmayanlara göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Yirmi iki mutasyonlu örneğin toplam 11'inde p53 anlatımı bulunmuş, bunların ikisinde anlatım düzeyinin % 50'den yüksek, birinde %20 ile %50 aralığında ve sekizinde %20'den düşük olduğu saptanmıştır. Mutasyon taşımayan 26 dokunun toplam dokuzunda p53 anlatımı %20'den düşük düzeyde bulunmuştur.

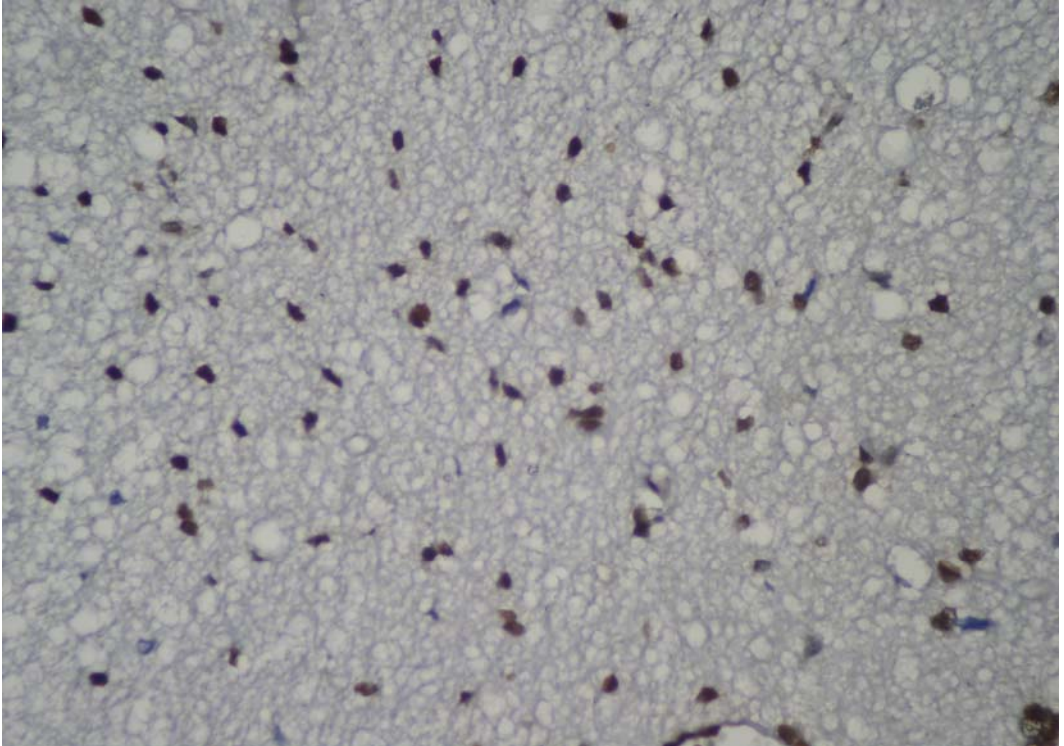
Aynı şekilde MGMT anlatımı hücre çekirdeğinde saptanmış ve p53 anlatımı ile yüzde değerleri karşılaştırıldığında, ki-kare testinde istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmayan ters orantılı bir ilişki göstermiştir (Resim 6, 7). Resim 5 ve 6'da aynı tümör dokusunda p53 ve MGMT anlatımları izlenmektedir. MGMT anlatımı 48 tümör dokusundan 36'sında %20'den düşük, 12'sinde %20 ile %50 arasında ve birinde %50'den yüksek düzeyde bulunmuştur.



Resim 5. Oligoastrozitomada P53 proteini anlatımının X 400 büyütmede görünümü. Anlatım artışı gösteren tümör hücrelerinde nükleuslarda kahverengi DAB boyanması bulunmaktadır.



Resim 6. Aynı oligoastrozitoma vakasında MGMT anlatımı daha seyrek nükleer boyanma şeklinde izlenmektedir (X400).



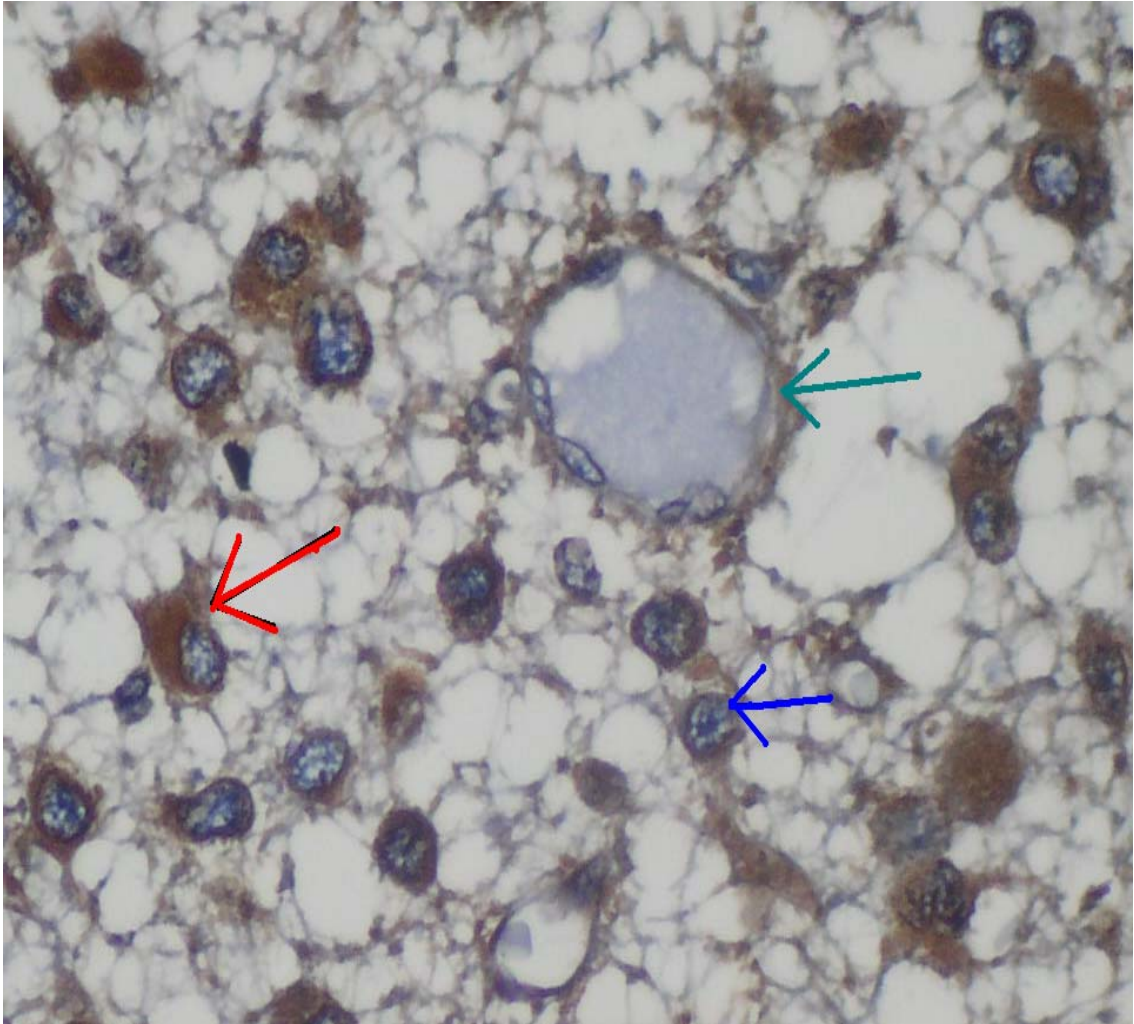
Resim 7. MGMT anlatımının artış gösterdiği (%56,5) Diffüz Astrozitoma örneği (X400).

EGFR, PDGFR- α ve PTEN proteinleri anlatımlarından; EGFR anlatımı sitoplazmada ve hücre zarında, PDGFR- α ve PTEN anlatımları hücre zarında saptanmıştır (Şekil 8, 9, 10). EGFR anlatımının 8/12 astrositoma, 5/16 oligodendroglioma, 16/20 oligoastrozitoma vakasında %50'den yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur.

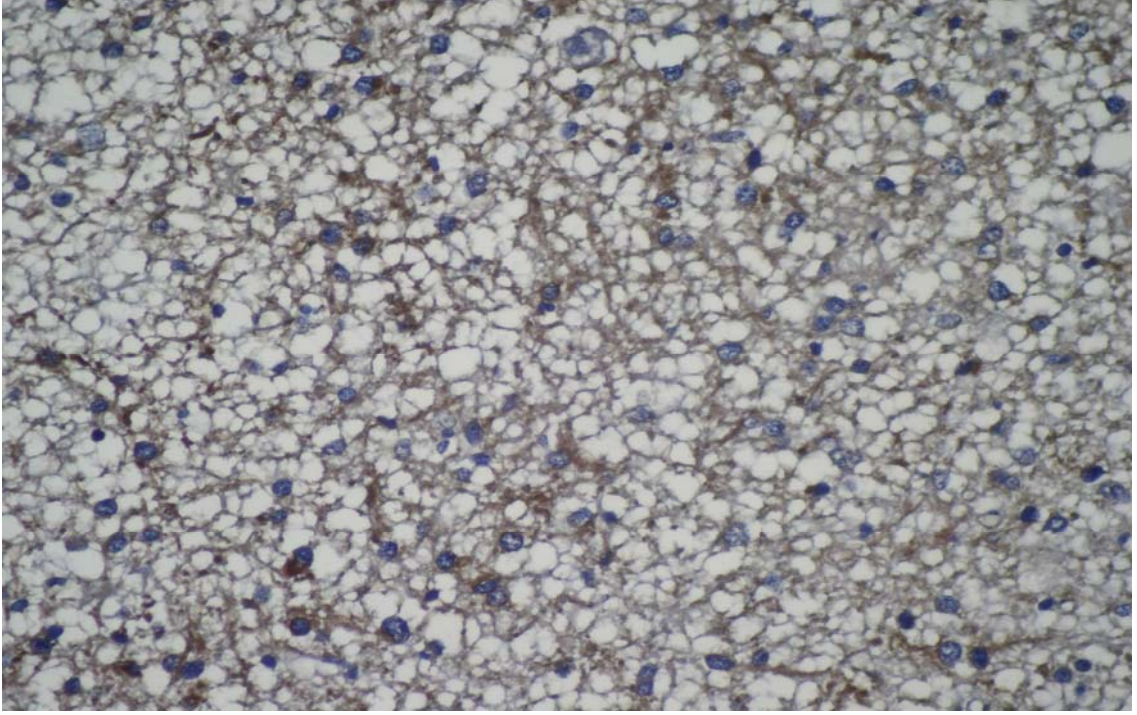
Toplam 4/12 Astrositoma, 3/16 Oligodendroglioma ve 13/20 Oligoastrozitoma vakasının incelemesinde sayılan hücrelerin yarısından fazlasında PDGFR- α proteininin anlatımının olduğu belirlenmiştir.

PTEN anlatımı 10/12 astrositoma, 5/16 oligodendroglioma ve 19/20 oligoastrozitomada tümör hücrelerinin yarısından fazlasında saptanmıştır.

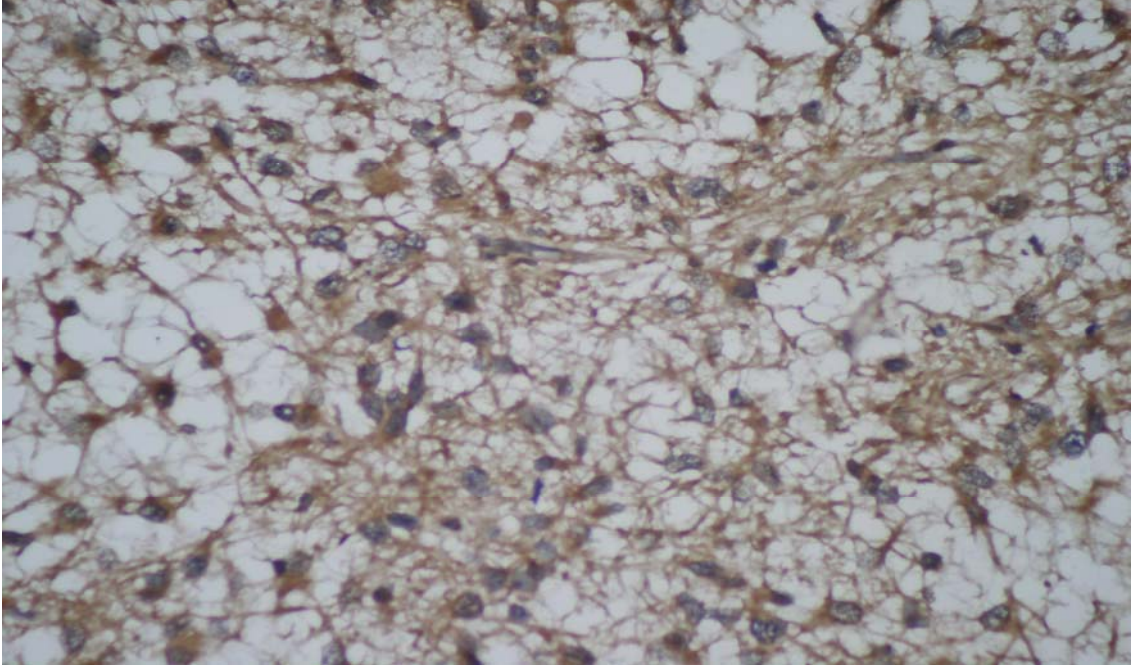
Her üç proteinin anlatımının da tümör histolojik gruplarından oligodendrogliomada daha düşük düzeyde bulunmuştur.



Resim 8. Astrositomada EGFR anlatımı (X400). Kırmızı ok; EGFR proteininin anlatımını, Mavi ok; Astrositoma tümör hücresi çekirdeğini, Yeşil ok; Damar kesitini göstermektedir (Mikroskop görüntüsünün bir bölümü büyütülerek verilmiştir).



Resim 9. Oligodendrogliomada PDGFR- α Anlatımı. Mavi renkli tümör hücre çekirdekleri ve kahverengi boyanmış hücre yüzey zarı gözlenmektedir (X400).



Resim 10. Oligoastrocitomada PTEN anlatımı. Mavi boyanmış tümör hücresi çekirdeklerini çevreleyen kahverengi boyanmış hücre zarları PTEN anlatımını ifade etmektedir (X400).

6.5. Bulguların Analizi

6.5.1. İstatistiksel Sonuçlar

Çalışma grubu 27 kadın, 21 erkekten oluşmaktadır.

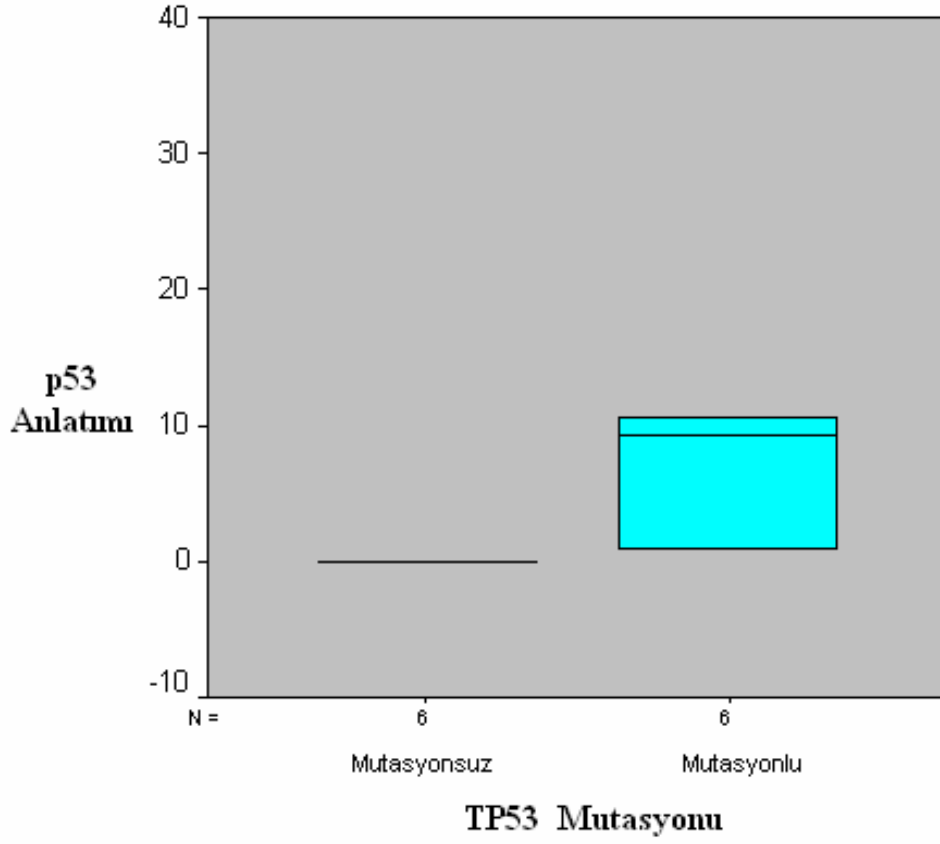
Hastaların tanı aldıklarında yedisinin 50 yaş üzerinde ve 39'unun 50 yaş altında olduğu belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan 12'si Astrositoma, 16'sı Oligodendroglioma ve 20'si Oligoastrocitoma tanısı alan 48 hastadan 22'sinde TP53 mutasyonu saptanmıştır (Tablo10).

p53 anlatımının tüm tümör grubu içinde mutasyon taşıyan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($p=0.002$).

MGMT anlatımı ile p53 anlatımı arasında ki-kare testinde istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmayan ters orantılı bir ilişki bulunmuştur (-%15,6).

TP53 mutasyonu taşıyan örneklerde protein anlatımının en fazla OA tümör grubunda olmak üzere tüm histolojik alt gruplarda anlamlı oranda arttığı gözlenmiştir ($P=0,000004$) (Şekil 18).

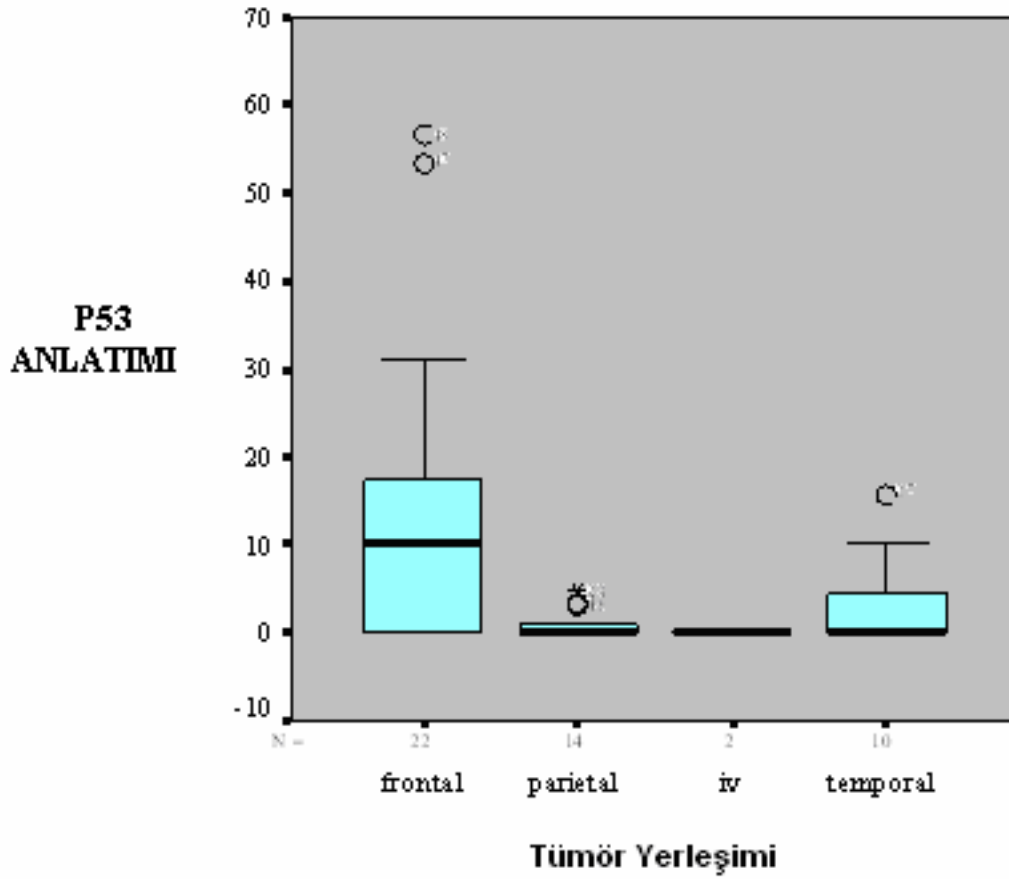


Şekil 18. TP53 mutasyonları ve p53 anlatımı ilişkisi.

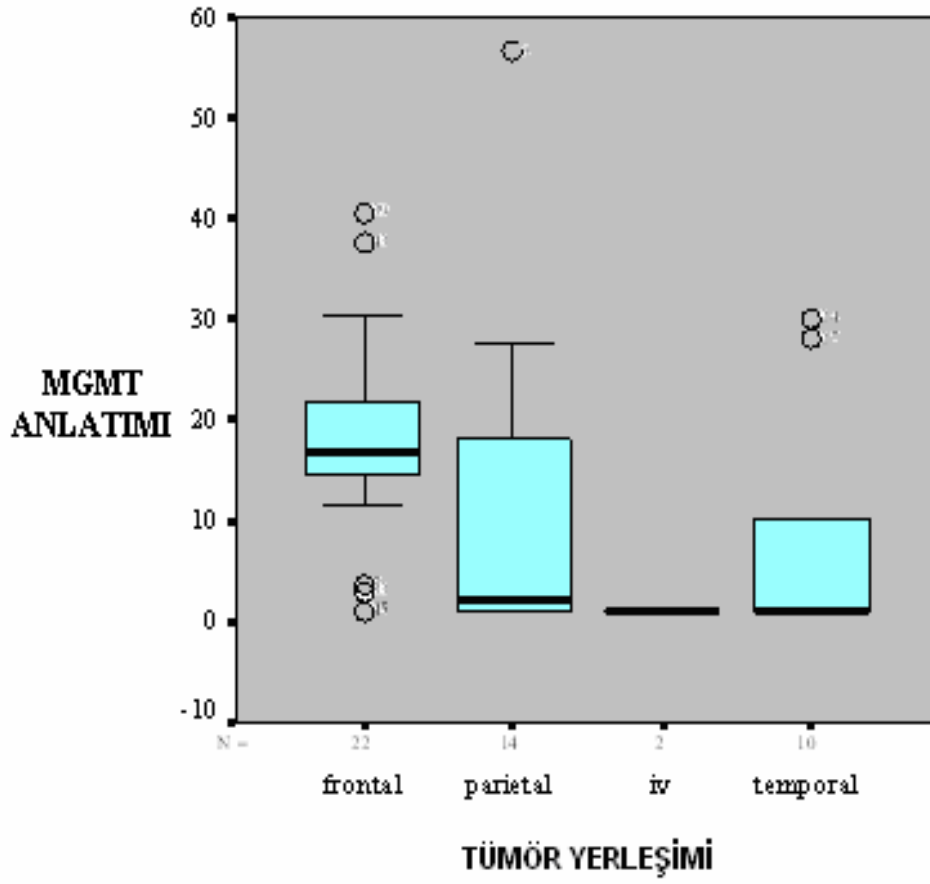
Tümörler yerleşim yerlerine göre frontal, parietal, temporal ve intraventriküler olarak değerlendirilmiş ve MGMT ve p53 anlatımlarında tümör yerleşimine göre p değerleri; sırasıyla 0,029 ve 0,014 olacak şekilde tablo 10'da da görüldüğü gibi anlamlı farklılık göstermiştir (Şekil 19, 20).

Tablo 10. MGMT, PTEN, PDGFR, EGFR ve p53 ANLATIMLARININ TÜMÖR YERLEŞİMLERİNE GÖRE Kİ-KARE DEĞERLERİ

	MGMT	PTEN	PDGFR	EGFR	p53
Chi-Square	7,084	,601	5,764	2,640	8,561
Df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,029	,741	,056	,267	,014

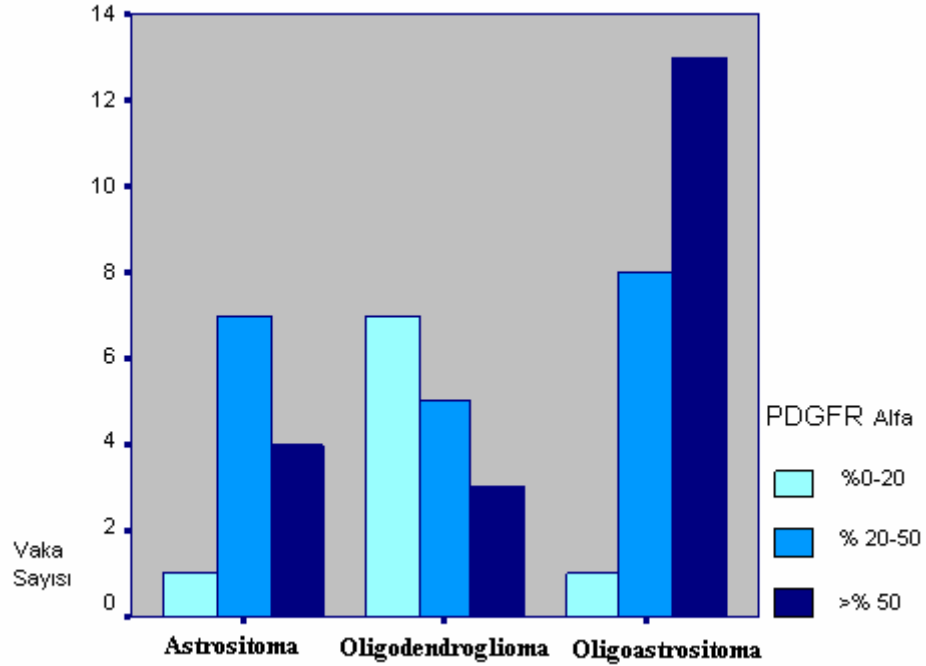


Şekil 19. p53 anlatımının tümör yerleşimlerine göre değişimi



Şekil 20. Y ekseninde tümör hücreleri içinde yüzde olarak MGMT anlatımı artışı, x ekseninde ise incelenen tümörlerin yerleşim bölgeleri ve bu bölge tümörü bulunduran vaka sayıları verilmiştir.

PTEN anlatımı Oligodendrogliomalarda düşük bulunmuştur. Bu nedenle üç histolojik tümör tipinde PTEN anlatımı anlamlı farklılık göstermiştir (P=0,017).



Şekil 21. PDGFR- α Anlatımının Histolojik Tanıya Göre Değişimi

PDGFR- α yoğunluğunun tümör histolojik tiplerine göre dağılımında en yüksek anlatım düzeyinin Oligoastrocitoma ve Astrocitomada olduğu belirlenmiştir (P=0,007) (Şekil 21). (Yoğunluk sırasıyla % 0-20, %20 -50 ve \geq %50 olacak şekilde 1000 hücre içindeki oran olarak verilmiştir)

EGFR yoğunluğu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Anlamlılık oligodendroglioma grubunda EGFR yoğunluğunun düşük olması ile ilişkilidir (Tablo 11).

Tablo 11. EGFR YOĞUNLUĞU

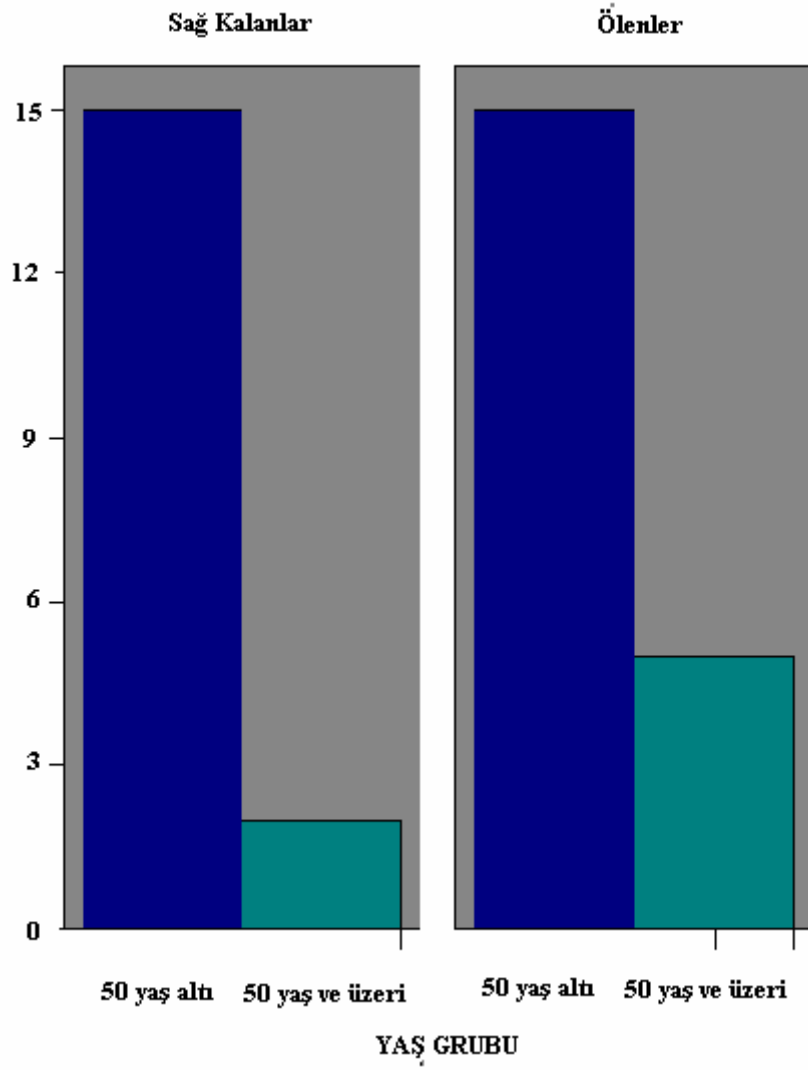
Yoğunluk sırasıyla % 0-20, %20 -50 ve \geq %50 olacak şekilde 1000 hücre içindeki oran olarak verilmiştir (P=0,03).

		EGFR YOĞUNLUĞU			Toplam
		% 0-20	%20-50	\geq % 50	
TANI A	Sayı	3	1	8	12
	Tanıdaki %	25,0%	8,3%	66,7%	100,0%
O	Sayı	7	4	5	16
	Tanıdaki %	43,8%	25,0%	31,3%	100,0%
OA	Sayı	1	4	15	20
	Tanıdaki %	5,0%	20,0%	75,0%	100,0%
Toplam	Sayı	11	9	28	48
	Tanıdaki %	22,9%	18,8%	58,3%	100,0%

PDGFR, EGFR, PTEN proteinlerinin anlatımı tanılara göre anlamlı oranda farklılık göstermiştir (Tablo 12). Anlamlılık oligo grubunda anlatımın düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 12. PDGFR, EGFR, PTEN Anlatımlarının Tanılara Göre Anlamlılığı

	PTEN	PDGFR	EGFR
Chi-Square	10,594	8,215	7,820
df	2	2	2
Asymp. Sig.	0,005*	0,016*	0,020*



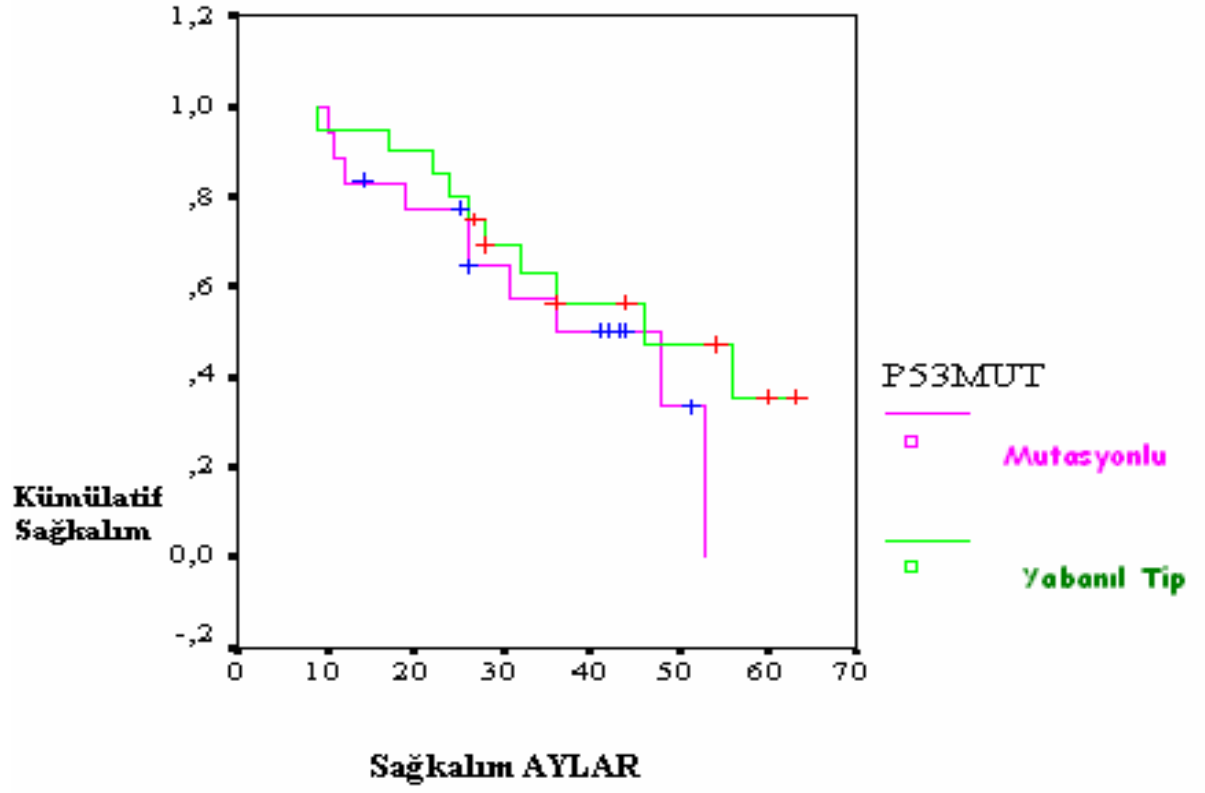
Şekil 22. Sağ kalan ve ölen hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Çalışma grubunun %85'i 50 yaş altındaki, %15'i ise 50 yaş ve üzerindeki hastalardan oluşmaktadır. Şekil 22'de yaş gruplarında ölen ve sağ olanların sayısı görülmektedir.

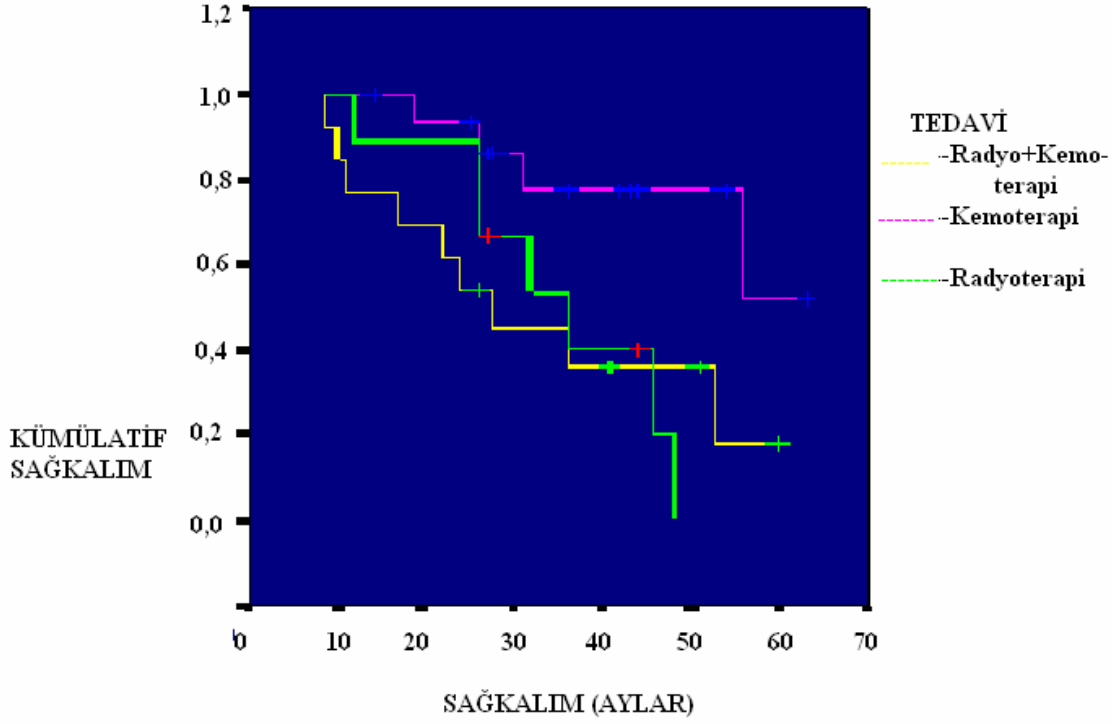
TABLO 13. Vakaların Sağkalım Özellikleri

	Astrositoma	Oligodendro glioma	Oligoastrositoma	Toplam	Median Survi (ay)
Cinsiyet					
Erkek	8	7	12	27	33,33
Kadın	4	9	8	21	35
Yaş					
<50 yaş	10	15	16	41	35,64
≥50 yaş	2	1	4	7	27,85
TP53 Mutasyonu					
Var	6	7	9	22	46
Yok	6	9	11	26	48
MGMT Anlatımı					
<%20	3	5	5	13	30,9
≥%20	9	11	15	35	39,45

Sağkalım değerlendirmelerinde TP53 mutasyonlarının sağkalıma negatif yönde etki ettiğini düşündüren ancak istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde bulunmayan sonuçlar saptanmıştır (Tablo 13). Kaplan Meier değerlendirmesinde mutasyon taşıyan kişilerin ortalama sağkalım süresi 46 ay, mutasyon taşımayanların ise 48 ay olduğu, yüzde 70 güven aralığında bulunmuştur (Şekil 23).

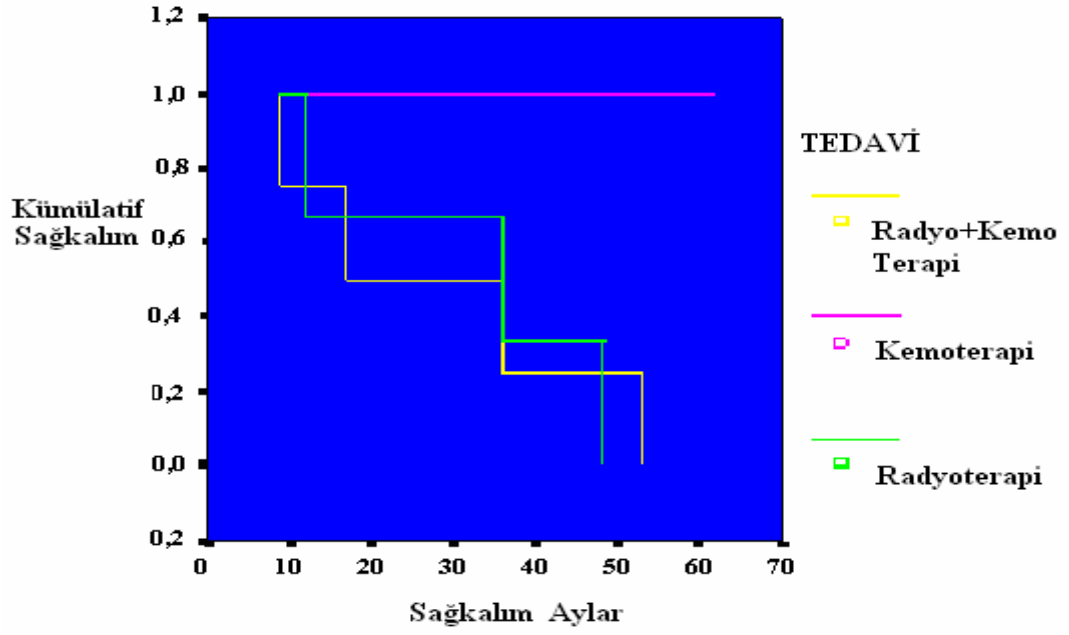


Şekil 23. TP53 mutasyonu taşıyan ve yabani TP53 bulunan tümörlü hastalarda sağkalımın aylar ile gösterilmesi

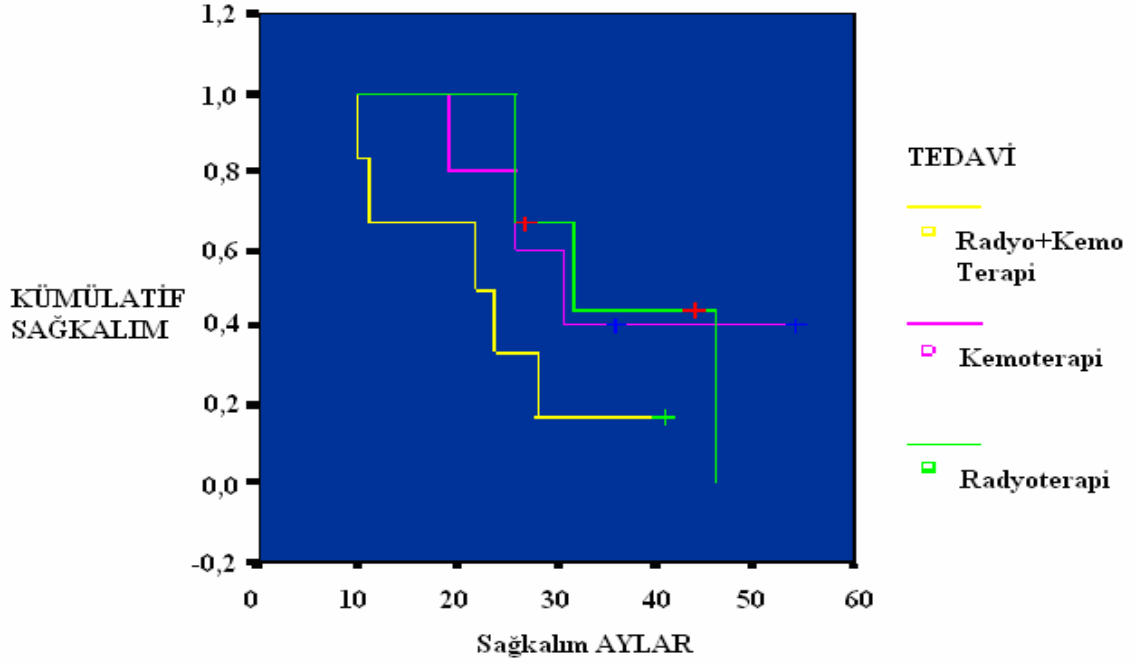


Şekil 24. Sağkalımın tedavi alt gruplarında ay olarak dağılımı.

Tedavi gruplarından radyoterapi alanların ortalama sağ kalım süreleri 36 ay iken (% 95 23,22-48.78) kemoterapi grubunda bu süre 52,84 ay olarak bulunmuştur (%95 44,46-62,23). Şekil 24'te kemoterapi, radyoterapi ve her ikisinin de kullanıldığı tedavi gruplarının sağkalım analizleri izlenmektedir. Astrositoma ve oligodendrogliomalarda tedavi gruplarına göre sağkalım Şekil 25 ve 26'da görülmektedir.



Şekil 25. Astrozitomalarda tedavi gruplarına göre sağkalım durumu



Şekil 26. Sağkalımın Oligoastrozitomalarda ay olarak tedavi gruplarındaki durumu

7. Tartışma ve Sonuç;

Gliomalar sinir destek dokusunun değişimi ile oluşan, fenotipik olarak karmaşık yapıları ve “standard olmayan” tedavi biçimleri ile etkiledikleri hasta grubunda seyir şeklinin halen karanlıkta kaldığı bir tümör grubudurlar. Tüm tümörlerin %1-2’sini ve tüm intrakranial tümörlerin % 40-45’ini oluştururlar ve en ölümcül morbiditesi en fazla olan grupturlar. Gliomaların iki ayrı yolakla geliştiği bilinmektedir (17, 31, 60). Primer GBM’da malignitede en ileri evre tümörün doğrudan doğruya teşhis edildiği, 50-60 yaşlarındaki hastaların bulunduğu grup tanımlanmaktadır. Sağkalım süresi aylarla ifade edilebilecek kadar düşüktür. Sekonder GBM ise düşük dereceli olarak daha genç yaş grubunda saptanabilmekte ve derece ilerleyerek gelişmektedir. Derece ilerleme süreleri içinde önceki gruba göre tedavi yöntemi konusunda fikir birliği bulunmayan bu ikinci gruptaki tümörlerde belirlenen moleküler değişimler tedavi yönteminin seçimi ve sağkalımın uzatılabilmesi için yol göstereceklerdir.

Hücrelerin özelliklerinin doğru değerlendirilmesi, uygun tedavi yöntemine karar verilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Gliomalar histolojik olarak astrositoma, oligodendroglioma, oligoastrositoma, ependymoma ve koroid pleksus tümörlerinden oluşurlar. Histopatolojik olarak astrositomalar; ince hücre uzantıları, yaygın sitoplazmaları, fibrilden zengin glial tümör matriksleri ile, oligodendrogliomalar; yuvarlak hiperkromatik çekirdeklerini çevreleyen net sitoplazmaları, kümes teli görünümlü kılcal damar yapıları ile, Oligoastrositomalar ise; bahsedilen tümör hücrelerini birarada yada ayrı ayrı bölgelerde bulundurmaları ile tanımlanırlar. Tümörün derecesi örnekleme yapılan tümör dokusunun tümü içinde en yüksek dereceye işaret eden bölgenin derecesine göre yapılmaktadır. Tümörün içinde daha küçük yüzdeyi oluşturan tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranının en az % 25 olması gerekmektedir. Çoğu durumda her iki hücre popülasyonunun kapladığı yüzdenin belirlenebilmesi yetersiz cerrahi örnekleme durumlarında imkansızdır (25). Bu nedenle tümör seyrinde önemi ispatlanan değişkenler olarak hastanın yaşının yanında tümörün cerrahi olarak çıkartılması da doğru tanı konulması ve hastalığın tekrarlamaması için önemli bir belirleyicidir. Tümörlerin biyolojik özelliklerinin gün ışığına çıkartılabilmesi gerek tedavinin seçilmesinde, gerekse sağkalımın uzatılabilmesinde çok gereklidir (22).

Tez çalışması kapsamında biyolojik değişiklikler gösteren tümör grubunda bu değişikliklerinin sağkalıma etkileri ve tümör fenotipleri ile ilişkileri araştırılmıştır. Düşük evre gliomalarda en sık karşılaşılan genetik düzensizlik olan TP53 mutasyonu bu evredeki tüm tümörlerin %30-45'inde bulunmaktadır (37, 38, 60, 73, 80). Kırksekiz düşük dereceli gliomada TP53 mutasyonu analizi sonucunda mutasyon taşıyan tümör örneklerinin Astrozitoma ve Oligoastrozitoma grubunun %46,8 'ini oluşturduğu bulunmuştur. Bu oran Oligodendrogliomalarda %43 olarak saptanmıştır. Burada kullanılan SSCP metodu ile p53'ün DNA'ya bağlanma işlevsel birimi mutasyonları araştırılmıştır. Watanabe ve arkadaşlarının 2003 yılında düşük dereceli gliomalarda yaptıkları p53 yolağı değişimlerini inceledikleri çalışmalarında TP53 mutasyonu araştırdıkları grubun %54'ünde saptanmış ve mutasyon taşıyan tümörlerin hiçbirinde p14ARF homozigot delesyonuna ve mdm2 amplifikasyonuna rastlanamamıştır (85). Ayrıca aynı çalışmada TP53 mutasyonuna ek olarak p14ARF metilasyonu bulunduran, dolayısıyla p53 yolağı inaktif olan tümörlerin ise tüm grubun %70'ini oluşturduğu saptanmıştır. Tez çalışmasında mdm2 ve p14ARF bulguları mdm2 amplifikasyonu ve p14ARF delesyonunun düşük dereceli gliomada seyrek olduğunu göstermektedir. P14ARF'nin işlev kaybının burada araştırılan mekanizmadan farklı bir mekanizma (metilasyon) ile gerçekleşiyor olması sonuçlara açıklık getirmektedir.

Tümör hücrelerinin tümünün en az % 20'sinin yassı, eliptik, kuvvetli eozinofilik hücrelerden oluştuğu gemistositik astrositomalarda prognozun kötü olduğu ve TP53 mutasyonunun daha sık bulunduğu bilinmektedir (67, 70, 73). Çalışma grubundaki 2 gemistositik astrositomada da TP53 mutasyonu saptanmıştır ve sağkalım süreleri sırasıyla 9 ve 11 aydır. Yaş gruplamasında 50 yaş ve üzerinde olan grupta ölenlerin sayısı, 50 yaş altındaki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda fazladır ($p < 0.005$) (Şekil.20).

Hücrede p53 protein anlatımı en az iki yolla düzenlenmektedir. Birisi transkripsiyonel olarak kısa ömürlü proteinin oluşmasını, diğeri ise translasyon sonrası p53 proteininin sabitlenmesi yoluyla gerçekleşir. Hücrenin DNA hasarı gibi acil ihtiyacı durumunda protein stabilizasyonu mekanizması devreye girerek hızlı ve yeterli düzeyde p53

proteini sağlar. Ancak transkripsiyon kontrolü mekanizması, hücrenin fizyolojik ihtiyaçları olan hücre döngüsünün kontrolü, hücre farklılaşması için döngüden çıkılması gibi durumlarda devreye girerek daha uzun sürede ve az miktarda p53 proteininin oluşmasını sağlar (3, 62). İşlevi bozuk olan p53 proteininin de mutant p53 proteini gibi tümör hücrelerinde birikmesi söz konusudur (28, 58, 62). Çalışmada İmmunohistokimyasal olarak saptanan p53 proteini birikimi mutasyonlu örneklerde 3 histolojik alt grupta da artmıştır ve oligoastrocitoma grubunda bu ilişki istatistiksel olarak en anlamlı p değerini göstermiştir ($p=0,000004$) Bu durum mutant p53 proteininin birikiminin yanısıra mutant p53'ün yapısal olarak bağlandığı yabancı p53 proteinini de etkilemesi nedeniyle gerçekleşmektedir (28). Mutant proteinin baskın olumsuz etkisi nedeniyle mutant örneklerdeki protein birikimini sadece mutant değil, ayrıca yabancı, ancak tutuklanmış p53 proteinleri oluşturmaktadır. Çalışmada kullanılan antikor (klon DO-7) proteinin hem mutant hem de yabancı tipiyle reaksiyon vermektedir. Burada ayrıca normal hücre döngüsünün değişik safhalarında yakalanmış, DNA hasarına yanıt veren hücrelerdeki, mdm2 ile bağlanma sonucu sabitlenen p53 proteini de söz konusudur.

TP53 mutasyonunun bulunmadığı durumlarda p53 yolağının diğer bileşenleri olan mdm2 ve p14ARF değişimlerinin etkisi düşünülebilir (65, 87). Bu amaçla aynı örneklerde multipleks PZR yöntemiyle mdm-2 amplifikasyonu ve p14 ARF delesyonu normal beyin dokusuyla karşılaştırılarak araştırılmıştır. Düşük dereceli gliomalarda önceki çalışmalarda mdm2 ve p14ARF değişikliklerinin çok seyrek olduğu ancak bu değişikliklerin ileri evre tümörlerde belirgin olduğu saptanmıştır (53, 67, 68). Gerek mdm2 amplifikasyonu gerekse p14ARF delesyonunda bizim grubumuzda istatistiksel anlamlılığa rastlanmamıştır. Dolayısıyla p53 proteininin birikiminin p53 proteinin işlev bozukluğuna bağlı olduğu söylenebilir.

Tümörler sıklıkla hücre döngüsünün uyarımı, kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan otokrin uyarı zinciri oluşturan büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin anlatımında artış gösterirler. Beyin dokusunda embriyonik dönemde glial öncüllerin yerleşimi, farklılaşarak oluşturacakları doku tipi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu aşamada hücrelere farklılaşma ve büyüme sinyali ileten yolaklar dikkat çekmektedirler. PDGFR-

α , EGFR ve PTEN proteinleri gliomaların kaderinde etkindirler. Bu tür tümör belirteçleri ile gliomaların alttiplerinin belirlenmesi ve kötü seyir göstermesi öngörülen hastaların önceden saptanarak daha erken ve daha etkin tedavi almaları sağlanabilir (79). Özellikle tümör hücresi büyümesinin kontrol edilebilmesi için hedeflenen tirozin kinaz yapısındaki bu büyüme faktörleri genlerinin amplifikasyonu ve artmış anlatımlarının saptanması tedaviye yön verebilecek özelliklerdendir. Varela ve arkadaşları 103 glioma vakası içinde inceledikleri 25 düşük dereceli glioma grubunda EGFR ve PDGFR- α anlatımındaki artışın prognozu kötü yönde etkilediğini göstermişlerdir (79). Ancak aynı çalışmada anaplastik astrositoma ve GBM'de EGFR ve PDGFR- α anlatımı prognoz ile ilişkili bulunamamıştır. Tez çalışmasında EGFR ve PDGFR- α anlatımı ve sağkalım analizi yapıldığında istatistiksel olarak anlatım artışı olan ve olmayan gruplar arasında sağkalım sürelerindeki farklılığın anlamlı olmadığı anlaşılmıştır.

Değerlendirme sistemindeki farklılıklar sağkalım analizinde alınan sonuçların farklılığına neden olabileceği gibi, Varela ve arkadaşlarının çalışmalarında 25 düşük dereceli gliomanın izlem süresi en az ve en çok sağkalım süreleri (5-122 ay) çalışmamızdakine göre daha uzundur. Tez çalışmasında hastaların izlemleri devam ettirilecek ve EGFR, PDGFR- α ve PTEN anlatım değişiklikleri gösteren gruplarda sağkalımın farklılığı sürenin sonunda tekrar değerlendirilecektir.

Histolojik tanıda açık noktaların bulunması ve fenotipik değerlendirmenin tümörün kaderini yansıtmaması nedeniyle belirli histolojik tipleri işaret edebilecek biyolojik değişkenlerin bulunmasında PDGFR- α , EGFR ve PTEN proteinleri çalışılmıştır. Bu çalışmada tümör histolojik gruplarında PTEN, PDGFR- α ve EGFR anlatımları karşılaştırılmış ve histolojik alttipler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p < 0,05$). Oligodendrogliomalarda EGFR, PDGFR- α ve PTEN anlatımı önemli oranda düşüktür. PDGFR- α anlatımı Astrositoma ve Oligoastrositomalarda daha yüksek bulunmuştur ($p = 0,007$). PTEN ve EGFR anlatımları yüzde hücre sayısı olarak Astrositoma ve Oligoastrositomalarda daha yüksek bulunmuştur ($p = 0,005$ ve $p = 0,020$). Tanı güçlüğü yaşanan vakalarda bu değişkenlerin tümör tanımlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

MGMT proteini hasarlı DNA'nın tamirinde görev alır. Artışının bulunduğu tümör hücrelerinin alkilleyici ilaçlardan etkilenmediği, kemoterapiye direnç gösterdiği bilinmektedir. Fakat anlatımındaki azalmanın da malign dönüşümle ilişkili olduğu düşünülmektedir (89). Yuan ve arkadaşlarının çalışmalarında p53 ile MGMT anlatımının ters orantılı olduğu bildirilmiştir (89). Bu çalışmada iki protein istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde olmayan %15,6 oranında ters orantılı bir ilişki göstermiştir. MGMT proteinin anlatımında azalma, promotor bölgesinin metillenmesi ve genin sessizleşmesi ile oluşmaktadır. Bu değişimin ilerideki çalışmalarla ortaya konulması tedaviye yanıtın nasıl olacağını anlamamızı sağlayacağı gibi aynı zamanda kemoterapi direncinin MGMT ifadesinin baskılanması ile sağlanmasına da yol gösterebilecektir.

Gliomaların anatomik yerleşimleri tümör kitlesinin cerrahi olarak tamamen çıkartılabilmesinde önemli bir etkidir. Tedavi yöntemlerinde prognozu etkileyen en önemli belirteç, kalıntı tümör kitlesi bırakılmamasıdır ancak tümör yerleşim bölgesi çıkartıma uygun olduğunda mümkün olmaktadır. Düşük evre gliomlar daha çok ikincil motor alanlarda yerleşim göstermektedirler ve oligodendrogliomaların frontal ve temporal loblarda bulunduğu bilinmektedir (20, 21, 23). Tez çalışmasında tedaviye yanıtta kemoterapi direnci beklenen MGMT anlatım artışı bulunan tümörlerin parietal ve temporal bölgelerde daha sık yerleştiği saptanmıştır (p=0.029). p53 anlatımı ise frontal ve temporal bölgede yerleşen tümörlerde daha yüksek bulunmuştur (p=0,014). Bu şekilde görüntüleme çalışmaları ile verilecek tedavinin öngörülmesi mümkün olacağı gibi aynı zamanda prognoz konusunda da fikir edinebilmek mümkün olacaktır.

Çalışmada en kısa izlem süresi dokuz ay en uzun izlem süresi ise 63 aydır. Çalışmaya alınan gruba uygulanan tedavi yöntemine göre sadece radyoterapi, sadece kemoterapi alanlar ve her iki tedavinin uygulandığı grup olarak üç ana gruba ayrılmıştır. Sağkalım analizlerinde Cox regresyon analizi ile yapılan değerlendirmede tanıya göre Oligodendroglioma grubunun ve kemoterapi alan grubun sağkalım süresinin daha uzun olduğu saptanmıştır. Kemoterapi alan grupta median yaşam süresi 57 ay iken radyoterapi alan grupta sağkalım süresi 39 ay olarak bulunmuştur. Tedavi grupları arasında radyoterapi alan ve kemoterapi alan grupların sağkalım analizi TP53

mutasyonlarının kötü prognostik belirteci olduğunu göstermektedir. TP53 mutasyonu bulunan tümör hastalarının median sağkalımı 46 ay iken mutasyon bulunmayan vakalarda 48 aydır. Sağkalım bilgileri Eylül 2005'te yenilenmiştir. Tez çalışmasında adres ve telefon bilgileri bulunamayan 10 hastaya ulaşılamamıştır. Sağkalım sonuçlarına ulaşılabilen 38 hastanın %52,6'sının öldüğü saptanmıştır.

Çalışmada izlem süresinin kısa olması nedeniyle sağkalım konusunda net bir sonuç çıkartılamamaktadır. Halen sağ olan hastaların 2 yıl sonunda kontrollerinin yapılması planlanmaktadır. Seksen hafta üzerinde median izlem süresi takip edilen düşük dereceli astrositoma ve oligoastrositoma hastalarının incelendiği Stander ve arkadaşlarının çalışmasında diğer değişkenlerden bağımsız olarak TP53 mutasyonu varlığının kötü prognoz belirteci olduğu saptanmıştır (73).

Bu çalışmanın amacı olan biyolojik değişimlerin belirlenerek tümör kimliğinin aydınlatılması ve klinik cevabın öngörülmesi konularında alınan verilerin geçerliliği için uzun izlem süresinin gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda hastaların izlenmesine devam edilecek ve beş yıllık izlem süresi tamamlanacaktır.

SON SÖZ

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Düşük dereceli glioma tanısı alan hastaların ileri yaşta olanlarında sağkalım süresi anlamlı derecede düşüktür.
- İzlem süresi tamamlandığında prognoz öngörüsünde bulunulabilecek moleküler değişiklikler netlik kazanacaktır ancak istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sonuçlar TP53 mutasyonu taşıyıcılarında sağkalım süresinin kısa olabileceğini düşündürmektedir.
- P14ARF delesyonu ve mdm2 amplifikasyonu bu grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hayvan modellerinde p14ARF' nin karsinogenezde etkisi ortaya konmuştur. P14ARF ifadesinin düşük bulunduğu durumlarda özellikle 1β ekzonunun kaybedildiği saptanmıştır. Homozigot delesyonunun bulunduğu yüksek evre

gliomalarda sağkalımın anlamlı düzeyde düşük olması dikkat çekicidir (53). Özellikle düşük evre gliomalarda p14ARF'nin delesyon ile değil metillenme nedeniyle işlevini kaybetmiş olabileceği üzerinde durulmaktadır (83, 87). Watanabe ve arkadaşları çalışmalarında düşük evre gliomalarda bu proteinin ifadesinin azalmasında gen delesyonunun değil metilasyon etkisinin etkili olduğunu göstermişlerdir (84). Tez çalışmasında saptanan sonuç bu evre tümörler için önceki çalışmaları desteklemektedir. Bu nedenle p14ARF metillenme araştırmasının yapılması, p53 işlev kaybının önemli rol oynadığı düşük evre gliomalarda yol gösterici olacaktır (10,12).

- DNA hasarına ve dolayısıyla mutasyonların oluşmasına yol açan DNA metilasyonunun (metilguanin oluşumu) tamirinde görevli olan MGMT'nin anlatımı parietal ve temporal yerleşimli tümörlerde artmış olarak bulunduğundan bu tümörlerde alkilleyici ajanlarla tedaviye direnç beklenmelidir.

- TP53 mutasyonu taşıyan tümörlerde p53 anlatımının da artmış olması nedeniyle frontal ve temporal yerleşimli düşük evre gliomaların kötü prognozlu olmaları öngörülmelidir.

- PDGFR- α ve EGFR özellikle tedavide hedeflenen odaklar olmaları nedeniyle anlatımlarının artmış olduğu gliomaların belirlenmesi önemlidir. Ayrıca glial farklılaşma sürecinde etki ederek glioma hücrelerinin histolojik anlamda kaderini belirlemektedirler.

- Tez çalışmasında sağkalım ile araştırılan biyolojik değişkenlerin ilişkisi sağkalan hastaların beş yıllık izlem süreleri tamamlandıktan sonra tekrar değerlendirilecektir. Hastaların izlem süreleri aralıklarla devam ettirilecektir.

8. KAYNAKLAR

1. Andersson U, Guo D, Malmer B, Bergenheim AT, Brannstrom T, Hedman H, Henriksson R. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol (Berl)*;108(2):135-42, 2004.
2. Andrea J., Hansson I., Afink G.B., Nister M. Platelet Derived Growth Factor Receptor- α in Ventricular Zone Cells and in Developing Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 17, 1001-1013, 2001.
3. Ashcroft M., Vousden K.H.: Regulation of P53 Stability. *Oncogene*, 18:7637-7643, 1999.
4. Bauman G., Lote K., Larson D., Stalpers L., Leighton C., Fisher B., Wara W., MacDonald D., Stitt L., Cairncross G. : Pretreatment Factors Predict Overall Survival For Patients with Low-Grade Glioma: A Recursive Partitioning Analysis. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 45:4, 923-929, 1999.
5. Besson A., Robbins SM., Yong VW.: PTEN/MMAC1/TEP1 in Signal Transduction and Tumorigenesis. *Eur. J. Biochem.* 263:605-611, 1999.
6. Brat D.J., James D., Jedlicka A.E., Connolly D.C., Chang E., Castellani R.J., Schmid M., Schiller M., Carson D.A., Burger P.C. : Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. *American J. of Pathology.* 154: 5 ; 1431-1438. 9, 1999.
7. Bian X-W, Shi J. Q., Liu F.X. Pathologic Significance of Proliferative Activity and Oncoprotein Expression in Astrocytic Tumours. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* ; 22; 429-437, 2000.
8. Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A.F., Delattre J.Y. Primary Brain Tumours in Adults. *Lancet*; 361; 323-331, 2003.
9. Beroud C., Soussi T. The UMD-p53 Database: New Mutations and Analysis Tools. *Human Mutation* 21: 176-181, 2003.
10. Boudreau C. R., Yang I., Liao L. M.: Gliomas: Advances in Molecular Analysis and Characterisation. *Surgical Neurol.*, 64: 286-294, 2005.
11. Cairncross J. G.: Classification and pathobiology of low-grade glial and glioneuronal neoplasms: The Practical Management of Low-Grade Primary Brain Tumors. Jack P. Rock, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 1999
12. Cavaliere R., Lopes M. B. S., Schiff D.: Low-grade Gliomas: An Update on

- Pathology and Therapy. *Lancet Neurol.*, 4: 760-770, 2005.
13. Chen P., Aldaphe K., Wiencke J.K., Kelsey K.T., Miike R., Davis R.L., Liu J., Kesler- Diaz A., Takahashi M., Wrensch M. Ethnicity Delineates Different Genetic Pathways in Malignant Glioma. *Cancer Research* 61: 3949-3954, 2001.
 14. Cleasson-Welsh L. Platelet-derived Growth Factor Receptor Signals. *J. Biol. Chemistry* 269: 51: 32023-32026, 1994.
 15. Chen P., Iavarone A., Fick J., Edwards M., Prados M., Israel M.A. Constitutional p53 Mutations Associated with Brain Tumours in Young Adults. *Cancer Genetics Cytogenetics*. 82:106-115, 1995.
 16. Coombs N.J., Gough A.C., Primrose J.N. Optimisation of DNA and RNA Extraction from Archival Formalin-Fixed Tissue. *Nucleic Acids Research* 27:16, 1999.
 17. Claus EB., Black PM.: Survival rates and patterns of care for patients diagnosed with supratentorial low-grade gliomas: data from the SEER program, 1973-2001. *Cancer. Abstr.* 15:106(6);1358-63, 2006.
 18. Collins V. P. Cellular Mechanisms Targeted During Astrocytoma Progression. *Cancer Letters*. 188; 1-7, 2002.
 19. Di Cristafano, Pandolfi P. The Multiple Roles of PTEN in Tumour Suppression. *Cell*.100:387-390, 2000.
 20. Ding H., Nagy A., Gutmann D.H., Guha A: A Review of Astrocytoma Models. *Neurosurg. Focus*. 8,4, 2000.
 21. Duffau H., Capelle L.: Preferential Locations of Low-Grade Gliomas; Comparison with Glioblastomas and Review of Hypothesis. *Cancer*. 100:12, 2622-2626, 2004.
 22. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG.: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N.Engl. J. Med.* Nov 9:343(19):1350-4, 2000.
 23. Engelhard H. H., Stelea A., Mundt A.: Oligodendroglioma and Anaplastic Oligodendroglioma: Clinical Features, Treatment and Prognosis. *Surg. Neurol.*,60:443-456, 2003.
 24. Editorial, Darts in the Dark Cure Animal but not Human, *Brain Tumors*.*Arch. Neurol.*; 59; 721-724, 2002.

25. Felsberg J., Reifenberger G.: Neuropathology and Molecular Genetics of Diffusely Infiltrating Cerebral Gliomas. *Med. Laser Appl.*, 17: 133-146, 2002.
26. Ford J. M. Regulation of DNA Damage Recognition and Nucleotide Excision Repair: Another Role for P53. *Mutation Research*. 577: 195-202, 2005.
27. Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD. Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer* 17;60(2):168-73, 1995.
28. Guimaraes D.P., Hainaut P.:TP53: A Key Gene in Human Cancer. *Biochimie*, 84: 83- 93, 2002.
29. Hashimoto N., Murakami M., Sasajima H., Takahashi Y., Mineura K.:Diagnostic Molecular Genetics and Its Application to Clinical Decision in Brain Tumors. *International Congress Series.*, 1247: 221-229, 2002.
30. Hartmann C., Xu X., Bartels G., Holtcamp N., Gonzales I.A., Tallen G., Von Deimling A. PDGFR- α in 1p/19q LOH Oligodendrogliomas. *Int. J. Cancer*; 112; 1081-1082, 2004.
31. Herfarth K.K., Gutwein S., Debus J.: Post Operative Radiotherapy of Astrocytomas. *Seminars in Surgical Oncology*. 20: 13-23, 2001.
32. Hernandez-Boussard T, Rodriguez-Tome P, Montesano R, Hainaut P.: IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. *International Agency for Research on Cancer*. 14(1):1-8, 1999.
33. Huang H., Colella S., Kurrer M., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. Gene Expression Profiling of Low-Grade Diffuse Astrocytomas by cDNA Arrays. *Cancer Research* 60: 6868-6874, 2000.
34. Hulsebos TJ, Troost D, Leenstra S. Molecular-genetic characterization of gliomas that recur as same grade or higher grade tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 75(5):723-6, 2004.
35. Hupp T.R., Lane D.P., Ball K.L.:Strategies for Manipulating the p53 Pathway in the Treatment of Human Cancer. *J. Biochem*. 352:1-17, 2000.
36. Ichimura K., Bolin M.B., Goike H.M., Schmidt E.E., Moshref A., Collins V.P. Deregulation of the p14/MDM2/P53 Pathway Is a Prerequisite for Human Astrocytic Gliomas with G1-S Transition Control Gene Abnormalities. *Cancer Research* 60; 417-424, 2000.

37. Ishii N., Tada M., Hamaou M.F., Janzer R.C., Meagher-Villemure K., Wiestler O.D., Tribolet N., Van Meir E.G.: Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumours evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor. *Oncogene*, 18: 5870-5878, 1999.
38. Ishii N., de Tribolet N. Are p53 mutations and p53 overexpression prognostic factors for astrocytic tumours? *Crit. Rev. Neurosurg.* 8:269-274, 1998.
39. Izumoto S., Ohnishi T., Kanemura H., Arita N., Maruno M., Moriuchi S., Suzuki T., Yoshimine T. PTEN Mutations in Malignant Gliomas and Their Relation with Meningeal Gliomatosis. *J. Neuro-oncol.* 53: 21-26, 2001.
40. Johannesen T.B., Langmark F., Lote K.: Cause of Death and Long-Term Survival in Patients with Neuro-epithelial Brain Tumours: A Population Based Study. *European J. of Cancer.* 39: 2355-2363, 2003.
41. Kamijo T., Weber J.D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M.F., Sherr C. J. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 95(14): 8292–8297, 1998.
42. Kato H., Kato S., Kumabe T., Sonoda Y., Yoshimoto T., Han S-Y., Suzuki T., Shibata H., Kanamaru R., Ishioka C. Functional Evaluation of P53 and PTEN Gene Mutations in Gliomas. 6; 3937-3943, 2000.
43. Kleihues P., Cavenee WK.: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. WHO Classification of Tumours. IARC Press, 29-39, 2000.
44. Konopka G., Bonni A. Signaling Pathways Regulating Gliomagenesis. *Current Molecular Medicine*, 3, 73-84, 2003.
45. Kukita Y., Tahira T., Sommer S.S., Hayashi K. SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation* 10; 400-407, 1997.
46. Margison G.P., Santibanez-Koref M.F.: O 6-alkylguanine-DNA Alkyltransferase: Role in Carcinogenesis and Chemotherapy. *BioEssays.* 24:255-266, 2002.
47. Mayo D.M., Donner D.B., The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 9:462-467, 2002.
48. McLendon R.E., Wikstrand C.J., Matthews M.R., Al-Baradei R., Bigner S.H., Bigner D.D. Glioma-associated Antigen Expression in Oligodendroglial Neoplasms: Tenascin and Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Histochem Cytochem* 48: 1103-1110, 2000.

49. Merlo A. Genes and Pathways driving Glioblastomas in Humans and Murine Disease Models. *Neurosurgery Reviews*; 26; 145-158, 2003.
50. Mitsumoto Y., Nakajima T., Marutani M., Kashiwazaki H., Moriguchi M., Kimura H., Okano T., Kagawa K., Tada M. Loss of p53 Transcriptional Activity in Hepatocellular Carcinoma Evaluated by Yeast-Based Functional Assay: Comparison with p53 Immunohistochemistry. *Human Pathology* 35; 3, 2004
51. Nakamura M., Konishi N., Tsunoda S., Nakase H., Tsuzuki T., Aoki H., Sakitani H., Inui T., Sakaki T.: Analysis of Prognostic and Survival Factors Related to Treatment of Low-Grade Astrocytomas in Adults. *Oncology*.,58:108-116, 2000.
52. Nakamura M., Watanabe T., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H.: Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C→A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *22:10, 1715-1719, 2001.*
53. Newcomb E.W., Alonso M., Sung T., Miller D.C. Incidence of p14 ARF Gene Deletion in High-grade Adult and Pediatric Astrocytomas. *Human Pathology* 31: 115-119, 2000.
54. Nieder C., Petersen S., Petersen C., Thames H. D.:The Challenge of p53 as Prognostic and Predictive Factor in Gliomas. *Cancer Treatment Reviews*.,26:67-73, 2000.
55. Noble M. Can Neural Stem Cells Be Used to Track Down and Destroy Migratory Brain Tumour Cells While Also Providing a Means of Repairing Tumour-Associated Damage? *PNAS*; 97; 23; 12393-12395, 2000.
56. Noble M., Dietrich . :The Complex Identity of Brain Tumours; Emerging Concerns Regarding Origin, Diversity and Plasticity. *Trends in Neuroscience*, 27; 3: 148-154, 2004.
57. Nothwang H.G., Hildebrandt F. Chapter 3, Purification of Nucleic Acids From Eukaryotic Cells. *Techniques in Molecular Genetics*, Springer Lab.Press. 1999.
58. O'Brate A., Giannakakou P.: The Importance of P53 Location: Nuclear or Cytoplasmic Zip Code? *Drug Resistance Updates*. 6:313-322, 2003.
59. Paunu N.: Familial Glioma, Molecular Genetic and Epidemiological Study, Academic Dissertation. *Acta Universitatis Tamperantis*, 863: 20-55, 2002.
60. Peraud A., Friedrich W.K., Wiestler O.D., Kleihues P., Reulen H-J.: Prognostic

Impact of TP53 Mutations and P53 Protein Overexpression in Supratentorial WHO Grade II Astrocytomas and Oligoastrocytomas. *Clinical Cancer Research*. 8; 1117-1124, 2002.

61. Riemenschneider M.J., Koy T.H., Reifenberger G. Expression of Oligodendrocyte Lineage Genes in Oligodendroglial and Astrocytic Gliomas. *Acta Neuropathologica*. 107: 277-282 .2004

62. Rotter V., Ronen D.: Expression of p53 in Differentiation and Apoptosis and Its Deregulation in Tumour Cell. *Molecular Cell Biology*, 11:327-330,1998.

63. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Chapter 5. 5.1 Agarose Gel Electrophoresis 1989

64. Sano T., Lin H., Chen X., Langford L.A., Koul D., Bondy M. L., Hess K.R., Myers J.N., Hong Y.K., Yung W., K., A., Steck P. A.: Differential Expression of MMAC/PTEN in Glioblastoma Multiforme: Relationship to Localization and Prognosis. *Cancer Research*, 59:1820-1829, 1999

65. Schiebe M., Ohneseit P., Hoffmann W., Meyermann R., Rodemann H.P., Bamberg M. Analysis of Mdm2 and P53 Gene Alterations in Glioblastomas and Its Correlation with Clinical Factors. *J. Neuro-oncol*.49:197-203 (2000)

66. Schlott T., Scharf J.G., Gorzel C., Middel P., Spring H. Cirrhotic Livers Reveal Genetic Changes in the MDM2-P14ARF System of Cell Cycle Regulators. *British J. of Cancer* 86:1290-1296 (2002)

67. Shapiro J.R. Genetic Alterations Associated with Adult Diffuse Astrocytic Tumours. *American J. of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)*115: 194-201 (2002).

68. Sharpness N. E.: INK4 α /ARF A Multifunctional Tumour Suppressor Locus. *Mutation Research*.576:22-38(2005)

69. Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W., Stone E.M. The Sensitivity of SSCP Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics*. 16, 325-332, (1993)

70. Soussi T. Focus on the p53 Gene and Cancer: Advances in TP53 Mutation Research. *Human Mutation*. 21: 173-175 (2003).

71. Soussi T., Beroud C.: Significance of TP53 Mutations in Human Cancer: A Critical Analysis of Mutations at CpG Dinucleotides.:*Human Mutation* 21:192-200 (2003).

72. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P.: Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.* Jan;16(1):102-8, 2005.
73. Stambolic V., MacPherson D., Sas D., Lin Y., Snow B., Jang Y., Benchimol S., Mak T. W. Regulation of PTEN Transcription by p53. *Molecular Cell.* 8, 317-325, (2001).
74. Stander M., Peraud A., Lerouch B., Kreth F.W.: Prognostic Impact of TP53 Mutations and P53 Protein Overexpression in Supratentorial WHO Grade II Astrocytomas and Oligoastrocytomas. A Long-Term Analysis. *Cancer.*, 101: 1028-1035, (2004).
75. Sulis M.L., Parsons R. PTEN from Pathology to Biology. *Trends in Cell Biology.* 13; 478-483 (2003).
76. Surdhar G. K.: Cycle sequencing of PCR Products. Ed. Theophilus B.D.M., Rapley R. *Methods in Molecular Biology, :PCR Mutation Detection Protocols Vol. 187, s 65-72* , Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2002.
77. Uno M., Oba-Shinjo S.M., de Aguiar P.H., Leite C.C., Rosemberg S., Miura F.K., Junior R.,M., Scaff M., Marie S.K.N. Detection of Somatic TP53 Splice Site Mutations in Diffuse Astrocytomas. *Cancer Letters* 224:321-327, 2005.
78. Van Meir EG, Roemer K, Diserens AC, Kikuchi T, Rempel SA, Haas M, Huang HJ., Friedmann T, de Tribolet N, Cavenee WK.: Single cell monitoring of growth arrest and morphological changes induced by transfer of wild-type p53 alleles to glioblastoma cells. *PNAS* 14;92(4):1008-12, 1995.
- 79.. Varela M., Ranuncolo S.M., Morandi A., Lastiri J., Joffe E.B.D.K., Puricelli L.I., Pallotta M.G. EGFR and PDGFR, But Not bcl-2, Overexpression Predict Overall Survival in Patients with Low-Grade Astrocytomas. *Journal of Surgical Oncology*; 86; 34-40, 2004.
80. Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. :p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992. 81. Marieb; *Human Anatomy & Physiology* 5th edition, Benjamin Cummings, San Francisco 2001
82. University of Dundee, Biomedical Research Center, Images page, week 21, 2004.

83. Watanabe K., Sato K., Biernat W., Tachibana O., Ammon K., Ogata N., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H.; Incidence and Timing of p53 Mutations during Astrocytoma Progression in Patients with Multiple Biopsies. *Clin. Canc. Res.* 3:523-530 1997.
84. Watanabe T., Katayama Y., Komine C., Yoshino A., Ogino A., Ohta T., Fugushima T. O6 methylguanine-DNA Methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int. J. Cancer*: 113, 581-587, 2005.
85. Watanabe T., Katayama Y., Yoshino A., Komine C., Yokoyama T. Deregulation of the TP53/P14 ARF Tumor Suppressor Pathway in Low-Grade Diffuse Astrocytomas and Its Influence on Clinical Course. *J. Neurooncol.* 9; 4884-4890, 2003.
86. Watanabe T., Nakamura M., Kros J.M., Burkhard C., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. Phenotype vs Genotype Correlation in Oligodendrogliomas and Low-Grade Diffuse Astrocytomas. *Acta Neuropathologica* 103: 267-275, 2002.
87. Weber J.D., Jeffers J.R., Rehg J.E, Randle D.H., Lozano G., Roussel M.F., Sherr C.J., Zambetti G.P. P53-independent functions of the p19ARF tumor suppressor. *Genes and Development* 14: 2358-2365, 2000.
88. V.P. Collins: Brain Tumours: Classification and Genes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 75: Supp. II ii2-ii11, 2004.
89. Yuan Q., Matsumoto K., Nakabeppu Y., Iwaki T. A Comparative Immunohistochemistry of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neuropathology*; 23; 203-209; 2003.
90. Zhou X., Li Y., Hoang-Xuang K., Laurent-Puig P., Mokhtari K., Longy M., Sanson M., Delattre Jean-Yves., Thomas G., Hamelin R. Mutational Analysis of The PTEN Gene in Gliomas: Molecular and Pathological Correlations. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 84, 150-154 , 1999.
91. Zhou X-P., Sanson M., Hoang-Xuan K., Robin E., Taillandier L., He J., Mokhtari K., Cornu P., Delattre J-Y, Thomas G., Hamelin R., ANOCEF Group. Germline Mutations of P53 but not p16/CDKN2 or PTEN/ MMAC1 Tumor Suppressor Genes Predispose to Gliomas. *Annals of Neurology.* 46; 6; 1999; 913-916.
92. Zhu Y., Parada L.F.: The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature Reviews Cancer.* 2:616-626, 2002.

ÖZGEÇMİŞ

İSİM; Pınar
SOYADI; Eren
DOĞUM YERİ; İstanbul
DOĞUM TARİHİ; 14.05.1971
MEDENİ DURUMU; Evli
ÇOCUK; 1
MAIL; pinaren@yahoo.com,
pinaren@gmail.com

EĞİTİM DURUMU;

2000- Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı
2004 Pennsylvania Üniv. Tıp Fakültesi Patoloji Lab. İmmunogenetik Bölümü Stajı
2000-1997 Haydarpaşa Numune Hastanesi Aile Hekimliği Uzmanlığı
1996-1995 Mecburi Hizmet
1994-1988 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi (Dönem 19.luğu)
1988-1982 Erenköy Kız Lisesi (Dönem 3.sü)

KATILDIĞI SEMİNERLER;

Sağlık Kuruluşları İşletmeciliğinde Kalite, Tesis ve Risk Yönetimi
Sertifika Programı Boğaziçi Üniv. 28 Şubat- 29 Mayıs 1998
Ulusal Prenatal Tanı ve Genetik Kongresi. İzmir, Mayıs 2000
European Society of Gene Therapy 9th Meeting. Antalya, Kasım 2001
European Society of Human Genetics Congress ESHG. Strazburg 2002
Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi. Konya, Kasım 2003
İkinci Ulusal Sinirbilimleri Kongresi. Bursa, 16-20 Nisan 2003
WasPaLM Dünya Patoloji Kongresi İstanbul, Mayıs 2005
European Renal Association- European Dialysis and Transplantation Association
Congress ERA-EDTA 2005
EFI Avrupa Histokompatibilite ve İmmunogenetik Kongresi 2005

SEÇİLMİŞ YAYINLAR;

Eren P., Goral S., Bloom R., Doyle A., Grossmann R., Israni A., Najj A., Sellers M., Markmann J., Kearns J., Kamoun M. Impact of Sensitization to HLA Antigens on Receiving a Second Kidney Transplant After a Failed Graft. ERA-EDTA Neph. Dial. Transplantation Vol 20 Suppl 5 169 SP452 June 2005

Goral S., **Eren P.**, Bloom R., Doyle A., Grossmann R., Israni A., Najj A., Sellers M., Markmann J., Kearns J., Kamoun M. Effects of HLA Mismatches and PRA on Second Listing after a Failed Kidney Transplant: Prospect of Receiving a Second Transplant and Graft Survival. ATC American J. of Transplantation Spl. 11 (5) 2005;351(abst 764)

Eren P., Uyar S.B., Kılıç T., Çirakoğlu B., Pamir M. N., Sav A.; Düşük Grade Gliomalarda PTEN, PDGFR-ALFA, EGFR Ekspresyonu. Sözlü Sunum Waspalm 2005

Aker F.V., Özkara S., **Eren P.**, Peker Ö. Cerebellar liponeurocytoma/lipidized medulloblastoma. J Neurooncol. 2005 Jan;71(1):53-9. Review.

Eren P. ABO Sistemi ve Genetik Özellikleri. Damla Dergisi. Sayı 55, Temmuz-Ağustos 2003 Review.

Eren P. Trisomi 21'in ve Nöral Tüp Defektinin Prenatal Tanısında İkinci Trimester AFP, hCG, uE3 Testlerinin Klinik Sonuçları (Uzmanlık Tezi) 2000