



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



GLİOBLASTOMA CD133+ KANSER KÖK HÜCRELERİNDE YENİ YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve Gülsen BAL

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

ANKARA

2016

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİOBLASTOMA CD133+ KANSER KÖK
HÜCRELERİNDE YENİ YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Merve Gülsen BAL

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

Bu tez TUBİTAK 114S189 numaralı 1003 projesi ile desteklenmiştir.

**ANKARA
2016**

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Glioblastoma CD133+ Kanseri Kök Hücrelerinde Yeni Yüzey Belirteçlerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: *Merve Gülsen BAL*
Tarih: *25.06.2016*
İmza:

Merve Gülsen

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında
MERVE GÜLSEN BAL tarafından hazırlanan

“Glioblastoma CD133+ Kanser Kök Hücrelerinde Yeni Yüzey Belirteçlerinin
Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ**
olarak **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.06.2016



İmza

Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı



İmza

Yard. Doç. Dr. Özgür ŞAHİN

Bilkent Üniversitesi

Üye



İmza

Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA

Ankara Üniversitesi

Üye

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

İmza

Prof. Dr. K. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan Formu	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1.GİRİŞ	1
1.1.Sinir Sistemi Hücreleri	1
1.2. MSS Tümörleri	2
1.2.1. Glioblastoma	3
1.2.1.1. GBM İçin Güncel Tedaviler	5
1.2.1.1.1. Kemoterapi Ve Radyoterapi	5
1.2.1.1.2. İmmunoterapi	6
1.3. Kanser Kök Hücre Teorisi	8
1.3.1. Glioblastoma Kanser Kök Hücreleri ve Özellikleri	9
1.3.1.1. CD133	10
1.3.1.2. Kanser Kök Hücre Belirteçleri	9
1.4.Glioblastoma Hücre Hatları	10
1.5.Tezin Amacı	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme Ve Solüsyonlar	13
2.1.1. Hücre Hatları Ve Hasta Dokularının Temini	13
2.1.2.Hücre Kültürü, Pasajlanması Ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler	13
2.1.3. Macs (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizi ile Hücre Saflaştırma	14
2.1.4. Rna İzolasyonu Ve Kantitasyonunda Kullanılan Malzemeler	15
2.1.5. Komplementer Dna(Cdna) Sentezinde Kullanılan Malzemeler	15
2.1.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative RT-PCR)	
Array Yönteminde Kullanılan Malzemeler	15
2.1.7.Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Antijenlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler	19
2.1.8. Konfokal Mikroskopu İçin Slayt Hazırlama	19
2.2. Yöntemler	19
2.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü Ve Primer Kültür	19
2.2.1.1. Primer Kültür	19
2.2.1.2.Hücrelerin Sıvı Azottan Çıkarılıp Çözdürülmesi	20
2.2.1.3.Hücrelerin Beslenmesi	20

2.2.1.4.Hücrelerin Pasajlanması	20
2.2.1.5.Hücrelerin Dondurulması	21
2.2.2. Glioblastoma Hücrelerinden Kök Hücrelerinin Ayrılması	21
2.2.2.1. Macs (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizi	21
2.2.3.Rna İzolasyonu	22
2.2.4. Rna Kantitasyonu	22
2.2.5. Komplementer Dna (Cdna) Sentezi	23
2.2.6. Rt ² Profiler Tm pcr Dizi(Array) Sistemi	23
2.2.7. Proteomiks Doğrulama Deneyleri- Akım Sitometri	25
2.2.8. Konfokal Mikrokobu İçin Slayt Hazırlama	25
2.2.9. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve İstatistik	26
3. BULGULAR	27
3.1. Glioblastoma Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüsü	27
3.2. Glioblastoma Hücre Hatlarından CD133+ Kök Hücre Ayrımı - MACS	27
3.3. Ayrılan CD133+ ve CD133- Glioblastoma Hücrelerinden RNA İzolasyonu	29
3.4. Real Time qPCR Array	29
3.4.1. Kanser Kök Hücre Paneli PCR Array Bulguları	30
3.4.2. Hücre Yüzey Belirteçleri Paneli PCR Array Bulguları	32
3.4.3 Sitokin Reseptör Paneli PCR Array Bulguları	34
3.7. Anlamlı Çıkan Genlerin Akım Sitometri ile Protein Seviyesinde Doğrulanması	36
3.7. Konfokal Görüntüleri	42
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
5.1. Öneriler	70
ÖZET	72
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85

ÖNSÖZ

Bu tez günümüzün en ölümcül tümörlerinden olan Glioblastoma multiforme'nin kanser kök hücrelerini araştırmaktadır. Glioblastoma kök hücrelerinin yüzey özellikleri ve GBM tedavisine yönelik yeni belirteçler araştırılmıştır.

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesinde sırasında yardımlarını ve değerli bilgilerini benden esirgemeyen ve hayatımın sonuna kadar desteklerini unutmayacağım sevgili hocam Prof.Dr.Asuman SUNGUROĞLU'na,

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

Tezimin her aşamasında yardımcı ve varlığı ile her zaman destek olan sevgili arkadaşım Şeyma ÖZKANCA'ya

Tez çalışmam sırasında yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen sevgili Doç. Dr. Dilara AKCORA YILDIZ'a

Tez çalışmam sırasında yardımları ile bana destek olan sevgili Esra AKGÜN'e

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

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

Sayın hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve tüm Tıbbi Biyoloji ailesine,

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgisiyle bana destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Antijen sunan hücre (Antigen Presenting Cell)
BMI	B hücre spesifik Moloney Mürin Lösemi Virüs Entegrasyon Bölgesi 1
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitel Mezenkimal Geçiş
ETBR	Etidium Bromür
FBS	Fötal Sığır Serumumu
GBH	Glioma Başlatıcı Hücre
GBM	Glioblastoma
GKH	Glioma Kök Hücre
Gy	Gray (radyasyon birimi)
KKH	Kanser Kök Hücre
L1CAM	L1 hücre adhezyon proteini (cell adhesion protein)
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
ND	Non defined /Belirsiz
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR)(polimerase chain reaction)
PSS	Periferik Sinir Sistemi
TBH	Tümör Başlatıcı Hücre
TMZ	Temozolomide
VEGF	Vasküler epidermal büyüme faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Nöroektodermal (nöral ve glial) hücrelerin gelişimini ve kanser tiplerini gösteren şema, (Yuan Zhu ve Parada 2002)	2
Şekil 1.2. Kanser genom atlasına göre gliomagenез ve alt grupları mezenkimal, klasik, pronöral ve GBM-O oluşumlarında görülen gen anomalileri, (Vigneswaran ve ark.2015)	5
Şekil 1.3. GBM hücrelerinin immün çevresi ile etkileşiminin şematik gösterimi,(Razavi ve ark.2016)	7
Şekil 1.4. Stokastik model ve kanser kök hücre modelinin şematik gösterimi (Girouard ve Murphy 2011)	8
Şekil 1.5. Kanser kök hücre yüzey belirteci olan CD133 proteininin yapısı, 5 transmembran bölgesi, hücre dışı amino ve hücre içi karboksil uçları gösterilmektedir.	9
Şekil 2.1. RT-qPCR array protokolü	24
Şekil 3.1. GBM hücre hatları inverted ışık mikroskobu görüntüsü; U87, U138,T98,U118 (100x)	27
Şekil 3.2. MACS metodu çalışma prensibi	28
Şekil 3.3. Kullanılan Miltenyi Biotec MACS Sistemi	29
Şekil 3.4. U118 hücre hattındaki CD133 (PE (496nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), kırmızı: CD133-yüzey proteini	42
Şekil 3.5. U118 hücre hattındaki CD24 (ALEXA Flour 488 (495nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: CD24- yüzey proteini	42
Şekil 3.6. U118 hücre hattındaki CD24 (ALEXA Flour 488 (495nm) konjuge-yeşil) ve CD133 (PE (496nm) konjuge-kırmızı) hücre yüzey ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: CSF1R1- yüzey proteini,kırmızı:CD133-yüzey proteini	43
Şekil 3.7. U118 hücre hattındaki CSF1R1 (ALEXA Flour 488 (495nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: CSF1R1- yüzey proteini	43
Şekil 3.8. U118 hücre hattındaki IL13RA2 (PE (496nm)konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüleri, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: IL13RA2-yüzey proteini	44
Şekil 3.9. U118 hücre hattındaki LTBR (PE (496nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüleri, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: LTBR-yüzey proteini	44
Şekil 3.10. U118 hücre hattındaki NOTCH1 (APC (633nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüleri, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: NOTCH1-yüzey proteini	45
Şekil 4.1. Gerçek zamanlı PZR analizi sonrasında anlamlı çıkan gen sayıları	67
Şekil 4.2. CD133 + GKH hücre yüzey belirteçleri, ligandları ve alt yolları	68

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması (Louis ve ark.2007)	3
Çizelge 1.2. Bazı kanser tiplerinde immunoterapötikler ve faz aşamaları,(Patel ve Pardoll 2015)	7
Çizelge 2.1. İnsan Sitokin/ Kemokin Reseptör Primer Kütüphanesi I	16
Çizelge 2.2. İnsan Primer Kanser Kök Hücre Kütüphanesi I	17
Çizelge 2.3. İnsan Primer Hücre Yüzey Belirteçleri Kütüphanesi I	18
Çizelge 2.4. cDNA Sentez Protokolü	23
Çizelge 2.5. PCR array çalışma protokolü	24
Çizelge 2.6. Akım Sitometri yönteminde kullanılan antikorlar	26
Çizelge 3.1. Kanser Kök Hücre paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	30
Çizelge 3.2. Kanser Kök Hücre paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	31
Çizelge 3.3. Kanser Kök Hücre paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	31
Çizelge 3.4. Hücre yüzey belirteçleri paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	32
Çizelge 3.5. Hücre yüzey belirteçleri paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	33
Çizelge 3.6. Hücre yüzey belirteçleri paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	33
Çizelge 3.7. Sitokin / Kemokin Reseptör paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	34
Çizelge 3.8. Sitokin / Kemokin Reseptör paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	35
Çizelge 3.9. Sitokin / Kemokin Reseptör paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler	35
Çizelge 3.10. Akım sitometri analizi yapılmak üzere seçilen genler, bu çizelgede ND olarak ifade edilen yerlerde hiç mRNA ifadesine rastlanmamıştır (ND=non defined/belirsiz)	36
Çizelge 3.11. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde belirlenen CD133 293C3 mAb yüzdeleri	37

Çizelge 3.12. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde RT-PCR sonucu belirlenen genlerin doğrulanması sonucu saptanan proteinleri bulunduran hücrelerin yüzdeleri gösteren grafikler	39
Çizelge 3.13. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde RT-PCR sonucu belirlenen genlerin CD133 proteini ile birlikte bulunduran hücrelerin yüzdeleri gösteren grafikler	40
Çizelge 3.14. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde RT-PCR sonucu belirlenen genlerin yalnız ve CD133 proteini ile birlikte yüzdeleri, bu çizelgede “–“ olarak ifade edilen yerlerdeki antikorlar aynı Florosan boyayı kullandığında beraber yüzdeleri FACS analizi ile saptanamamıştı (PE/PE)	41



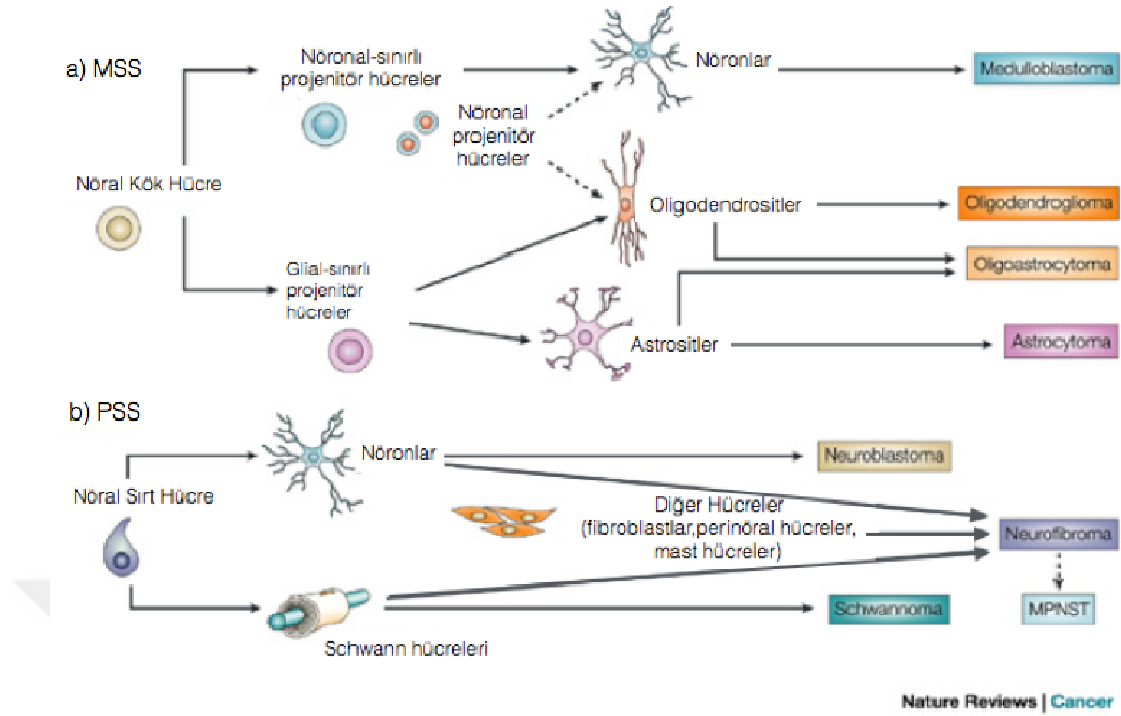
1.GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi Hücreleri

Merkezi sinir sisteminde(MSS), multipotent özellikli embriyonik nöral tüp kaynaklı kök hücreler, MSS için temel olan 3 hücre tipine farklılaşmaktadırlar. Bunlar nöronlar, oligodendrositler ve astrositlerdir. Ancak bu farklılaşma öncesinde şekil 1.1.de de görüldüğü gibi nöronal-sınırlı progenitör ve glial-sınırlı progenitör hücreler ara formda oluşur ve ardından diğer dallanma ile sonuç olarak bu 3 hücre tipi oluşmaktadır. (Şekil 1.1.a)

Periferik sinir sistemi (PNS) hücreleri ise nöral sırt hücreleri kaynaklı multipotent hücrelerin farklılaşması sonucu oluşan nöronlar ve glial (Schwann) hücreleri oluşturmaktadır. (Şekil 1.1.b)

Astrositomalar astrositlerin, oligodendromalar oligodendrositlerin, medulloblastomalar ise bazı nöronal atasal hücrelerin farklılaşması ile ortaya çıkmaktadırlar. Yine PNS hücrelerinden nöronların farklılaşmasından nöroblastoma, Schwann hücrelerinde Schwannoma ve Schwann, fibroblast veya mast hücrelerinin farklılaşmasından ise Nöurofibroma oluşmaktadır. (Şekil 1.1.a/b)



Şekil 1.1. Nöroektodermal (nöral ve glial) hücrelerin gelişimini ve kanser tiplerini gösteren şema, (Yuan Zhu ve Parada 2002)

1.2. MSS Tümörleri

Merkezi sinir sistemi tümörleri, 2007 WHO sınıflandırmasına göre nöroepitel doku tümörleri, kranial ve paraspinal sinir tümörleri, meninks tümörleri, sellar bölge tümörleri ve metastatik tümörleri olmak üzere sınıflandırılmıştır. (Louis ve ark.2007). Temel olarak ise diffüz glio ve embriyonel tümörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Diffüz tümörlere örnek astrositoma, oligodendroglioma ve glioblastoma, embriyonel tümörlere örnek olarak ise medullablastoma ve atipik teratoid rabdoid tümörler verilebilir (Louis ve ark.2014). Şekil 1.1. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre MSS tümörlerinin sınıflandırması ve evreleri izlenebilmektedir.

Çizelge 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması (Louis ve ark.2007)

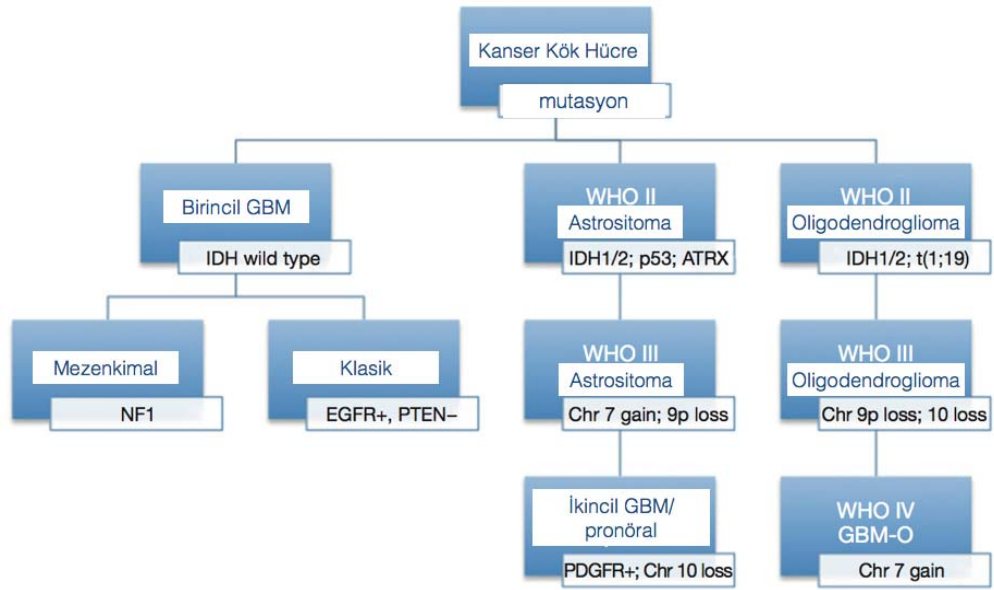
	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Piloicytic astrocytoma	•			
Pilomyxoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	
Ependymal tumours				
Subependymoma	•			
Myxopapillary ependymoma	•			
Ependymoma		•		
Anaplastic ependymoma			•	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	•			
Atypical choroid plexus papilloma		•		
Choroid plexus carcinoma			•	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	•			
Chordoid glioma of the third ventricle		•		
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours				
Gangliocytoma	•			
Ganglioglioma	•			
Anaplastic ganglioglioma			•	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	•			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	•			
Pineal tumours				
Pineocytoma	•			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		•	•	
Pineoblastoma				•
Papillary tumour of the pineal region		•	•	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				•
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				•
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				•
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	•			
Neurofibroma	•			
Perineurioma	•	•	•	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		•	•	•
Meningeal tumours				
Meningioma	•			
Atypical meningioma		•		
Anaplastic / malignant meningioma			•	
Haemangiopericytoma		•		
Anaplastic haemangiopericytoma			•	
Haemangioblastoma	•			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	•			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	•			
Pituicytoma	•			
Spindle cell oncocyoma of the adenohypophysis	•			

1.2.1. Glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) merkezi sinir sisteminin en sık rastlanan ve WHO'ya göre; nöroepitel doku tümörü olarak sınıflandırılan seviye IV tümördür (Louis ve ark.2007). Bilinen glial tümörlerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (Stopschinski ve ark.2013). Amerika Birleşik Devletlerini sayısal verilerine göre her yıl ortalama 10,000 yeni teşhis edilen GBM hastası tespit edilmektedir (Bayin 2014).

GBM hücreleri yüksek proliferasyon ve invazyon kapasitesine sahip olduklarından beyin tümörleri arasında en ölümcül ve malign olanıdır. Ortalama yaşam süresi 70 yaş altı hastalar için 14.6 aydır (Bayin 2014). Astrositomalar, çekirdek anomalileri, mitoz, vasküler endotelial proliferasyon ve nekrozlarının varlığına göre derecelendirilir. Bu 4 özellikten 3'ünün bulunması GBM olarak adlandırılması için yeterlidir. (Pointer ve ark.2014)

GBM tümörleri de kendi içinde birincil ve ikincil olarak ayrılmaktadır. Bu ayrım patolojik ve biyolojik farklılıklar göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bu ayrımın yapılmasındaki en önemli belirteç izositrat dehidrogenaz(IDH) geninde bir mutasyon olup olmamasıdır. Bu gen izositratın oksidatif dekarboksilasyonunda görev alır (Krell ve ark.2011). Öyle ki; birincil GBM' de IDH geninde çok az bir oranda mutasyon gözlenirken (<%5), ikincil GBM' de IDH geninin mutasyonu büyük oranda (>%80) gözlenmektedir. Birincil GBM hastalarının ortalama yaşam süresi ikincil GBM hastalarına göre çok daha kısadır. IDH geni dışında ve beraberinde birçok moleküler belirteç GBM türünü belirlemede kullanılabilir. Örneğin, IDH geninde mutasyon olmayan ikincil GBM'lerde TP53 geninde mutasyon bulunmaktadır ve bu hastaların ortalama yaşam süreleri çok daha kısadır. (Ohgaki ve Kleihues 2013) Şekil 1.2.'de ise 2014 yılında yayınlanmış olan Kanseri Genom Atlası (TCGA)'na göre gliomagenез sınıflandırması görülmektedir.



Şekil 1.2. Kanser genom atlasına göre gliomajenez ve alt grupları mezenkimal, klasik, pronöral ve GBM-O oluşumlarında görülen gen anomalileri (Vigneswaran ve ark.2015)

1.2.1.1.GBM İçin Güncel Tedaviler

1.2.1.1.1. Kemoterapi ve radyoterapi

Günümüzde GBM tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır. Radyoterapi olarak ameliyat sonrası 2Gy dozlarında toplamda 60Gy olmak üzere radyasyon verilmektedir. Kemoterapi ilacı olarak kullanılan Temozolamide (TMZ), kan beyin bariyerini geçebilen bir alkilleyici ajandır. TMZ, hücrede DNA hasarı oluşturarak hücreyi apoptoza götürmektedir. TMZ kullanılarak GBM hastalarının yaşam süresi %10.4, radyoterapi ile %26.5 uzadığı gözlenmiştir. Ancak GBM hastalarında tümör gelişimi kısa süre sonra tekrar görülmüştür. Dolayısıyla bu iki tedavi yöntemi de GBM hücrelerinin tamamını öldürmede başarılı değildir (Gilbert ve Ross 2013). Glioma hücrelerinin kimyasal ilaçlara ve radyoterapiye karşı direnci, glioma hücrelerinin arasında glioma kök hücrelerinin (GKH) varlığını doğrular niteliktedir. GKH'ler, sağlıklı kök hücrelere benzerlik göstermektedirler. GKH'ler de, sağlıklı kök hücreler gibi ilaçlara karşı direnç geliştirmede ABC taşıyıcılarını yüksek düzeyde ifade ederler ve aktif bir DNA tamir mekanizmaları vardır. Genel olarak GKH'nin özelliklerini sıralayacak olursak; kök hücre özelliği olan kendini

yenileme ve farklılaşma özelliklerinin yanı sıra; tümör başlatabilme, migrasyon ve in vivo olarak aktarıldığında orijinal tümörün fenokopisini oluşturabilme özellikleri de bulunmaktadır (Altaner 2008). Yapılan çalışmalar kullanılan terapilerde, GKH dışında kalan hücreler öldürülse de GKH'lerin yok edilemediğini göstermiştir (Cho ve ark.2013; Kemper ve ark.2010; Kase ve ark.2015). Bu sebeple GBM tedavilerinde GKH odaklı ve hedefli çalışmalar yapılmak zorundadır. Bunun için öncelikle GKH ayırt edici karakteristik özelliklerinin tanımlanması önem arz etmektedir.

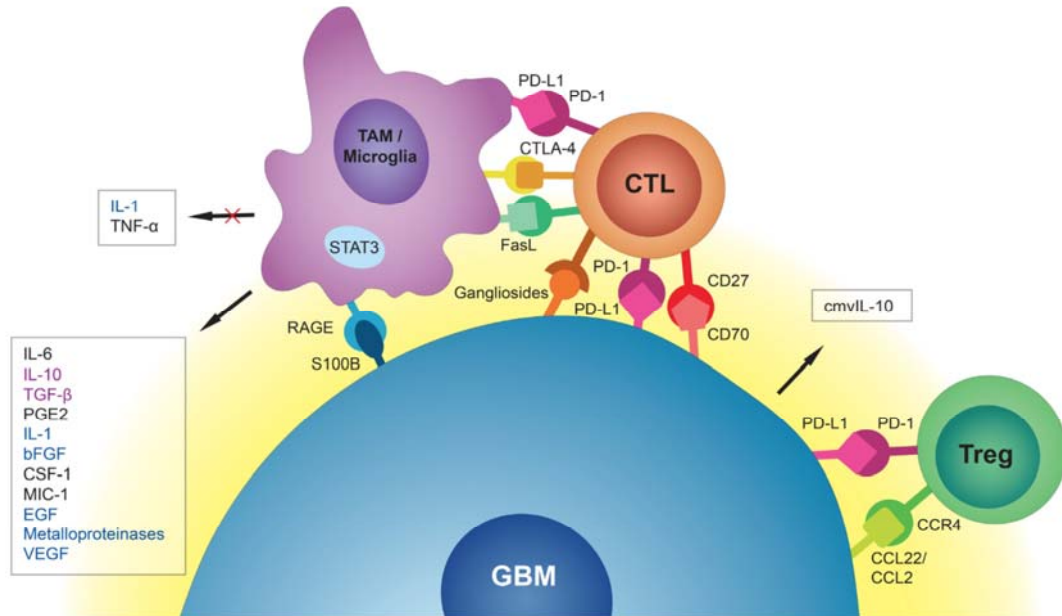
1.2.1.1.2. İmmunoterapi

İmmunoterapide temel olarak organizmanın bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı savaşması ve tümör gelişimini ve nüksünün baskılanıp engellenmesi hedeflenmektedir. GBM'de uygulanan immunoterapiler, kontrol noktası proteinlerini hedefleme, sitokin terapi ve dendritik hücre (DC) hedefli aşılama tedavileri olmak üzere 3 çeşittir. İmmunoterapinin kansere karşı kullanılması önceleri imkansız gibi düşünülürken, günümüzde melanoma gibi immunogenitesi yüksek kanser tiplerinde anti-kanser terapilerinden daha etkin olarak kullanılmaktadır. Ancak GBM'in immunogenitesi çok düşük olduğundan bu terapinin kullanılması için hedefleme tedavilerinin başarılı olması ve seçilen antijenin iyi bir hedef olması gerekmektedir. GBM'de yapılan immunoterapi çalışmaları, antijen hedeflenmesi olan DC aşılama üzerinde ilerlemektedir. Aşılamada hedef olarak EGFR seçilmiştir. Aynı zamanda, kontrol noktası proteinleri olan CTLA ve PD-1 hedefleme çalışmaları faz 2-3 aşamasındadır (Patel ve Pardoll 2015). Çizelge 1.2.'de bazı kanser tiplerinde uygulanmaya çalışılan immunoterapiler ve faz aşamaları yer almaktadır.

Çizelge 1.2.Bazı kanser tiplerinde immunoterapötikler ve faz aşamaları,(Patel ve Pardoll 2015)

Kanser tipi	Ajan	Sınıf	Klinik gelişmenin fazı
Melanoma	Ipilimumab	Anti-CTLA-4 Kontrol Noktası İnhibitörü	FDA onaylı
	Nivolumab	Anti-PD-1 Kontrol Noktası İnhibitörü	Faz III
	Pembrolizumab		FDA onaylı
	N/A	Adaptif Hücre Terapisi	Faz I-II klinik deneme
	NY-ESO-1, MAGE, Melan-A peptides	Peptit Aşısı	Faz I-II klinik deneme
	N/A	Otolog DC aşısı	Faz I-II klinik deneme
	N/A	tüm tümör hücresi aşısı	Faz I-II klinik deneme
NSCLC	EGFR peptide	Peptit aşısı	Faz III klinik deneme
	Belagenpumatucel	Allojenik gen bazlı aşı	Faz III klinik deneme
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4 Kontrol Noktası İnhibitörü	Faz III
	Nivolumab	Anti-PD-1 Kontrol Noktası İnhibitörü	Faz II
	DCVax-L®	DC aşısı	Faz III
Glioblastoma	CDX-110	PEPvIII-KLH Peptit Aşısı	Faz II-III
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4 Kontrol Noktası İnhibitörü	Faz II-III
	Nivolumab	Anti-PD-1 Kontrol Noktası İnhibitörü	Faz II-III

Razavi ve arkadaşlarının yaptığı derleme yayınında ise GBM hücrelerinin immün sistem içerisinde nasıl kamuflej sağlayıp var olabildiklerini göstermiş ve mikroçevrenin immunoterapiler ile birlikte mikroçevrenin de hedeflenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Hedefleme yapılması gereken GBM hücrelerinin mikroçevresi Şekil 1.3.'de şematik olarak yer almaktadır.

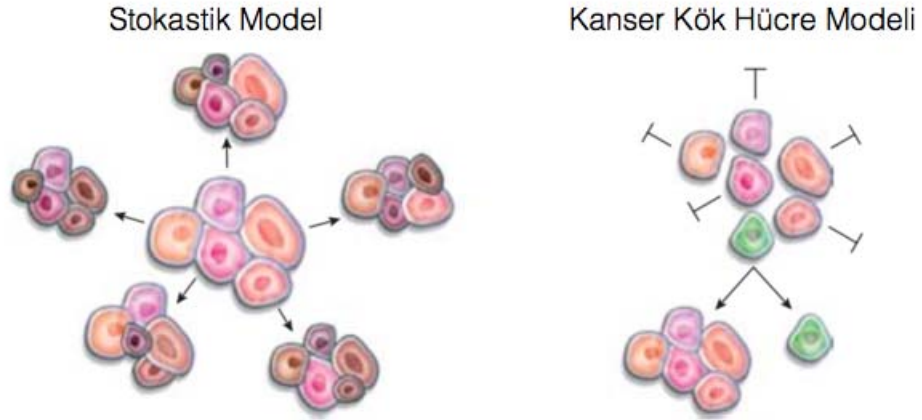


Şekil 1.3. GBM hücrelerinin immün çevresi ile etkileşiminin şematik gösterimi,(Razavi ve ark.2016)

1.3. Kanser Kök Hücre Teorisi

Tümör hücrelerinin çok küçük bir kısmı malin özellik taşımaktadırlar. İlk kez 1971 yılında Park tarafından yayınlanan makale ile kanser kök hücreler (KKH) tanımlanmış , 2002’de ise Ignatova glial KKH’i tanımlanmıştır. Singh ise CD133+ KKH popülasyonunu rapor etmiştir (Stopschinski ve ark.2013). Kanser kök hücreler, kök hücre özellikleri olan farklılaşma ve kendini yenileme özelliklerine ek olarak tümör başlatabilme özelliğine sahiptirler. Tümör nüksünden sorumlu olduğu düşünülen bu hücrelerin, terapötik olarak hedeflenmesi tümörün eliminasyonu için büyük önem taşımaktadır.

Bu hücreler önceleri Stokastik model ile tanımlanmıştır. Bu modelde her bir tümör hücresi tümör başlatabilme kapasitesine sahiptir. Bu modelin aksine kanser kök hücre modelinde, tümör kütlesi içerisinde yalnızca küçük bir alt popülasyonun tümör başlatabilme özelliği bulunmaktadır ve bu özellikteki hücrelerin eradikasyonu sağlanmazsa tümör nüksü görülecektir. Bu iki model şekil 1.4.’de özetlenmiştir.

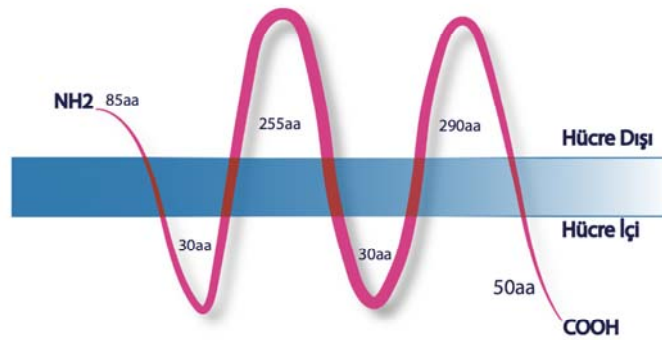


Şekil 1.4. Stokastik model ve kanser kök hücre modelinin şematik gösterimi (Girouard ve Murphy 2011)

1.3.1. Glioblastoma Kanseri Kök Hücreleri ve Özellikleri

1.3.1.1. CD133

Glioma, meme, akciğer kanserleri ve osteosarkom gibi diğer kanser türleri için önemli bir KKH belirteci kabul edilen prominin geninden sentezlenen CD133 son yıllarda özellikle GKH için hedeflenen bir yüzey belirteçidir (Kemper ve ark.2010). Transmembran bir glikoprotein olan CD133, hematopoietik kök hücreler gibi birçok progenitor hücrelerde de bulunan bir yüzey belirteçidir (Kase ve ark.2015). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CD133+ ve CD133- GBM hücrelere TMZ, Carboplatin, Taxol ve VP16 ilaçları verildikten sonra CD133+ hücrelerinin bu ilaçlara karşı çok daha dirençli olduğu görülmüştür. Ayrıca tümör nüksettiğinde GBM hücre hatlarında CD133+ GKH oranı ortalama olarak 4.6 kat yüksek bulunmuştur (Gentao Liu ve ark.2006). Bu sebeple GKH hedefleme tedavilerinde CD133+ hücrelerin anlaşılması ve hedeflenmesi için yeni biyobelirteçlerin keşfi önem taşımaktadır. Şekil 1.5.'de CD133 proteininin yapısal özellikleri özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Kanseri kök hücre yüzey belirteci olan CD133 proteininin yapısı, 5 transmembran bölgesi, hücre dışı amino ve hücre içi karboksil uçları gösterilmektedir.

1.3.1.2. Kanser Kök Hücre Belirteçleri

Kanser kök hücre modeline göre GBM kanser kök hücrelerinin yüzey belirteçlerini belirlemek amacı ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. 2008 de Bao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nöral hücre oluşumundan görev alan ve DNA kontrol noktası ekspresyonlarını düzenleyen L1CAM in CD133+ olan hücrelerde çok yüksek ekspres edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu protein hedeflendiğinde, CD133+ hücrelerinin sayısından dramatik bir azalma görülmüştür (Bao ve ark.2008). Nöral hücrelerin kök hücre özelliklerini düzenlemede görev alan Bmi1'in, susturma deneyleri ile Bmi1'in CD133+ hücrelerinin kendini yenileme mekanizmalarına katkıda bulunduğu, CD133- hücrelerinin ise proliferasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Son olarak Bmi1 ekspresyonlarının GBM tipini belirlemede ve kök hücre yapısını göstermede bir belirteç olduğu tespit edilmiştir(Abdouh ve ark.2009). Bir diğer çalışmada ise CD133 proteinini bulundurmeyen hücreler arasında hala tümör oluşturabilme kapasitesine sahip tipler bulunmuş ve bu hücrelerin bazılarında integrin $\alpha 6$ 'nın ekspresyonunun çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle embriyonik, hematopoietik ve nöral kök hücrelerde gözlenmektedir. Beyinde integrin $\alpha 6$ ve lamininler nöral kök hücre büyümesini düzenlerler. Dolayısıyla kanser kök hücrenin devamlılığı için kritik bir öneme sahiptirler. İntegrin $\alpha 6$, CD31, CD133, nestin ve Olig2 ile koekspres olmuştur. Bu da onların endotel değil kök hücre olduğunun kanıtıdır. Böylece İntegrin- $\alpha 6$ Glioblastoma kanser kök hücre yüzey belirteci olmaya aday bir proteindir(Lathia ve ark.2010). Bu ve bunun gibi birçok yüzey proteinleri immunoterapi gibi hedefleme tedavilerinde hedeflenmek üzere Glioblastoma kanser kök hücre profili ile ilişkilendirilmeye çalışılmaktadır.

1.4.Glioblastoma Hücre Hatları

Mikro dizin analizi, glioblastoma hücre hatlarında ilaç direnci, moleküler mekanizma ve kök hücre konsantrasyonları arasında belirgin farklar bulunması nedeni ile U87, U138, U118 ve T98G hücre hatlarından CD133+ ve CD133- hücreler izole edilerek yapılacaktır. Berthois ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu 4 hücre hatlarının TMZ duyarlılıkları araştırılmış ve IC50 değerleri verilmiştir. Buna göre

T98 ve U138 hücre hatları TMZ'den daha az etkilenirken ($IC_{50}>300$), U118 ($IC_{50}=220$) ve U87 ($IC_{50}=50$) hücre hatları ise nispeten daha fazla etkilenmektedirler. TMZ duyarlılıkları farklı olan hücre hatlarını çalışmak tedavinin uygulanabilirliği açısından önem arz etmektedir. GBM hücre hatlarının ilaç direncinde farklılıkların bulunmasının altında yatan sebepler araştırıldığında bazı moleküler mekanizmaların aktivite değişikliklerin bulunduğu tespit edilmiştir. Bunların başında DNA tamir mekanizmasında etken olan O6-metilguanin metiltransferaz (MGMT) geninin yüksek ifade olması gelmektedir. Bu gen fazla ifade olduğunda ilacın oluşturduğu hasar daha kısa sürede onarıldığından bu genin fazla ifade olduğu hücrelerde ilaç direnci daha yüksek olmaktadır. Bu 4 hücre hattının MGMT seviyelerine bakıldığında TMZ dirençleri ile tutarlı olarak, U87 hücre hattı en düşük seviyede iken , U118, T98G ve U138 yüksek seviyelerde görülmüştür (Berthois ve ark. ,2014). Bu da MGMT'nin ilaç direncinde anahtar bir gen olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu 4 hücre hattının glial fibril asidik protein (GFAP) seviyeleri farklılık göstermektedir. Bu protein glial hücrelerin iskeletine katılmaktadır ve glial tümörlerde artan seviye tümörlerinde ifadesi azalmaktadır. U87 ve U138'in GFAP seviyeleri, U118 ve T98 ile karşılaştırıldığında nispeten daha fazla seviyeye sahiptirler. Ancak kontrol hücre hattına kıyasla bu 4 hücre hattının da GFAP seviyeleri oldukça azdır (Restrepo ve ark.2011). Dolayısıyla GFAP protein seviyesi de 4 hücre hattının farklılıklarını belirlemede etken bir faktördür. Bir diğer önemli protein ise TP53 geninden sentezlenen ve tümör baskılayıcı protein olarak görev yapan p53 proteindir. Bu protein birçok tümör hücresinde mutasyona uğradığından düşük seviyelerde gözlenmektedir. U87 hücre hattında bu proteinin seviyesi yaban tipinin olarak kabul edilmektedir. Diğer GBM hücre hatları olan T98, U118 ve U138 hücre hatlarında bu protein mutanttır (Sauv ve ark.2009). Görüldüğü gibi bu 4 hücre hattı birçok moleküler mekanizmada farklılık göstermektedir. Uygulanacak tedavinin klinik uygulamalarda başarılı olabilmesi için farklı tümör hücrelerinde ortak olan bir hedefin belirlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple moleküler olarak farklılıkları bulunan GBM hücre hatlarının kullanılması tezin uygulanabilirliği açısından önem arz etmektedir.

1.5.TEZİN AMACI

GBM tedavisinde kök hücreleri hedefleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak yeni biyobelirteçler tanımlamak amacı ile, GKH oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan CD133 dışındaki hücre yüzey belirteçlerinin araştırıldığı geniş bir çalışma bulunmamaktadır. Özellikle CD133+ hücrelerde toplu bir PZR dizin analizinin yapılması, GBM tedavisinde yönlendirici olabilecek önemli bir adımdır. Bu tezin hedefi, CD133+ GKH'lerinde, kök hücre karakterinin oluşmasında etken olan hücre yüzey belirteçlerini PCR array analizi ile saptanması ve fonksiyonel çalışmalar yapmak tezin hedefidir.

Tezin primer amacı, GBM CD133+ kök hücrelerinin yüzey özelliklerini moleküler düzeyde belirleyerek, GBM'de yeni tanısal parametreler tanımlamak ve GBM hücrelerinin elimine edilebilmesi ve hedefleme tedavilerine kullanılabilecek yeni biyobelirteçleri belirlenmesidir. GBM kök hücreler için etkin olan genlerin saptanması ve bu genlerin GBM tedavisinde ilerideki araştırmalara kaynaklık etmesi tezin temelini oluşturmaktadır.

Hedeflerimiz:

- GBM kök hücrelerinin yüzey özelliklerini belirlemek
- Tedavide hedef oluşturacak moleküler belirteçleri saptamak
- Kanser başlatıcı hücrelerin yüzey profilini tanımlamak

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme Ve Solüsyonlar

2.1.1. Hücre Hatları ve Hasta Dokularının Temini

Tezde kullanılan tüm hücre hatları (U87, U138, U118 ve T98G) ve ekipmanlar Tübitak 114S189 numaralı projeden temin edilmiştir. GBM tümör ve non tümoral hasta dokuların lobektomi yöntemi ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tavsiye edilen standart yöntemlere dayanılarak hasta dokuları temin edilmiştir. Kontrol dokuları olarak, GBM tanısı almamış Alzheimer hastlarından patolojik amaçlı alınan dokular kullanılmıştır.

2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler

- PBS: Hücre yıkamalarında kullanıldı (Lonza 10X Kat. No: 17-517Q)
- Tripsin: Hücreleri adherent formundan kaldırma amaçlı kullanıldı (Capricorn 10X-Kat No:TRY-1B10)
- Besiyerleri aşağıdaki hücre hatlarına göre kullanılan besiyerleri;
 - o U118 ve T98– RPMI 1640, %1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS
 - o U138: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml) 1,5gr düşük glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %20 FBS
 - o U87: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml) 1,5gr düşük glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS
- Primer Hücre besi yeri:

- o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml)
4,5gr yüksek glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS Fötal Sığır Serum (FBS) 500ml
- o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml)
4,5gr yüksek glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %40 FBS
- %10 Dimetilsülfoksit (DMSO) solüsyonu: Applichem marka, No:67-68-5+; hücreleri dondurmak için kullanıldı.
- Etil alkol-%75: Riedel-de Haen No.64-17-5. Sterilizasyon için kullanıldı
- 15ml ve 50ml'lik falkon tüpler: Sarstedt No. 62.554.502, 62.547.254
- 25 cm²lik flask
- 75 cm²lik flask
- Hücre dondurmada kullanılmak üzere Kriyotüpler

Kullanılan Cihazlar:

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

2.1.3. MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizi ile Hücre Saflaştırma

- Miltenyi Biotech MACS hücre ayırma düzeneği
- MACS Tampon Çözeltilisi: 50ml fosfat-tuz tamponu (PBS), 0,25gr sığır serum albümin(BSA) ve 0,5M EDTA

- CD133 AC133 mAb (Miltenyi Biotech)
- CD133 293C3 mAB (Miltenyi Biotech)
- Manyetik taneler (Miltenyi Biotech)
- MACS kolonları (Miltenyi Biotech)
- Ependorf tüpler 1.5ml, 2ml

2.1.4. RNA izolasyonu ve Kantitasyonunda Kullanılan Malzemeler

- İscript RNA izolasyon kiti (Bio-Rad)
- Santrifüj
- Spektrofotometre cihazı ve Gen 5 programı: kantitasyonda kullanıldı

2.1.5. Komplementer DNA(cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler

- Bio-Rad cDNA sentez kiti
 - o RNA İscript Supermix (BioRad)
 - o Enzyme (BioRad)
 - o Steril dH₂O
- 200ul PCR tüpleri
- Corbett Research PCR cihazı

2.1.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative RT-PCR) Array Yönteminde Kullanılan Malzemeler

- Sitokin/ Kemokin Reseptör RT-PCR Array (Bio-Rad) (Çizelge 2.1.)
- Kanser Kök Hücre RT-PCR Array (Bio-Rad) (Çizelge 2.2.)
- Hücre Yüzey Belirteçleri RT-PCR Array (Bio-Rad) (Çizelge 2.3)
- Cihaz: Roche Applied Science LightCycler-R-480 Real Time PCR Sistemi
- 172-5274 SsoAdvancedUniversal SYBR Green Bio-Rad

Çizelge 2.1. İnsan Sitokin/ Kemokin Reseptör Primer Kütüphanesi I

Yer	Sembol	Açık İsim	Yer	Sembol	Açık İsim
A1	CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	E1	IL17RB	interleukin 17 receptor B
A2	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	E2	IL17RC	interleukin 17 receptor C
A3	CCR3	chemokine (C-C motif) receptor 3	E3	IL17RD	interleukin 17 receptor D
A4	CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4	E4	IL17RE	interleukin 17 receptor E
A5	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5	E5	IL18R1	interleukin 18 receptor 1
A6	CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6	E6	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein
A7	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	E7	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha
A8	CCR8	chemokine (C-C motif) receptor 8	E8	IL20RB	interleukin 20 receptor beta
A9	CCR9	chemokine (C-C motif) receptor 9	E9	IL21R	interleukin 21 receptor
A10	CCR10	chemokine (C-C motif) receptor 10	E10	IL22RA1	interleukin 22 receptor, alpha 1
A11	CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	E11	IL22RA2	interleukin 22 receptor, alpha 2
A12	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	E12	IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha
B1	CXCR1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	F1	IL28RA	interleukin 28 receptor, alpha
B2	CXCR2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2	F2	IL31RA	interleukin 31 receptor, alpha
B3	CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	F3	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
B4	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	F4	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
B5	CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	F5	LTBR	lymphotoxin beta receptor
B6	CXCR6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	F6	NGFR	nerve growth factor receptor
B7	CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	F7	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
B8	XCR1	chemokine (C motif) receptor 1	F8	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
B9	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	F9	TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
B10	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	F10	TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy
B11	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	F11	TNFRSF7	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
B12	IL1RAPL2	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	F12	TNFRSF8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
C1	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	G1	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
C2	IL1RL2	interleukin 1 receptor-like 2	G2	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
C3	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	G3	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
C4	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	G4	TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
C5	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	G5	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d
C6	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma	G6	TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a
C7	IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha	G7	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
C8	IL4R	interleukin 4 receptor	G8	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
C9	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha	G9	TNFRSF13B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B
C10	IL6R	interleukin 6 receptor	G10	TNFRSF13C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C
C11	IL6ST	interleukin 6 signal transducer	G11	TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14
C12	IL7R	interleukin 7 receptor	G12	TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
D1	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha	H1	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
D2	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	H2	TNFRSF19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
D3	IL9R	interleukin 9 receptor	H3	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
D4	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	H4	TNFRSF25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
D5	IL10RB	interleukin 10 receptor, beta	H5	ACTB	Actin, beta
D6	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	H6	B2M	Beta-2-microglobulin
D7	IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1	H7	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D8	IL12RB2	interleukin 12 receptor, beta 2	H8	GUSB	Glucuronidase, beta
D9	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D10	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	H10	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
D11	IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
D12	IL17RA	interleukin 17 receptor A	H12	RPL13A	Ribosomal protein L13a

Çizelge 2.2. İnsan Primer Kanser Kök Hücre Kütüphanesi I

Yer	Sembol	Açık İsim	Yer	Sembol	Açık İsim
A01	ABCB5	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	E01	LIN28B	Lin-28 homolog B (C. elegans)
A02	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	E02	MAML1	Mastermind-like 1 (Drosophila)
A03	ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule	E03	MERTK	C-mer proto-oncogene tyrosine kinase
A04	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	E04	MS4A1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
A05	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	E05	MUC1	Mucin 1, cell surface associated
A06	ATXN1	Ataxin 1	E06	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
A07	AXL	AXL receptor tyrosine kinase	E07	MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
A08	BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene	E08	NANOG	Nanog homeobox
A09	BMP7	Bone morphogenetic protein 7	E09	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
A10	CD24	CD24 molecule	E10	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
A11	CD34	CD34 molecule	E11	NOTCH1	Notch 1
A12	CD38	CD38 molecule	E12	NOTCH2	Notch 2
B01	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	F01	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
B02	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	F02	PLAT	Plasminogen activator, tissue
B03	DACH1	Dachshund homolog 1 (Drosophila)	F03	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor
B04	DDR1	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	F04	POU5F1	POU class 5 homeobox 1
B05	DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	F05	PROM1	Prominin 1
B06	DLL1	Delta-like 1 (Drosophila)	F06	PTCH1	Patched 1
B07	DLL4	Delta-like 4 (Drosophila)	F07	PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
B08	DNMT1	DNA (cytosine-5-)methyltransferase 1	F08	SAV1	Salvador homolog 1 (Drosophila)
B09	EGF	Epidermal growth factor	F09	SIRT1	Sirtuin 1
B10	ENG	Endoglin	F10	SMO	Smoothened, frizzled family receptor
B11	EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule	F11	SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
B12	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	F12	SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
C01	ETFA	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	G01	STAT3	Signal transducer ve activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
C02	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	G02	TAZ	Tafazzin
C03	FLOT2	Flotillin 2	G03	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1
C04	FOXA2	Forkhead box A2	G04	THY1	Thy-1 cell surface antigen
C05	FOXP1	Forkhead box P1	G05	TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
C06	FZD7	Frizzled family receptor 7	G06	TWIST2	Twist homolog 2 (Drosophila)
C07	GATA3	GATA binding protein 3	G07	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)
C08	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	G08	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1
C09	HDAC1	Histone deacetylase 1	G09	WWC1	WW ve C2 domain containing 1
C10	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	G10	YAP1	Yes-associated protein 1
C11	IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	G11	ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
C12	IL8	Interleukin 8	G12	ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
D01	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	H01	ACTB	Actin, beta
D02	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	H02	B2M	Beta-2-microglobulin
D03	ITGA6	Integrin, alpha 6	H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D04	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D05	JAG1	Jagged 1	H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
D06	JAK2	Janus kinase 2	H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
D07	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	H07	RTC	Reverse Transcription Control
D08	KITLG	KIT ligand	H08	RTC	Reverse Transcription Control
D09	KLF17	Kruppel-like factor 17	H09	RTC	Reverse Transcription Control
D10	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	H10	PPC	Positive PCR Control
D11	LATS1	LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)	H11	PPC	Positive PCR Control
D12	LIN28A	Lin-28 homolog A (C. elegans)	H12	PPC	Positive PCR Control

Çizelge 2.3. İnsan Primer Hücre Yüzey Belirteçleri Kütüphanesi I

Yer	Sembol	Açık İsim	Yer	Sembol	Açık İsim
A01	ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule	E01	FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
A02	C5AR1	Complement component 5a receptor 1	E02	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
A03	CD160	CD160 molecule	E03	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)
A04	CD163	CD163 molecule	E04	HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A
A05	CD19	CD19 molecule	E05	HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha
A06	CD1A	CD1a molecule	E06	ICAM2	Intercellular adhesion molecule 2
A07	CD1C	CD1c molecule	E07	IL12RB1	Interleukin 12 receptor, beta 1
A08	CD1D	CD1d molecule	E08	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II
A09	CD2	CD2 molecule	E09	IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha
A10	CD209	CD209 molecule	E10	ITGA1	Integrin, alpha 1
A11	CD22	CD22 molecule	E11	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
A12	CD24	CD24 molecule	E12	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
B01	CD244	CD244 molecule, natural killer cell receptor 2B4	F01	KLRB1	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
B02	CD247	CD247 molecule	F02	KLRC1	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
B03	CD28	CD28 molecule	F03	KLRD1	Killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
B04	CD37	CD37 molecule	F04	KRT18	Keratin 18
B05	CD38	CD38 molecule	F05	KRT5	Keratin 5
B06	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	F06	KRT8	Keratin 8
B07	CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)	F07	MS4A1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
B08	CD4	CD4 molecule	F08	MYH10	Myosin, heavy chain 10, non-muscle
B09	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	F09	MYH9	Myosin, heavy chain 9, non-muscle
B10	CD40LG	CD40 ligand	F10	MYOCD	Myocardin
B11	CD5	CD5 molecule	F11	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
B12	CD6	CD6 molecule	F12	NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
C01	CD63	CD63 molecule	G01	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
C02	CD69	CD69 molecule	G02	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
C03	CD7	CD7 molecule	G03	RETN	Resistin
C04	CD70	CD70 molecule	G04	S100A8	S100 calcium binding protein A8
C05	CD72	CD72 molecule	G05	SELP	Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
C06	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	G06	ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1
C07	CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	G07	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
C08	CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta	G08	TNFRSF4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
C09	CD80	CD80 molecule	G09	TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
C10	CD83	CD83 molecule	G10	TPSAB1	Tryptase alpha/beta 1
C11	CD86	CD86 molecule	G11	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
C12	CD8A	CD8a molecule	G12	VWF	Von Willebrand factor
D01	CD8B	CD8b molecule	H01	ACTB	Actin, beta
D02	CD96	CD96 molecule	H02	B2M	Beta-2-microglobulin
D03	CHST10	Carbohydrate sulfotransferase 10	H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D04	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D05	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
D06	CR2	Complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
D07	CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	H07	RTC	Reverse Transcription Control
D08	CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	H08	RTC	Reverse Transcription Control
D09	DPP4	Dipeptidyl-peptidase 4	H09	RTC	Reverse Transcription Control
D10	ENG	Endoglin	H10	PPC	Positive PCR Control
D11	EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule	H11	PPC	Positive PCR Control
D12	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	H12	PPC	Positive PCR Control

2.1.7.Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Antijenlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler

- Tavsiye Medium : 98ml PBS, 2ml FBS, 300ul 0,5M EDTA
- İlgili Akım Sitometrisi Antikorları (Konjuge FITC, PE,Alexa Flour 488 ya da APC) (Çizelge 2.6.)
- Soğutmalı Santrifüj
- Ependorf Tüpler 1.5ml, 2ml
- Cihaz: Accuri C6 akım sitometre

2.1.8. Konfokal mikroskobu için slayt hazırlama

- Konfokal Mikroskobu (Zeiss LSM 800)
- FBS
- Boyaması yapılacak genin florosan boya işaretli antikoru
- Chamber slayt
- Mikroskop slaytları (lam, lamel)

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü ve Primer Kültür

2.2.1.1. Primer Kültür

- Alınan dokular kültür ortamına alınarak küçük parçalara ayrıldıktan sonra %10 FBS bulunan DMEM de 3 kere yıkama yapıldı.
- Ardından ise %40 FBS bulunan DMEM yüksek glukoz besiyerinde 25cm²lik flasklara ekildi.
- Hücreler dokulardan çıkmaya başladıktan sonra %10 FBS'li DMEM ile beslemelere devam edilmiştir.

2.2.1.2.Hücrelerin Sıvı Azottan Çıkartılıp Çözdürülmesi

- Öncesinde Dondurulup Sıvı Azot tankında saklanan hücre hatları çıkartılarak tekrar kültür edilmiştir. Bunun için kriyo-tüpler içerisindeki hücreler tamamen çözülmeden hızlı bir şekilde 8ml besiyerinin içine alınarak homojen bir şekilde çözüldü.
- 1100rpm de 5dk santrifüj yapıldı ve süpernatanda bulunan DMSO'dan kurtarıldı.
- Pellet oluşturan hücreler tekrar 8ml uygun besi-yerinde çözüldü
- İlk pasajında 25cm²lik, sonraki pasajlarda ise 75 cm²lik flasklara ekildi.
- CO₂ inkübatöründe 37°C de büyümeye bırakıldı

2.2.1.3.Hücrelerin Beslenmesi

- İnkübatörden alınan flasklardaki eskiyen besi yeri Pastör pipetlerle çekildi.
- 3ml PBS ile yıkama yapıldı.
- 25 cm²lik flasklar için 3ml, 75 cm²lik flasklar için 7-8ml taze besiyeri eklenerek etüve kaldırıldı.

2.2.1.4.Hücrelerin Pasajlanması

- Kültürde bulunan flasklar %70 oranında hücre ile kaplandığında pasajlama işlemine alındı
- Öncelikle flask üzerinde bulunan eski besi yeri çekilerek 3ml PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı
- Ardından 25cm²lik flasklar için 0.5ml, 75 cm²lik flasklar için 1ml Trypsin eklendi ve flasklar 37°C inkübatörde 5 dk inkübe edildi.

- Etüvden alınan flasklardaki Tripsin enziminin etkisini durdurmak için aynı miktarda besi yeri eklendi.
- Hücreler bir falkon tüpe alında ve 1100rpm de 5dk santrifüj yapıldı
- Hücrelerin bir kısmı dondurulmak üzere ayrıldı kalan kısmı ise pasajı devam edecek flasklara yeniden ekilerek etüve kaldırıldı.

2.2.1.5.Hücrelerin Dondurulması

- Kültürü devam eden hücreler olası deney tekrarlama veya sonraki projelerde kullanılmak üzere her pasajda dondurularak kaldırıldı.
- Bunun için tripsinize edilip pellet haline getirilen hücreler dondurma solüsyonu eklenerek cryotüplere alındı.
 - o Dondurma solüsyonu: %10 DMSO ve %90 besi yeri (+4)
- Dondurma işlemi aşamalı olarak soğutarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için cryo tüpler -20°C de 1 saat bekletildikten sonra, -80°C de 24 saat bekletilmiştir. Ardından ise bu tüpler azot tankına kaldırılmıştır.

2.2.2. Glioblastoma Hücrelerinden Kök Hücrelerinin Ayrılması

2.2.2.1. MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizi

- Hücre hatları ve primer hücreler yeterli sayı ve büyüklüğe ulaştıktan sonra CD133+ ve CD133- hücreler manyetik hücre ayırma tekniği olan MACS yöntemi ile ayrıldı. Dört hücre hattının ve 10 hastanın primer hücreleri bu yöntemle CD133 pozitif ve negatif olarak ayrıldı. Her bir hücre hattından ve primer hücrelerden her birinden bir çift olacak şekilde toplamda 28 MACS işlemi yapıldı.

- Ayırma yöntemi CD133 hücre izolasyon kiti ile yapıldı (Miltenyi Biotech).
- Hücreler 50ml fosfat-tuz tamponu (PBS), 0,25gr sığır serum albümin(BSA) ve 0,5M EDTA ile hazırlanan MACS tamponu ile yıkandıktan sonra, CD133 AC133 mAb (Miltenyi Biotech) ile 10dk karanlıkta ve +4C°'de inkübe edildi.
- Ardından tekrar MACS tamponu ile yıkandıktan sonra, bu kez manyetik taneler (Miltenyi Biotech) ile hücreler 15dk karanlıkta ve +4C°'de inkübe edildi.
- Hücreler MACS kolonlarından geçirildiğinde pozitif olan hücreler bağlı kalırken, negatif hücreler kolonlardan aktarılır.
- Sonrasında kolonda kalan CD133+ hücreler, manyetik alandan ayrılarak MACS tamponu ile kolondan serbestleştirmeleri sağlandı.
- Ayrılan hücreler RNA izolasyonu veya protein izolasyonu yapılmak üzere pellet haline getirilerek -80°C ye kaldırıldı.

2.2.3.RNA İzolasyonu

- İscript RNA izolasyon kiti ile 100.000 hücre için 100ul iScript solüsyonu olacak şekilde koyuldu.
- 15000rcf'de 2dk sentrifüj ile izolasyon yapıldı.
- Süpernatanda bulunan RNA'lar temiz bir ependorf tüpe alınarak -80°C'de saklandı.

2.2.4. RNA Kantitasyonu

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

2.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Seçilen CD133- ve CD133+ hücre popülasyonlarından izole edilen RNA rneklerinden Bio-Rad cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi sonrasında, PCR array dizin analizinin kit protokolleri doğrultusunda uygulama ve analiz yapıldı. cDNA sentezi aşağıdaki miktarlar ile yapıldı.

Çizelge 2.4. cDNA Sentez Protokolü

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

2.2.6. RT² ProfilerTM PCR Dizi(Array) Sistemi

PCR Array 96 kuyucuklu, ilişkili genlerin sıralandığı ve i kontrollere de bulunduğu optimize gerçek zamanlı PCR deneyleri setidir. Bu yöntemin gerçekleştirilmesi için hazır olan cDNA ile hazırlanan master mix karıştırılır ve her kuyucuğa eşit şekilde dağıtılır. Bu tezde 3 panel çalışılmıştır. Her bir panel 88 gen ve 8 referans genlerden oluşmaktadır. Array protokolü şekil 2.1.'de şematik olarak görülmektedir.



Şekil 2.1. RT-qPCR array protokolü

Çalışma protokolü çizelge 2.5.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. PCR array çalışma protokolü

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

2.2.7. Proteomiks Doğrulama Deneyleri- Akım Sitometri

- Hücre kültüründe büyütülen hücreler tripsine edildi. Tripsine edilen hücreler 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst kısım atıldı ve hücrelerin üzerine 3 ml PBS eklenerek tekrar 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst süpernatant kısım atıldı ve tekrar aynı şekilde PBS'ile yıkama işlemi yapıldı.
- İkinci yıkama sonunda hücrelerin üzerine 2 ml bloklama amaçlı %3 BSA içeren tampon solüsyonu ilave edildi ve 20 dk bloklama yapıldı. 1500rpm'de 5dk santrifüj ile solüsyon uzaklaştırıldı.
- Sonra 100ul tampon solüsyonu içerisinde 1/10 oranında konjuge primer antikor eklendi. Karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. (Çizelge 2.6)
- İnkübasyon sonunda 1500 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve üzerine PBS eklenerek 3 kez yıkama yapıldı.
- 10000 hücre sayılarak hücre yüzey belirteçlerinin protein oranları ACCURİ C6 akım sitometre cihazında ölçüldü ve analiz edildi.

2.2.8. Konfokal mikrokobu için slayt hazırlama

- Chamber slaytlara her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde hücre ekilip; konfluent olduğunda boyamaya alındı.
- Boyamaya alınan hücreler üzerindeki eski besiyeri çekilerek 1ml PBS ile yıkama yapıldı.
- Öncelikle hücreler 1ml FBS ile 30dk karanlıkta inkübasyon yapıldı.
- 100µl FBS ile 10µl primer antikor slayt üzerine eklendi ve 15dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
- Slayt üzerine 1ml PBS eklenerek yıkandı
- 100µl FBS ile 10µl sekonder antikor slayt üzerine eklendi ve 15dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.

- Slayt üzerine 1ml PBS eklenerek yıkandı
- 150µl FBS ile 150µl DAPI slayt üzerine eklendi ve 5 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
- Slayt üzerine 1ml PBS eklenerek yıkandı
- Slayt üzerine lamel kapatılarak görüntüleme yapıldı.

Çizge 2.6. Akım Sitometri yönteminde kullanılan antikörler

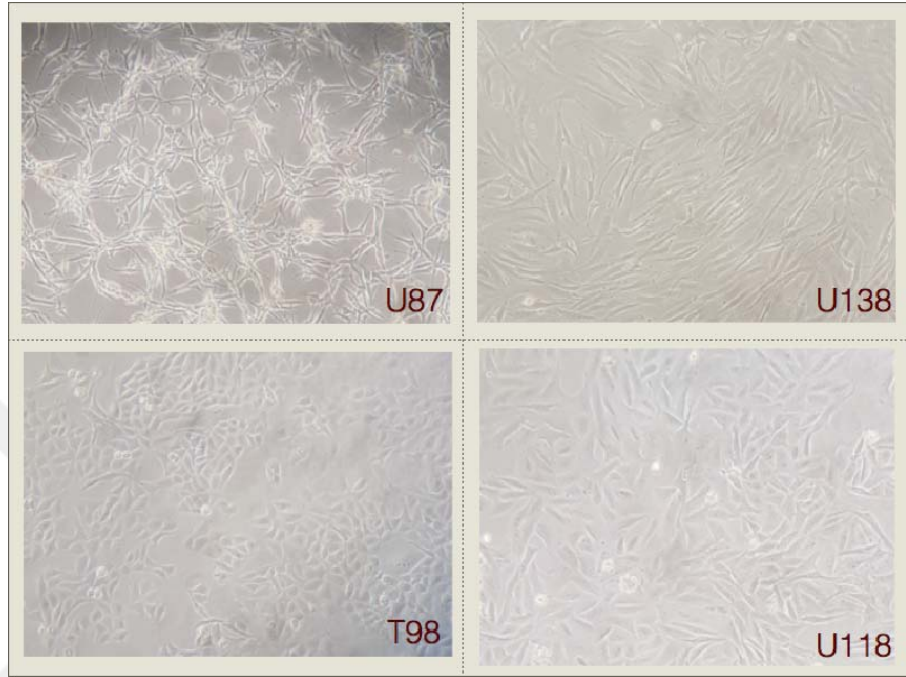
Antikör	Dilüsyon Oranı	Konjuge Fluorokrom	Firma	Katalog NO
PLAUR (CD87)	1/10	PE (496nm)	Biolegend	336906
LTBR	1/10	PE (496nm)	Biolegend	322008
CXCR3 (CD183)	1/10	Alexa Fluor® 488 (495nm)	Biolegend	353710
CSF1R1 (CD115)	1/10	Alexa Fluor® 488 (495nm)	Biolegend	347312
CD40L (CD154)	1/10	FITC (494nm)	Biolegend	310804
CD38	1/10	FITC (494nm)	Biolegend-	303505
CD24	1/10	Alexa Fluor® 488 (495nm)	Biolegend	311108
CD28	1/10	FITC (494nm)	Biolegend	302906
IL13RA2 (CD213α2)	1/10	PE (496nm)	Biolegend	360306
NOTCH	1/10	APC (633nm)	Biolegend	352108
TIE2 (CD202B/TEK)	1/10	Alexa Fluor® 488 (495nm)	Biolegend	334208
CD44	1/10	FITC (494nm)	Biolegend-	338803
VCAM (CD106)	1/10	PE (496nm)	Biolegend	305805
CD133	1/10	PE(496nm)	Miltenyi	130098826

2.2.9. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistik

RT-PCR sonucunda hesaplanan kat artışları istatistiksel TTest analizi ile 1'e karşı normalize edildi. Sonuçlar ortalama +/- standard sapma olarak özetlendi. Toplanan verilerde öncelikle CD133 negatif hücrelerinin mRNA artış/azalışları CD133 pozitiflere kıyaslandı. Ardın bu iki grup kontrol mRNA'ya oranlanarak CD133- ve CD133+ hücreler için ayrı ayrı istatistiksel anlamlı genler seçildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p < 0.05$ alındı.

3. BULGULAR

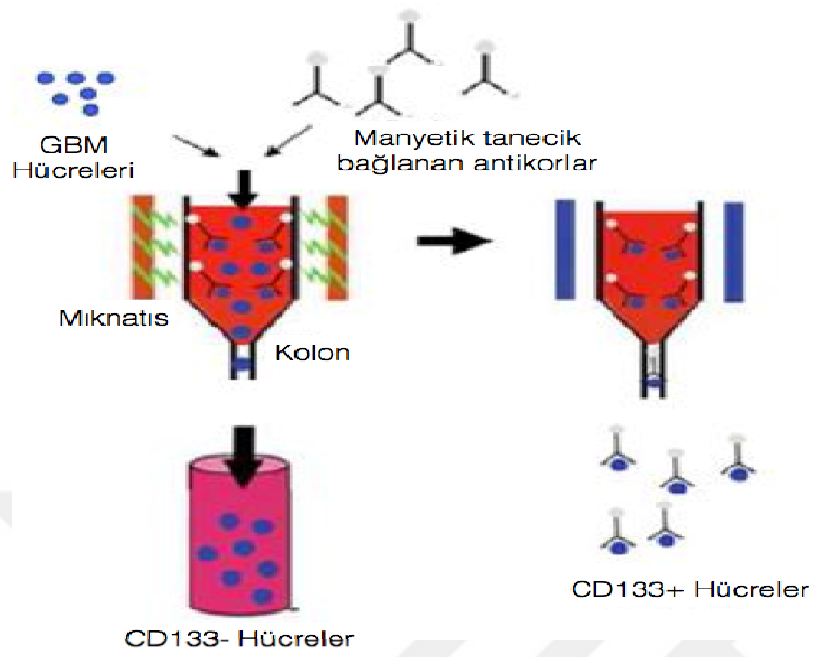
3.1. Glioblastoma Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüsü



Şekil 3.1. GBM hücre hatları inverted ışık mikroskobu görüntüsü; U87, U138,T98,U118 (100x)

3.2. Glioblastoma Hücre Hatlarından CD133+ Kök Hücre Ayrımı - MACS

MACS metodu ile hücre ayırma yöntemi, manyetik güç kullanılarak manyetik boncuklara bağlanan antikörün bağlandığı hücrelerin (antikör + hücreler) tutulması ve bağlanmayan hücrelerin (antikör - hücreler) ayrıştırılması temeline dayanır. Öncelikle hedeflenen antikör olan CD133 antikörü verildikten sonra bu antikora bağlanmak üzere işaretlenmiş manyetik tanecikler verilir ve böylece bu tanecikler aracılı antikörün bağlandığı hücreler ayrıştırılır. Bu yöntem kullanılarak hücreler ayrıştırılmış ve bu hücrelerden RNA izolasyon protokolüne alınmıştır. Kullanılan sistem ve çalışma prensibi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. 10 GBM hastasından alınan ve kültüre edilen primer kültür hücrelerinden ve 4 GBM hücre hatlarının hücrelerinden MACS metodu ile CD133+ kanser kök hücreleri ayrılmış ve CD133+ ve CD133- olarak işaretlenerek ileriki deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. MACS metodu çalışma prensibi



Şekil 3.3. Kullanılan Miltenyi Biotec MACS Sistemi

3.3. Ayrılan CD133+ ve CD133- Glioblastoma Hücrelerinden RNA İzolasyonu

BioRad iscript metodu ile MACS sonrası ayrıştırılan CD133+ ve CD133- hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu metot yeni ve güvenilirliği yüksek bir RNA izolasyon metodudur. Ardından ise Gen5 programı kullanılarak kantitasyon yapılmış ve 1000ng olacak şekilde cDNA protokolü uygulanmıştır.

3.4. Real Time qPCR Array

PCR Array, gerçek zamanlı PCR cihazı olan Roche marka real time cihazı ile gerçekleştirilmiştir. yapılan istatistikte CD133+ hücrelerini CD133- hücrelerinin mRNA profilleri karşılaştırılmış istatistiksel; anlamlı genler pozitiflerde negatiflere göre artış gösteren olarak listelenmiştir. Ayrıca, kontrol dokudan yapılan RNA

izolasyonu neticesinde hazırlanan cDNAlar ile yapılan array sonuçları ile ayrı bir istatistik yapılmış ve hem CD133 pozitif hem CD133 negatif hücrelerin array sonuçları ile anlamlı istatistiksel sonuçlar sunulmuştur. Böylelikle kontrole göre CD133 pozitif ve CD133 negatif hücrelerin özellikleri bu 3 panelde bulunan genler açısından yapılmıştır.

Her panel 88 gen ve 8 referans genden oluşmaktadır. Gen ifade oranları hesaplanırken cihaz tarafından hesaplanan Cp (crossing point) değeri kullanılarak kat artışları hesaplanmıştır. Bu hesaplama yapılırken aşağıdaki formül kullanılmıştır. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları log2 tabanına çevrilmiştir (R: Oran, E: Ekspresyon, CP: Kesişme Noktası) (Pfaffl 2001).

$$R = \frac{(E_{hedef})^{\Delta CP_{Hedef(Kontrol-örnek)}}}{(E_{Referans})^{\Delta CP_{Referans(Kontrol-örnek)}}$$

3.4.1. Kanser Kök Hücre Paneli PCR Array Bulguları

Çizelge 3.1. Kanser Kök Hücre paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

		CD133 POZİTİF	CD133 NEGATİF
GEN İSMİ	Hasta Sayısı	KAT ARTIŞI	KAT ARTIŞI
AXL	10	89,58	139,93
BMI1	10	62,23	112,21
CHEK1	10	536,71	489,93
CD44	10	60,75	54,75
DACH1	10	70,88	46,12
DDR1	10	8,23	4,18
ERBB2	10	29,84	18,69
ETFA	10	119,74	130,50
FOXP1	10	84,27	101,69
FZD7	10	6,63	4,15
GSK3B	10	187,40	130,48
HDAC1	10	315,57	316,83

Çizelge 3.1.Devam

IKBKB	10	39,88	20,02
ITGA4	10	6,46	3,98
ITGA6	10	26,51	22,72
ITGB1	10	447,85	364,76
JAG1	10	985,35	545,85
JAK2	10	34,19	25,43
KITLG	10	14,63	6,84
PLAUR	10	1131,45	779,83
PTPRC	10	0,27	0,034
SMO	10	85,73	24,44
SOX2	10	0,02	0,012
TAZ	10	134,20	115,19
TWIST1	10	0,23	0,013
WEE1	10	4,99	3,85
WWC1	10	0,31	0,06
YAP1	10	3,79	3,74
ZEB2	10	6,61	3,97

Çizelge 3.2. Kanser Kök Hücre paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

CD133 POZİTİF		
GEN İSMİ	Hasta Sayısı	KAT ARTIŞI
CD24	10	15,72
CD38	7	6,15
ITGA2	10	4,51
MAML1	10	2,20
NFKB1	10	4,79
NOTCH1	10	81,13
NOTCH2	10	4,28

Çizelge 3.3. Kanser Kök Hücre paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

CD133 NEGATİF		
GEN İSMİ	Hasta Sayısı	KAT ARTIŞI
ABCB5	10	0,55
ATM	10	7,53

Çizelge 3.3.Devam

ATXN1	10	2,16
BMP7	9	0,34
FGFR2	10	38,72
FLOT2	10	10,86
IL8	8	0,02
KLF17	10	0,06
LIN28A	10	0,11
LIN28B	9	0,23
MYCN	10	0,17
NANOG	9	0,03
PLAT	10	0,18
POU5F1	9	0,10
STAT3	10	8,57

3.4.2. Hücre Yüzey Belirteçleri Paneli PCR Array Bulguları

Çizelge 3.4. Hücre yüzey belirteçleri paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

	CD133 POZİTİF KAT ARTIŞI	CD133 NEGATİF KAT ARTIŞI
C5AR1	0,22	0,08
CD163	4922,13	5056,06
CD40LG	17,69	0,09
CD5	0,41	0,02
CD63	429,56	456,51
CD79A	0,32	0,02
CD83	8,77	8,37
CD86	0,38	0,04
CD8B	0,19	0,01
COL1A1	173,79	85,57
FAS	20,54	6,52
HLA-A	0,13	0,02
HLA-DRA	0,07	0,06
ICAM2	0,41	0,07
ITGA1	44,59	28,28

Çizelge 3.4. Devam

ITGA2	6,97	3,32
ITGA3	1615,98	1275,18
KLRC1	0,33	0,01
KRT8	0,07	0,02
MYH9	40198,96	28823,64
NT5E	2,86	3,82
RETN	0,30	0,07
TEK	50,07	7,52
TNFRSF8	0,06	0,02

Çizelge 3.5. Hücre yüzey belirteçleri paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

	CD133 POZİTİF KAT ARTIŞI
CD209	0,11
CD24	17,79
CD28	5,06
CD8A	0,31
CSF1R	7,24
MYH10	93,97
VCAM1	157,24

Çizelge 3.6. Hücre yüzey belirteçleri paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

	CD133 NEGATİF KAT ARTIŞI
C5AR1	0,08
CD163	5056,06
CD40LG	0,09
CD5	0,02
CD63	456,51
CD79A	0,01
CD83	8,37
CD86	0,04
CD8B	0,02

Çizelge 3.6.Devam

COL1A1	85,57
FAS	6,52
HLA-A	0,01
HLA-DRA	0,07
ICAM2	0,07
ITGA1	28,28
ITGA2	3,33
ITGA3	1275,18
KLRC1	0,01
KRT8	0,02
MYH9	28823,64
NT5E	3,82
RETN	0,07
TEK	7,52
TNFRSF8	0,02

3.4.3 Sitokin Reseptör Paneli PCR Array Bulguları

Çizelge 3.7. Sitokin / Kemokin Reseptör paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

	CD133 POZİTİF	CD133 NEGATİF
GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	KAT ARTIŞI
CCR6	0,39	0,15
CX3CR1	0,20	0,14
CXCR3	116,88	151,21
CXCR6	0,29	0,15
XCR1	0,05	0,04
IL1R1	0,19	0,06
IL1RL2	1244,54	544,67
IL4R	315,11	46,92
IL6ST	296,12	267,83
IL7R	22,01	17,18
IL21R	6,25	1,55
FAS	16,67	1,51
NGFR	138,23	113,57

Çizelge 3.7.Devam

TNFRSF10A	0,47	0,07
TNFRSF10C	0,23	0,06
TNFRSF13B	0,29	0,28
TNFRSF18	0,01	0,004
TNFRSF21	8,29	5,77

Çizelge 3.8. Sitokin / Kemokin Reseptör paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

CD133 POZITIF	
GEN	KAT ARTIŞ
IL1RN	9,75
IL12RB2	7,17
IL17RB	4,52
LTBR	3,67
TNFRSF1B	11,86
IL13RA2	5,53

Çizelge 3.9. Sitokin / Kemokin Reseptör paneli normal beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerinde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler

CD133 NEGATIF	
GEN	KAT ARTIŞ
CCR5	0,52
CXCR5	0,14
IL2RA	0,30
IL17RD	0,38
IL22RA2	0,11
TNFRSF10B	0,15
TNFRSF13C	27,28
TNFRSF19	13,59
TNFRSF25	8645,68

3.7. Anlamalı Çıkan Genlerin Akım Sitometri ile Protein Seviyesinde Doğrulanması

Çalışılan RT PCR mikrodizin analizleri sonucunda istatistiksel anlamalı çıkan ve kök hücre karakterizasyonunda önem arz edebileceği literatür taraması sonucu düşünülen genler seçilmiş olup, akım sitometri analizi ile proteomiks doğrulamaları yapılmıştır. Gen seçimleri yapılırken çoğunlukla CD133+ hücrelerde bulunup;CD133- hücrelerde ekspresyonu bulunmayanlar seçilerek kanser kök hücrelerini hedefleme tedavilerine öncü olunması hedeflenmiştir. Ancak beraberinde her iki tipte de yüksek olanlar da seçilerek GBM tedavilerine de ışık tutulmak istenmiştir. Çizelge 3.10.'da bu tezde çıktı olarak belirlenen ve doğrulama deneyleri yapılan genler ve CD133+ ve CD133- hücrelerdeki RT-PCR sonucu hesaplanan kat artışları özetlenmiştir.

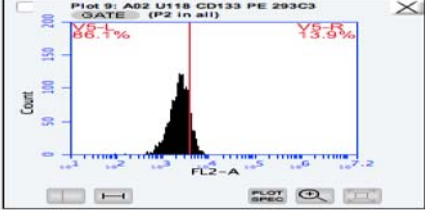
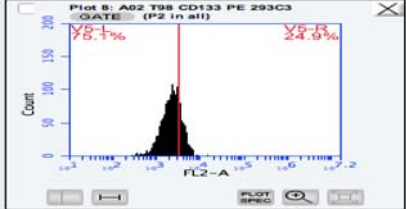
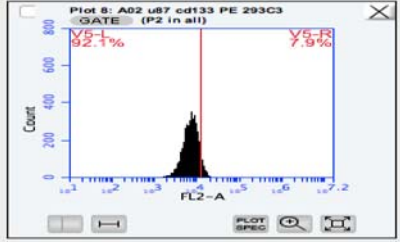
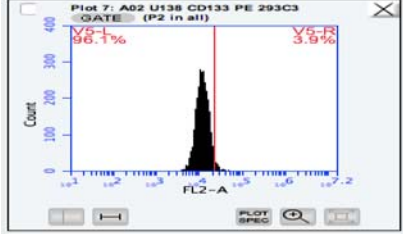
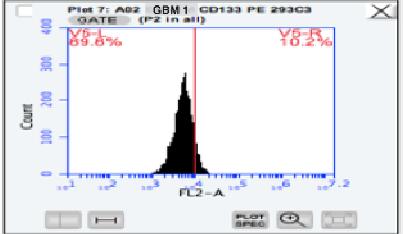
Çizelge 3.10. Akım sitometri analizi yapılmak üzere seçilen genler, bu çizelgede ND olarak ifade edilen yerlerde hiç mRNA ifadesine rastlanmamıştır (ND=non defined/belirsiz)

Genler	CD133+ Kat Artışı	CD133- Kat Artışı
CD24	15.7(17.7)	ND
CD38	6.15	ND
CSF1R1	7.24	ND
CD28	5.06	ND
IL13RA2	5.53	ND
VCAM1	157.24	ND
LTBR	3.67	ND
NOTCH1	81.13	ND
TIE2	50.07	7.25
PLAUR	1131.4	779.8
CXCR3	116.8	151.2
CD44	60.75	54.7

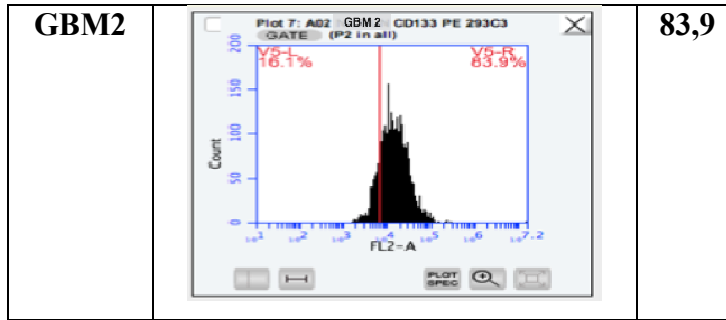
Akım sitometri analizi kanser kök hücre ayrımları yapılmadan aynı popülasyonda boyanmamış, sadece CD133 ile boyanmış, sadece hedef antikor ile boyanmış, her iki

antikorla boyanmış ve boyanmamış olarak 4 grup incelenmiştir. İncelenen antikorları bulunduran hücre popülasyonlarının oranı boyama yapılmamış (unstain) gruba kıyaslanarak belirlenmiştir.

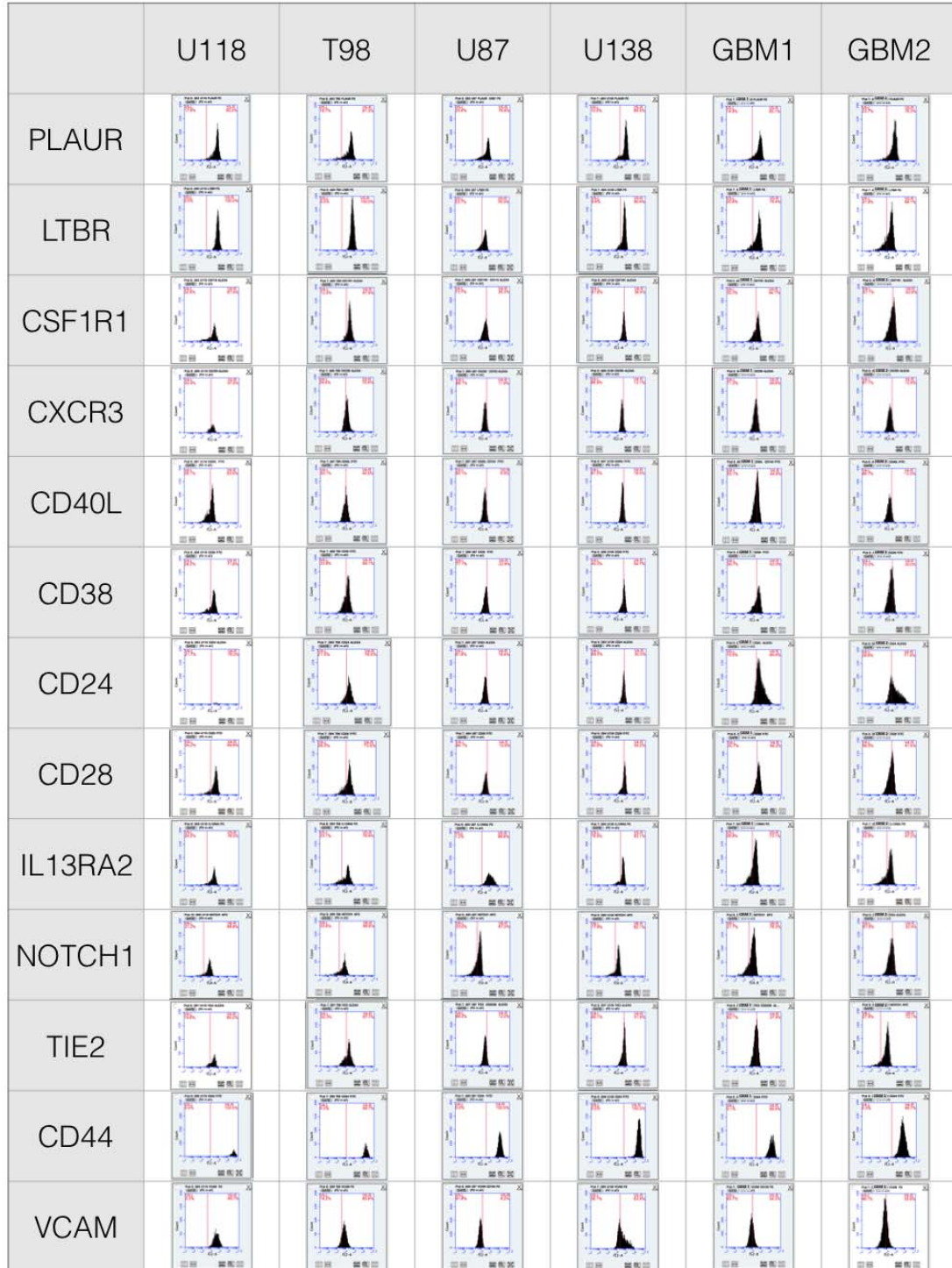
Çizelge 3.11. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde belirlenen CD133 293C3 mAb yüzdeleri

Hücre	Akım Sitometri Şekil	Yüzde
U118		13,9
T98		24,9
U87		7,9
U138		3,9
GBM1		10,2

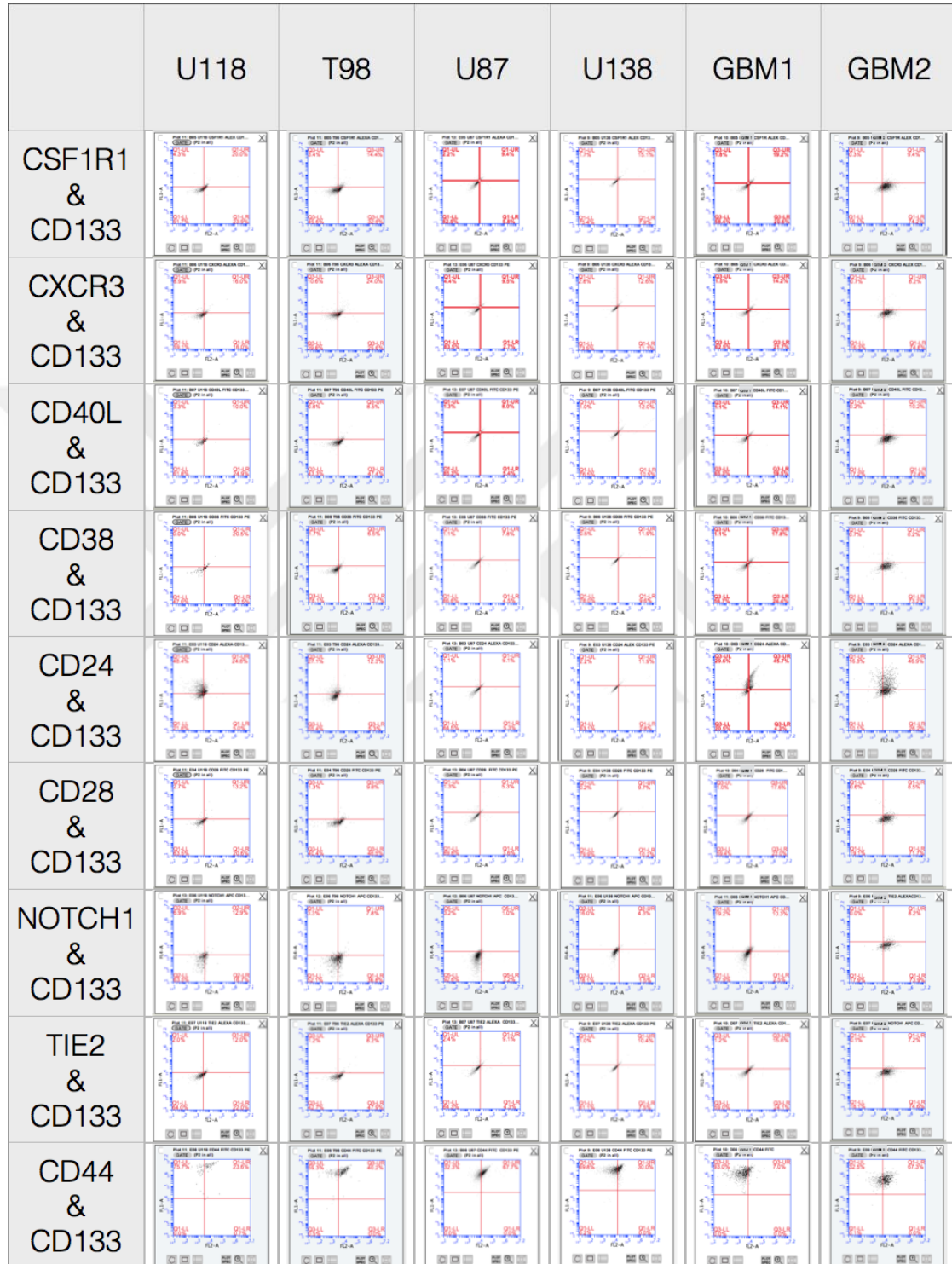
Çizelge 3.11 Devam



Çizelge 3.12. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde RT-PCR sonucu belirlenen genlerin doğrulanması sonucu saptanan proteinleri bulunduran hücrelerin yüzdelarını gösteren grafikler



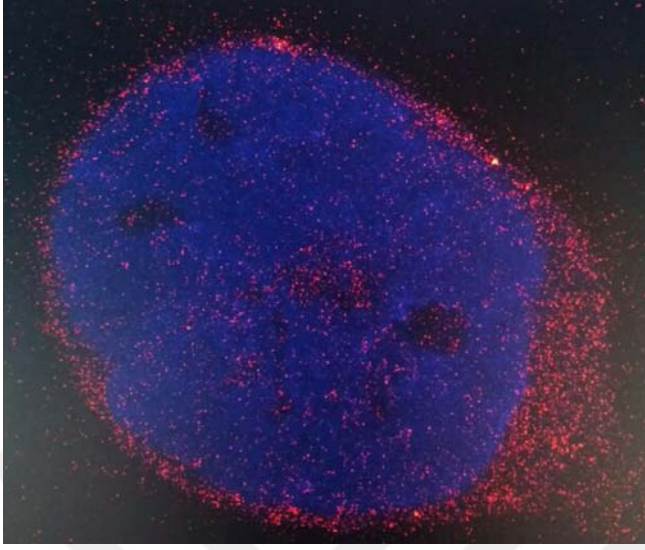
Çizelge 3.13. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde RT-PCR sonucu belirlenen genlerin CD133 proteini ile birlikte bulunduran hücrelerin yüzdelere gösteren grafikler



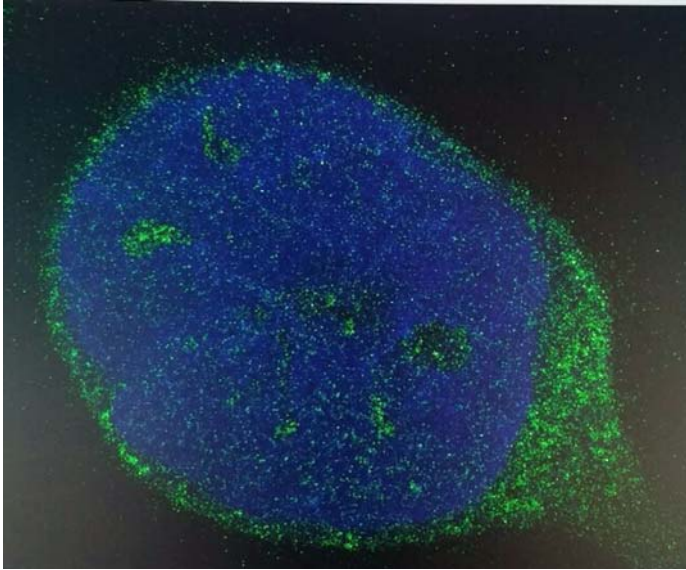
Çizelge 3.14. Akım sitometri sonucu U118, T98, U87 ve U138 hücre hatları ve GBM 1 ve GBM 2 olarak adlandırılan 2 GBM hastasının primer hücrelerinde RT-PCR sonucu belirlenen genlerin yalnız ve CD133 proteini ile birlikte yüzdeleri, bu çizelgede “-“ olarak ifade edilen yerlerdeki antikorlar aynı Florosan boyayı kullandığında beraber yüzdeleri FACS analizi ile saptanamamıştı (PE/PE)

	U118		T98		U87		U138		GBM1		GBM2	
CD133	13,9		24,9		7,9		3,9		10,2		83,9	
	Ab	Ab + CD133	Ab	Ab + CD133	Ab	Ab + CD133	Ab	Ab + CD133	Ab	Ab + CD133	Ab	Ab + CD133
PLAUR	82,2	-	81,3	-	76,6	-	89,5	-	85,1	-	79,3	-
LTBR	100	-	100	-	76,3	-	90,4	-	79,4	-	68,1	-
CSF1R1	67,4	20	87,6	14,4	26,3	9,4	38,4	15,1	64,7	19,2	42,9	9,4
CXCR3	67,6	16	70,6	24	11,9	9,5	13,1	12,6	28,8	14,2	12,9	8,2
CD40L	63,9	10	44,9	8,5	9,9	8	18,5	12	44,9	14,1	13,3	10,2
CD38	71,6	20,5	66,1	6,5	22,9	7,8	54,7	11,9	63,3	17,8	30	8,2
CD24	78,3	24,8	78,5	12,3	18,4	9,1	30,4	11,9	84,4	45,7	71,4	46,9
CD28	69,8	13,2	73,5	9,8	15,9	5,3	59,2	9,7	69,3	17,6	41,5	8,5
IL13RA2	76	-	76,9	-	98,8	-	83,1	-	73,1	-	67,2	-
NOTCH1	68,8	12,9	66,6	7,8	67	1	82,1	4,3	78,3	10,3	32,4	8,2
TIE2	80,2	12	67,7	8,2	12	9,1	51,9	10,4	37,9	15,8	72,1	7,2
CD44	100	23,6	99,7	40,2	100	67,7	100	30	99,9	7	99,7	67,3
VCAM1	99,7	-	85,8	-	8,2	-	63,9	-	34,3	-	33,9	-

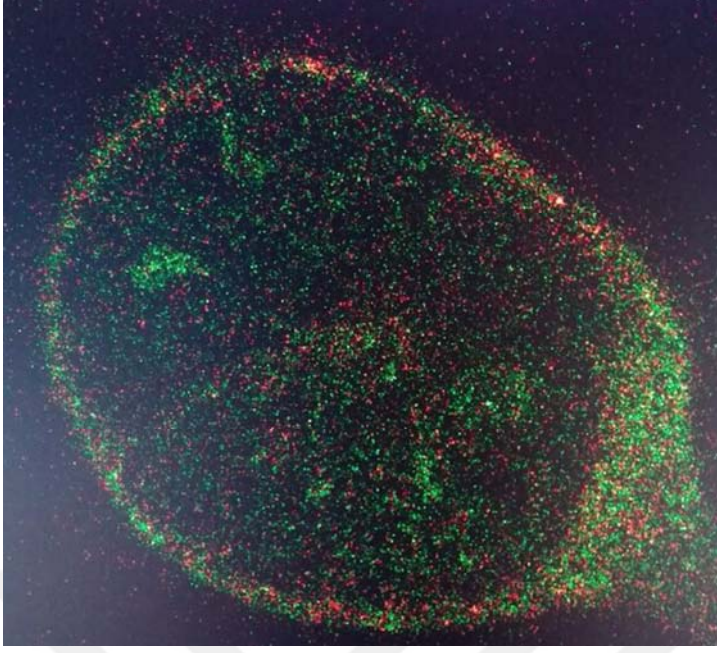
3.7. Konfokal Görüntüleri



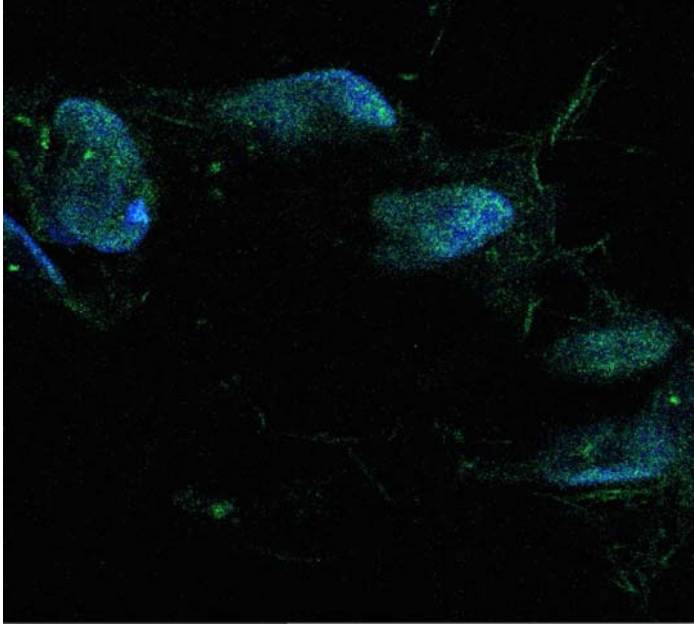
Şekil 3.4. U118 hücre hattındaki CD133 (PE (496nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), kırmızı: CD133- yüzey proteini



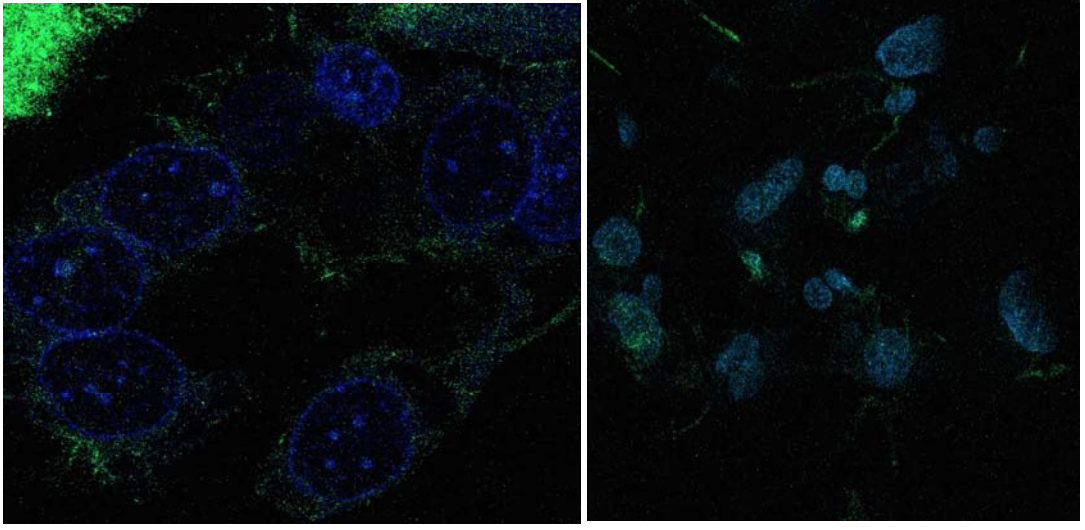
Şekil 3.5. U118 hücre hattındaki CD24 (ALEXA Fluor 488 (495nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: CD24- yüzey proteini



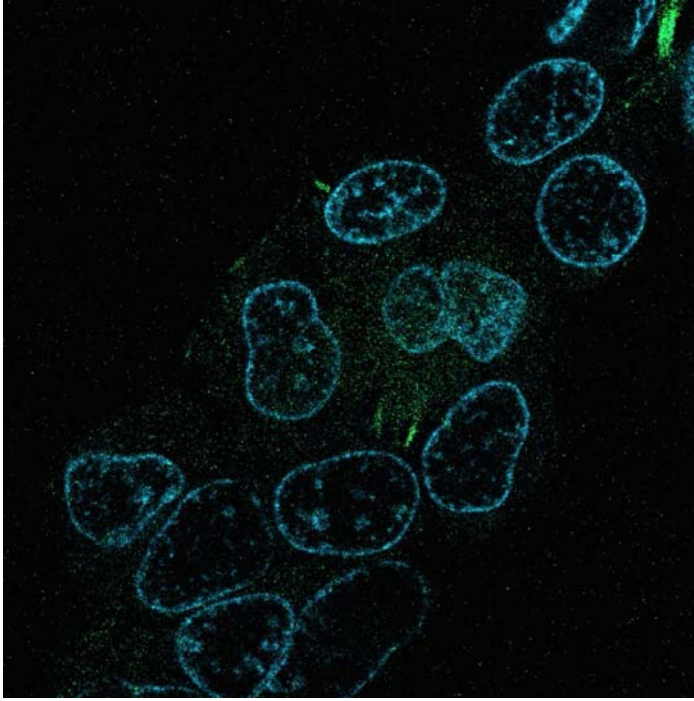
Şekil 3.6. U118 hücre hattındaki CD24 (ALEXA Flour 488 (495nm) konjuge-yeşil) ve CD133 (PE (496nm) konjuge-kırmızı) hücre yüzey ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: CSF1R1- yüzey proteini, kırmızı: CD133- yüzey proteini



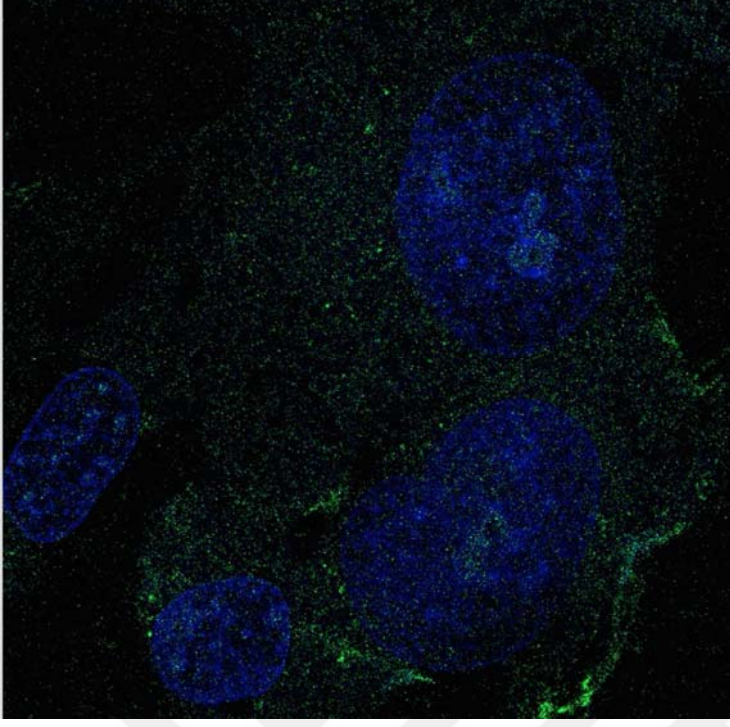
Şekil 3.7. U118 hücre hattındaki CSF1R1 (ALEXA Flour 488 (495nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüsü, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: CSF1R1- yüzey proteini



Şekil 3.8. U118 hücre hattındaki IL13RA2 (PE (496nm)konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüleri, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: IL13RA2- yüzey proteini



Şekil 3.9. U118 hücre hattındaki LTBR (PE (496nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüleri, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: LTBR- yüzey proteini



Şekil 3.10. U118 hücre hattındaki NOTCH1 (APC (633nm) konjuge) ifadesinin konfokal mikroskop görüntüleri, mavi: DAPI (çekirdek boyası), yeşil: NOTCH1- yüzey proteini

4. TARTIŞMA

GBM tedavilerinde antikorlar gibi bağışıklık sistemini uyarıcı ajanlar önem kazanmakta ve bunların terapilerde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bunun sebebi, immunoterapinin lokal olarak doğrudan tümör hücrelerini hedeflemesidir. Antikorların immunoterapötik olarak kullanımı, hedef hücre yüzeyindeki biyobelirteçlere bağlanmaları ve böylelikle organizma immunitesini uyarmalarını baz almaktadır. Ek olarak, antikorlar hücresel yolların baskılanması ve yüzeyel reseptör bloklanmalarında kullanılmaktadır. İmmunoterapi birçok kanser tipinde çalışmakta ve hali hazırda terapi olarak uygulanmaktadır. GBM’de benzer şekilde çalışmaların sayısı giderek artmakta, özellikle antikor tedavilerinde sadece tümör eradikasyonu değil, aynı zamanda tümör nüksünün engellenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi önem arz etmektedir.

İmmunoterapi günümüzde birçok kanser türünde klinikte tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ancak GBM tedavisinde, merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sisteminin özelliklerin birlikte değerlendirilerek çalışılması gerekmektedir. Merkezi sinir sistemi kan beyin bariyeri ile korunduğundan immünolojik olarak diğer dokularla kıyaslandığında daha az immün cevabı, daha az aktif immün hücreleri (T hücresi, APC) ve daha az HLA sunumu olduğundan seçilecek hedefe karşı üretilen antikorun büyüklük ve kimyasal özellikleri de buna göre belirlenmelidir (Thomas ve ark.2012).

Yapılan çalışmalarda amaç benzer olsa da hedeflenen moleküllerin fonksiyonuna ve konumuna göre farklılık göstermektedirler. Carter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anti-tümör T hücre cevabını sitotoksik T lenfosit antijen 4’ü bloklayarak arttıran ve böylelikle tümöre karşı immün cevabı artıran antikor olan ipilimumab’ı kullanmışlar ve tümör kitlesini azaltmayı başarmışlardır. Buna ek olarak anjiyogenezde görevli vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) hedefleyen Bevacizumab ile kombinasyon tedavisinde daha yüksek etki gözlemlenmiştir (Carter ve ark.2016). Fleurence ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise nöroblastomalarda yüksek ifade edildiği ve hücre membranına takılı

halde bulunan glikosifingolipidlerden olan O-asetil GD2 - disialgangliosit- 'a karşı üretilen antikoru kullanmışlar ve bu antikorla GBM hücre proliferasyonunu inhibe ettiklerini rapor etmişlerdir (Fleurence ve ark.2016). Bu çalışmada da olduğu gibi GBM tedavilerinde kullanılan antikorlar çoğunlukla hücre yüzey belirteçlerine karşı kullanılmaktadır. Bu sebeple kanser hücrelerinin yüzeyel özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

EGFR, epidermal büyüme faktörü reseptörü, kanser hücrelerin yüzeyinde çok yüksek miktarda bulunduğu tespitinin ardından immunoterapi hedefleme tedavilerinde hedef olarak çalışmaları artmış ve faz III aşamasına gelmiştir. Zhang ve arkadaşlarının 2014 yılınca yaptığı çalışmada EGFR ye karşı antikor olan Nimotuzumab kullanılmış ve bu ilaçla birlikte kombinasyon tedavisi olarak GBM de upregüle olan ve EGFR ile düzenlenen miR21'in inhibitörünün tümör üzerinde daha yüksek bir eradikasyon etkisi olacağını göstermişlerdir (Kai-Liang Zhang ve ark.2014). EGFR gibi büyüme faktörleri reseptörlerine karşı üretilen antikorlar ile tedavi arayışı giderek artmaktadır. Bu reseptörlere VEGFR, PDGFR ve cKit örnek verilebilir. Beraberinde ise bu reseptörlerin ligandlarına bağlanması ile aktif hale gelen sinyal yollarını baskılamak da hedeflenmektedir (Hernández-Pedro ve ark.2013).

GBM tümör hücrelerinin hedeflenmesi ve tümör hacminin küçültülmesi elbette ki önem arz etmekte ve tedavide öncelik almaktadır. Ancak daha da önemlisi tümörün inhibisyonu, eradikasyonu veya lobektomi ile eksizisyonu sonrası tümör rekürrensının engellenmesidir. Tümör nüksünün görülmesinin başlıca sebebi bu tarz yöntemlerle tümör dokusunun temizlendiği düşünülürken, sessiz fazda bekleyen kanser kök hücreleri elimine edilemediğinden ve bu hücreler tümör başlatabilme özelliklerinden dolayı tekrar tümörü başlatmaktadır. Yeniden oluşan tümör çok daha agresif ve kanser kök hücre oranı ve dolayısıyla yıkıcılığı çok daha yüksek olmaktadır (Gentao Liu ve ark.2006). Bu sebeple özellikle GBM tedavilerinde kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi için kanser kök hücrelerinin profilinin belirlenmesi ve kanser kök hücrelerine spesifik yeni antijenlerin belirlenmesi gerekmektedir ki çalışmamız da öncelikli olarak bunu hedeflemektedir.

Brescia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CD133 proteininin kanser kök hücre devamlılığı için önemli olduğu ve GBM tedavisi için hedeflenmesi gerektiği vurgulanırken, CD133'ün aynı zamanda hücrede lokalizasyonunu kolaylıkla değiştirebilen (interconvertible) bir protein olduğunu da belirtmiştir. Böylelikle de uygulanan tedavilerde kaçabileceği ve kanser kök hücrelerinin devamlılığını sağlayabileceği belirtilmiştir (Brescia ve ark.2013). Bu sebeple kanser kök hücre yüzeyi profili tam olarak çıkartılarak CD133 ile birlikte hedeflenebilecek yeni moleküler biyobelirteçler belirlenmesi önem arz etmektedir. CD133 pozitif kanser kök hücreleri CD133 negatif kanser kök hücreleri ile kıyaslanarak bu hücrelerin yüzeyel ve transkriptomik farklılıkları geniş bir gen yelpazesinde **ilk kez** bu tezde ortaya koyulmuştur.

Kanser kök hücrelerinin kök hücre olmayan GBM hücreleri (CD133-) ile karşılaştırılması sonucunda hücre yüzey belirteçleri, kanser kök hücre belirteçleri ve sitokin kemokin reseptörleri genlerinin RT-PCR ve Akım Sitometri metotları ile hem transkriptomik olarak hem de proteomik olarak kıyaslanması sonucu yapılan analizlerde kök hücreler için anlamlı bulunan genler sonuç bölümünde belirtilmiş ve bu genlerin detaylı literatür taraması ve tartışması aşağıda belirtilmiştir.

1. CD24

CD24 proteini hücre membranına GPI (glikozilfosfatidilinozitol) çıpası ile bağlanan ve müsin benzeri olan bir hücre yüzey proteinidir. Önceleri B hücre yüzeyine has bir belirteç olarak rapor edilmiş olsa da ardından renal tüp, keratinosit veya granülosit hücrelerinin yüzeyinde de saptanmıştır. Ardından ise bu proteinin endotel hücre yüzeyinde bulunan P-Selektin' e bağlandığı rapor edilmiştir. Bu protein epitel mezenkimal geçişte (EMT) görev almaktadır. Bu özelliğinden dolayı kanser hücrelerinde yüksek bulunan CD24 proteinin kanser hücrelerinin metastazında görev alabileceği düşünülmektedir(Tomohito Tanaka ve ark.2015).

CD24 proteini başta GBM gibi solid tümörler olmak üzere birçok kanser tipi ile

ilişkilendirilmiştir. Tanaka ve arkadaşlarının serviks kanserinde yaptığı çalışmada CD24 proteini yüksek oranda ifade edildiği, aynı zamanda bu proteinin ifadesinin artmasıyla E-kaderin miktarı azalırken, N-kaderin ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Bu sebeple bu kanser tipinde CD24 ifadesi kanser progresyonu ve invazyonu ile ilişkilendirilmiştir (Tomohito Tanaka ve ark.2015). Serviks kanseri ile ilgili başka bir çalışmada CD24 proteini ile apoptoz arasında ters ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Pei ve ark.2016). Kyubo Kim ve arkadaşları ise bu proteinin Ekstrahepatik Safra Yolu kanserinde yüksek olduğunu rapor ederken bu kanser tipinin metastazında da sorumlu olduğu belirtmiştir (Kyubo Kim ve ark.2013). Ayrıca, yumurtalık ve nazofarinjeal karsinomda da CD24 up-regülasyonu bildirilmiştir (Chun-Hung Yang ve ark.2014). CD24 proteinin GBM ile ilişkilendirilmesi ise 2012 yılında Deng ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile rapor edilmiştir. Yüz elli bir glioma dokusu ile yapılan bu çalışmada, GBM dokularında CD24 proteininin hem mRNA hem de protein seviyesinin arttığı belirtilmiştir (Deng ve ark.2012).

CD24 proteininin ifadesinin farklı kanser tiplerinde yüksek olduğunun tespit edilmesinin ardından, bu protein kanser kök hücreleri ile ilişkilendirilmiş ve buna yönelik çalışmalar yayımlanmıştır. Salaria ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD24'ün bağırsak ve pankreatik nörointestinal tümörü kök hücrelerinde önemli bir belirteç olduğunu vurgulamıştır (Salaria ve ark.2015). Pankreatik kanserde yapılan bir diğer çalışmada Quinomycin adlı ilaç Notch1'e karşı kullanılmış ve bu ilacın beraberinde kanser kök hücre belirteci olarak belirtilen CD24 gibi proteinleri de düşürdüğü tespit edilmiştir (Ponnurangam ve ark.2016). Bir diğer çalışma ise CD24 proteininin ekspresyonunu pankreatik duktal adeokarsinom kanser kök hücrelerinde belirtmekte ve bu proteinin hücre farklılaşması ile doğrudan ilişkilendirmektedir. Bu çalışma pankreas tümörlerinde CD24 proteinin Wnt- β -catenin yolağının aktivasyonu ile endotelyal fenotip stabilizasyonu için yüksek ifade edildiğini vurgulamıştır (Lubeseder-Martellato ve ark.2016). CD24 proteininin kanser kök hücre belirteci olabileceği serviks kanser (H Liu ve ark.2016), kolorektal kanser (Nosrati ve ark.2016) ve akciğer kanseri (Xu ve ark.2016) gibi diğer kanser tiplerinde de rapor edilmiştir.

Bu proteinin GBM kök hücrelerinde yüksek olabileceğinden ve bir kök hücre belirteci olabileceğinden ilk defa 2013 yılında yapılan bir çalışmada bahsedilmiştir. Bu çalışmada GBM, meme ve pankreatik tümörlerden tümör başlatıcı hücreler (TBH) toplanmış ve bu hücrelerdeki ortak yüzey antijenleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak ise CD133, CD44 ve CD24 yüzey belirteçleri yüksek bulunurken, ALDH ve p21 genlerinin aktivitesi tespit edilmiştir (Benayoun ve Shaked 2013). Ardından yapılan bir çalışma ise GBM kök hücrelerde kök hücre karakterinden sorumlu olduğu düşünülen Gli rapor edilirken bu genin beraberinde migrasyon/invazyondan sorumlu olduğu düşünülen CD24'ün de ifadesini artırdığı gösterilmiştir (Santoni ve ark.2013). Bir diğer çalışmada ise 5-fluorouracil (5-FU) ilacının GBM kök hücre popülasyonu üzerindeki etkisine bakılmış, ve CD24^{yüksek}/ CD44^{düşük} kök hücrelerin sayısında ilaç uygulandıktan sonra Notch1 ifade artmasına bağlı artış gözlenmiştir (Chockalingam ve Ghosh 2013). Ancak bu proteinin GBM kanser kök hücre belirteci olan CD133 ile birlikteliğini gösteren bir yayın bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızın bulgularında, CD133+ hücreler seçilerek negatiflere (CD133-) ve kontrole (sağlıklı beyin dokusu) göre yapılan analizde CD24 anlamlı olarak artış göstermiştir (Çizelge 3.2 ve 3.5). Akım sitometri analizinde ise hem hücre hatlarında hem de primer kültür hücrelerinde yüksek bir boyanma göstermiştir. Akım sitometri analizinde anahtar konumunda olan CD133 ile birlikteliğini gösteren yüzdelerde ise yalnız boyamanın yaklaşık yarısı kadarı CD133 ile birlikte boyanmıştır (Çizelge 3.13). CD133 ve CD24 proteinin yüksek oranda ortaklık göstermesi, CD24 proteininin CD133 ile birlikte GBM kanser kök hücre belirteci olabileceği saptanmıştır. Bu bulgu ile birlikte ileri tetkiklerde kullanılmak üzere GBM kök hücreleri, CD133+ CD24+ olarak ifade edilebilecektir. Böylelikle CD24 yüzey belirtecinin CD133+ GKH için önemli bir biyobelirteç olabileceği **ilk kez** bu araştırma ile belirlenmiştir.

2.CD38

CD38, reseptör aracılı adezyon ve sinyal yollarına katılan ve hücre içi kalsiyum hareketinde görev alan transmembran bir proteindir ve lökositler gibi bir

çok hücrenin yüzeyinde bulunmaktadır. Proteininin hem membrana bağlı hem de çözünür formunun bulunması bu proteinin hem ekstrasellüler hem de intrasellüler fonksiyonu olduğunun bir göstergesidir. Bu protein Multipl miyelom (MM) hücrelerinde yüksek ifade olmakta ve CD38'e karşı üretilen monoklonal antikor olan Daratumumab, bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Ise ve ark.2016). Guan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanserinde yüzey belirteci olarak CD19 bulunan tümör ayırıcı B ve T hücrelerinin diferansiyasyonunda CD24+ ve CD38+ tespit edilmiştir. Bu çalışma, CD38 ve CD24'ün diferansiyasyon belirteçleri olabileceğini göstermektedir (Guan ve ark.2016). Bir diğer çalışma ise CD38+ miyeloid kaynaklı supressör hücrelerin özofagial kanserinin başlatıcısı olduğunu göstermiştir (Karakasheva ve ark.2015). Poret ve arkadaşları saçlı hücreli lösemi relaps hastalarının CD38+ olduğunu gözlemlemiş ve bu kanser tipinde ilaca dirençten sorumlu hedef olarak bu proteini vurgulamışlardır (Poret ve ark.2015).

GBM ile CD38 proteininin kanser prognozu veya moleküler indüklenmesi ile ilgili ilişkisini doğrudan gösteren bir yayın bulunmamaktadır. Ancak yapılan yayınlar CD38'in GBM büyümesine ortam oluşturabilecek mikro çevrede arttırıcı yönde etkili olduğunu göstermektedir. Örneğin Levy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada GBM mikroçevresini besleyici olduğu düşünülen Mikroglia ve Makrofajlarda (MM) bulunan ve aktivasyonlarında rol oynayan CD38'in susturulması ile GBM'li fare modellerinde daha uzun yaşam süresi saptanmıştır (Levy ve ark.2012). Bir diğer çalışmada da yine GBM mikroçevresindeki CD38'in GBM tedavisi için hedeflenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Blacher ve ark.2015).

Bizim çalışmamızın bulgularına göre transkript düzeyinde CD38 ifadesi CD133+ hücrelerde 6 kat artış göstermiştir (Çizelge 3.2). Akım sitometri analizi ile GBM hücre hatlarında ve primer GBM kültür hücrelerinde protein ifadesi tespit edilmiştir. CD133 ile birlikteliği ise yalnız boyamaya kıyasla düşük ancak en az %6 ortak boyama bulunmuştur (Çizelge 3.13). Bu bulgulardan yola çıkılarak CD38'in GBM hücrelerinin yüzeyindeki varlığı ilk kez saptanmış olup hedef GBM kök hücre belirteci olabileceği için terapötik olarak hedeflenmesi vurgulanmaktadır. Ayrıca bu tez çalışması ile **ilk kez** CD38 proteini CD133+ GKH'de önemli bir biyobelirteç

olabileceği belirtilmektedir. Yine bu tez çalışması ile **ilk kez** CD24 ile beraber CD133+ hücrelerde CD38 de yeni bir klon olarak tanımlanmış ve CD133+CD24+CD38+ klonunun varlığı öngörülmüştür.

3.CSF1R1

CSF1R (koloni stimüle edici faktör1 reseptörü), makrofajların diferansiyasyonu, proliferasyonu, polarizasyon, fagositoz, sitokin sekresyonu ve fonksiyonunu düzenleyen koloni stimüle faktör olan CSF1 ve IL34'ün reseptörüdür. Bu reseptör tirozin kinaz reseptörüdür. Marsh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kemik iliği hücrelerinin CSF1R yüksek ifade ederek üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinin büyümesini indüklediği bildirilmiştir (Marsh ve ark.2016). Bir diğer yayında ise TNBC'de granülosit CSF salınımının çok yüksek olduğu bulunmuş ve bu sebeple bu kanser tipinin tedavisinde CSF1R'nin hedeflenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Hollmén ve ark.2016).

CSF1R'ü ifade yüksekliği ve CSF1R ligandı olan CSF1'in ekspresyonlarının GBM hücrelerinde yüksek olduğu Ishani De ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bildirilmiştir (De ve ark.2016). 2007 yılında Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CSF1R-ligand bağlanmasının GM-CSF1R, STAT5, ERK ve JAK2 yollarını aktive ettiği belirtilmektedir. Bu çalışma CSF1R proteinin GBM hücreleri üzerindeki sitoprotektif ve nöral aktivitesini göstermektedir (Choi ve ark.2007). GBM tedavisinde kullanılmak amacı ile CSF1R inhibitörü olan PLC3397'nin faz II çalışmaları devam etmektedir (Butowski ve ark.2016). Farklı bir çalışmada ise CSF1R blokajı ile tümör agresivitesini azaltmak amaçlanmıştır. Buna göre CSF1R+ myeloid hücre sayısının azaltarak GBM tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Achyut ve ark.2015). Tümör ilişkili makrofaj ve mikroglialar (TAM) dan sentezlenen CSF1R'in, GBM tedavisi için hedeflenmesi gerektiği Pyonteck'in yayınında vurgulanırken (Pyonteck ve ark.2013), Quail ve arkadaşları 2016 mayısta yayınladıkları makalede sadece CSF1R'nin inhibitör aracılığıyla hedeflenmesinin GBM tedavisinde yeterli olmayacağını; çünkü hücrelerin bir süre sonra bu inhibitöre direnç kazandığını vurgulamışlardır. Bu yayına göre, nüks eden

GBM tedavisinde CSF1R ile birlikte aktif olan PI3K ve IGF/IGFR yolaklarının da inhibe edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Quail ve ark.2016).

Yapılan çalışmalar gibi CSF1R'nün GBM tedavisinde oldukça önemli hedeflerden biri olduğunu vurgulamaktadır. Ancak, GBM hücrelerinde özellikle de GBM kök hücrelerinde bir yüzey belirteci olabileceği **ilk kez** bu tez çalışması ile ortaya konulmaktadır. Bu tez çalışmasında CSF1R1'ün mRNA seviyesi CD133+ hücrelerde kontrole kıyasla 7 kat artmış (Çizelge 3.5) ve protein ifadesi değişen değerlerle birlikte oldukça yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.13). Bu bulgulardan yola çıkarak, CSF1R1 proteininin GBM CD133+ hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiğini anlamaktayız. Bu sebeple bu tez çalışması ile ilk kez CSF1R'ünün, kanser kök hücreler için oldukça iyi bir belirteç olduğu ortaya atılmaktadır.

4.CD28

Bir diğer adı Tp44 olan CD28, T hücrelerin proliferasyonunda, sağ kalımında, sitokin üretiminde ve T yardımcı tip 2 (Th2) hücrelerinin gelişiminde önemli bir proteindir. Murray ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre CD28 proteini Multipl miyelom(MM) hücrelerinde yüksek ifade edildiği bulunmuş ve kanser hücrelerinin kemoterapiye karşı direncinde etkin olan mekanizmanın, MM hücrelerinin yüzeyindeki CD28in, dendritik hücre yüzeyindeki ligandı olan CD86'ya bağlanması ile gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu direncin kırılmasının da ancak CD28 proteinin ligand bağlantısının kesilip, alt yolları (Akt, Bim, FoxO3a) regülasyonu ile mümkün olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışma kanser hücrelerinin kemoterapötik direncinden sorumlu genin CD28 olduğunu göstermektedir (Murray ve ark.2014). Bu proteinin GBM hücre yüzeyinde yüksek ifadeli olduğunu gösteren henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada CD28 transkripti sadece CD133 pozitif hücrelerde 5 kat fazla bulunmuştur. CD28 T hücre yüzey belirteci olduğundan, kanser kök hücrelerini immunoprotektif olabilmesi için bu proteinin yüzeyde arttığı düşünülmektedir. Bu proteinin GBM ile ilişkisini ortaya koyan **ilk** çalışma bu tez çalışması olacaktır. Kanser kök hücrelerin bağışıklık sistemine açık hale getirilmesi

kanser hücrelerinin eliminasyonunda ve kanser tedavisinde önemli bir adım olacağından bu proteinin hedeflenmesi önem taşımaktadır.

5.IL13RA2

IL13RA2 reseptör proteini, IL13'e yüksek afiniteli bağlanırken sitoplazmik bölgesi bulunmadığından sinyal yolağı başlatmadığı düşünülen bir proteindir. Papageorgis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL13RA2 proteinin STAT6-TP3 yolağı üzerinden kanser metastazını artırdığı bildirilmiştir (Papageorgis ve ark.2015). Beyin tümöründe IL13RA2 proteinin yüksek ifadeli olduğu ilk olarak 2008 yılında Marie tarafından yapılan DNA mikro-array çalışmasında bulunmuştur (Marie ve ark.2007). Saka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanseri hedeflemek için IL13RA2 transfekte edilmiş dendritik hücreler verilmiş ve tümör kitlesi azaltılmıştır (Saka ve ark.2010). Bir diğer çalışma ise Squomus hücre karsinomunda kullanılan bir ilaca karşı oluşan direncin IL13RA2 ve IL13R2 reseptörlerinin yüksek ifadesinden kaynaklandığını ve bunları susturmanın ilacın etkisini artırdığını göstermiştir(Freiberger ve ark.2015). Renal hücre karsinomunda yapılan benzer bir çalışma ise yine ilaç direncinden IL13RA2 geninin yüksek ekspresyonunun sorumlu olduğunu bildirmiştir (Shibasaki ve ark.2015).

Bu yayınlardan da anlaşılacağı gibi IL13RA2, kanser hücrelerinde ilaca karşı direnci sağlamak amaçlı bir görevi olduğundan, kanserde yüksek ifadelenmektedir. IL13RA2'nin GBM'de de yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak bu protein doğrudan kök hücrelere özgü olabileceği **ilk kez** bu tez çalışması ile bildirilmiştir. Bu çalışmada IL13RA2 proteini CD133 pozitif hücrelere özgü olarak normale kıyasla 5.5 kat artmıştır. CD133- kök hücre olmayan tümör hücrelerde transkriptomik ifadesine rastlanmamıştır (Çizelge 3.7). Protein ifadesi ise hücre hatlarında ve primer kültür hücrelerinde yüksek ifadeli olarak saptanmıştır (Çizelge 3.13). IL13RA2 proteini GBM CD133+ kanser kök hücre yüzey proteinlerinden biri olduğu ve hedefleme tedavilerinde CD133 ile birlikte hedeflenebileceği, GBM kök hücre tedavileri açısından önem arz etmektedir.

6.VCAM1

Bu protein lökosit-endotel hücre adhezyon ve sinyal transdüksiyonunda görev alır. EGFR'nin GBM' de aktif bir sinyal yolağı olduğu bilinmekle birlikte, Zheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu yolağın VCAM ifadesini arttırdığı bildirilmiştir. Bu artış ile birlikte GBM hücreleri ile makrofajların etkileşimi uyarılmakta ve böylece tümör invazyonu artmaktadır (Zheng ve ark.2013). Bir diğer çalışma ise kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerdeki VCAM1 ifadesinin, GBM hücreleri aracılığı ile artmasını ve böylece bu hücrelerin GBM hücrelerine doğru migrasyonunun arttığını bildirmektedir. Bu süreçte PI3K yolağının rol oynadığı da belirtilmiştir (Hu ve ark.2012) . Bir diğer çalışma ise GBM'de NOTCH1 ifadesi ile birlikte VCAM gibi anjiyogenez ilişkili genlerin de arttığını, dolayısıyla Notch1 sinyal yolağının anjiyogenez için önemli olduğunu rapor etmektedir (Guichet ve ark.2015). Ayrıca VCAM proteininin Hedgehog inhibitörünün kullanılması sonucu ifadesinin azalması bu proteinin Hedgehog yolağı ile ilişkili olduğunu da göstermektedir (Han Zhang ve ark.2016). VCAM1 proteinin yüksek ifadesinin GBM kök hücreler ile ilişkisini vurgular nitelikte yapılan çalışmada Zarnescu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada astrositoma ve glioblastoma nörosferlerinden alınan kök hücrelerde VCAM1 ekspresyonu yüksek bulunmuştur (Zarnescu ve ark.2011). Benzer şekilde CD133/CD44 yüksek ekspresyonlu prostat kanser kök hücreleri ayrıldığında JAK/STAT yolağı ile birlikte VCAM1 ve ICAM ifadeleri yüksek bulunmuştur (Duzagac ve ark.2015). Bu çalışmada da VCAM1 ifadesi benzer şekilde sadece CD133 pozitif hücrelere özgün olarak normal beyin dokusuna kıyasla 157 kat artmış görülmektedir (Çizelge 3.5). Bu kat artışı oldukça yüksek olup literatürdeki sonuçlarla paralellik göstermektedir.

7.LTBR

TNFRSF3 ve CD18 olarak da adlandırılan bu protein ligandları olan TNFLSF14 ve lymphotoxin alfa/beta'ya bağlanır. Böylelikle başlayan sinyal yolağı, lenfositlerin gelişimi, lipid metabolizması, immün cevabı ve programlı hücre ölümünde rol oynar. Ayrıca karsinogenez ile ilişkilendirilmektedir. Nisan 2016 da yapılan bir revizyon makalesinde önceki çalışmalarda belirtilen LTBR'nin anti-tumoral aktivitesi değerlendirilmiştir. Ancak son zamanlarda yapılanların aksine, LTBR sinyal yolağı

özellikle katı tümörlerde hücrel pro-onkojenik mekanizmaları da aktif hale getirdiğini belirtmiş, bu sebeple bu yolağın baskılanması gerektiğini vurgulamıştır(Fernandes ve ark.2016). Bir diğer çalışma ise GBM de metastatik ve normal dokuların karşılaştırılması ile lenfosit aktivasyonunda, adhezyon ve migrasyonda rol oynayan genler araştırılmıştır. Burada CD18 yüksek bulunmuş ve buna karşı antikor terapilerinde tümör eliminasyonu gözlenmiştir (Kuppner ve ark.1990). Başka bir çalışmada ise LTBR agonist antikor (CBE2) ile hedeflenmiş ve bu terapi sonrası xenograft modelinde oluşturulan tümörün büyümesi baskılanmıştır. Dolayısıyla agonistik antikorlar kullanarak LTBR hedeflenmesi başta kolorektal kanser olmak üzere diğer kanser tiplerinde de kullanılabilecek bir tedavi olduğu bildirilmiştir(Lukashev ve ark.2006). Hepatik kanserde yapılan çalışma ise LTBR'nin AKT/ β -katenin transfeksiyonu sonucu ifadesinin arttığını göstermiş ve LTBR hedeflenmesi ile tümör progresyonunun azaldığını göstermiştir. Tersine LTBR ifadesi artırıldığında ise tümör proliferasyonunun arttığı belirtilmiştir. dolayısıyla bu proteinin AKT sinyal yolağı üzerinden kanser gelişimindeki rolü belirtilmiştir (Scarzello ve ark.2015).

LTBR'nin glioblastoma multiforme ile olan bağlantısını gösteren bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada LTBR yalnızca kanser kök hücrelerine özgü bulunurken, kontrol doku ile kıyaslama da CD133+ hücrelerde 3.67 kat daha fazla gözlenmiştir (Çizelge3.7). Akım sitometri analizinin sonucunda ise başta en agresif hücre hatlarında (U118 ve T98) çok yüksek olmak üzere GBM hücrelerinde oldukça yüksek ifade olmaktadır (Çizelge3.13). LTBR'nin GBM tümör hücreleri ve GKH'lerde önemli bir biyobelirteç olabileceği **ilk kez** bu çalışma ile ortaya atılmıştır. LTBR, Traf2 ilişkili büyüme sinyali ve anti apoptotik sinyal veren yolağı indüklediğinden (Bechill ve Muller 2014), bu proteinin blokajı doğrudan kanser kök hücreleri için bir terapi olacağı düşünülmektedir.

8.NOTCH1

Bir transmembran yüzey protein olan NOTCH1, EGF- benzer ekstraselüler kısımları bulunmaktadır. NOTCH sinyal yolağı hücreler arası fiziksel ilişkiler ile tetiklenen, NOTCH1 ligandının bağlanması ile aktif olan bir yolaktır. Bu gendeki mutasyonlar,

lösemi gibi birçok karsinom ile ilişkilendirilmektedir. 2015 yılında yapılan bir çalışma GBM de NOTCH sinyal yolağını araştırmış, ilgili reseptörler(Notch1, Notch2, Notch3, ve Notch4), ligandlar (JAG1, JAG2, DLL3) ve alt yolaktaki elemanlar taranmıştır. Sonuç olarak bu yolağın GBM de ciddi anlamda aktif olduğu gösterilmiştir (Narayanappa ve ark.2015). Bir diğer yayın CD133+ GBM kök hücrelerindeki aktif olan yolaklar taranmış, indüklenmiş Glioma kök hücrelerinde Notch1 ve Wnt/b-katenin sinyal yolakları ile birlikte, CD133, CD44 ve ALDH1A1 protein ifadeleri yüksek bulunmuştur (Safa ve ark.2016). Saito ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ise CD133, Notch-1 ve VEGF genlerinin radyoterapi ve kemoterapi sonrası ifade değişikliklerini analiz etmiş ve nüks GBM’de bu genlerin ifadelerini yüksek bulmuştur (Saito ve ark.2015). Yine bir diğer çalışmada ise GBM de Notch1 ifadesinin baskılanması için siRNA kullanılmış ve GBM hücrelerinin proliferasyonunun ve tümör progresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (Jianpeng Wang ve ark.2012). Çalışmamızda bu sonuçları destekler nitelikte Notch1 proteini CD133+ hücrelere özgü ve kontrole kıyasla 81 kat yüksek bulunmuştur. Bu proteinin GBM’de proliferasyon ve invazyonu artırıcı ve apoptozu baskılayıcı rolü bulunduğundan (Prokopi ve ark.2014) bu proteinin hedeflenmesi, özellikle kanser kök hücre tedavileri açısından önem arz etmektedir.

9.JAG1

İnsan Jagged1 proteini Notch1 proteininin ligandıdır. Bu gendeki mutasyonlar Alagille Sendromu’na sebep olur. Ayrıca hematopoiezle ilişkilendirilmektedir. 2012 yılında yapılan çalışmada Notch1 ligandları Delta-like 4(Dll4) ve Jagged 1(JAG1) proteinlerinin GBM hücrelerinin Bevacizumab’a karşı dirençten sorumlu olup olmadıkları taranmıştır. Bu yayında her iki protein de GBM hücrelerinde yüksek bulunurken, Dll4’ün ilaç direncinde daha fazla artmasıyla dirençten sorumlu tutulması gerektiği vurgulanmıştır (Jubb ve ark.2012). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise TRPM7 geninin GBM’de JAK2/STAT3 ve JAG1/NOTCH yolaklarını indükleyerek proliferasyon ve migrasyona sebep olduğu ve Glioma kök hücre belirteçlerinin (ALDH1 ve CD133) beraberinde arttığını bildirmiştir (Mingli Liu ve ark.2014). Seksen iki GBM hastası ile yapılan bir diğer çalışmada ise primer GBM de JAG1 ekspresyonu incelemiştir. Yüksek Jagged 1 ifadesinin yaşam süresini

kısalttığını istatistiksel olarak anlamlı olarak göstermektedir (Qiu ve ark.2015). Ayrıca Jag1'in GBH'lerin gelişimi için önemli bir protein olabileceği vurgulanmıştır (Thant S Zhu ve ark.2011). Bizim çalışmamız da bu sonuçlara paralel olarak CD133 pozitiflerde (985.3 kat) negatiflere (545.8 kat) kıyasla JAG1 ifadesi daha fazla bulunmuştur. Dolayısıyla GBM'de JAG1 proteini tam olarak kanser kök hücrelere özgü olmasa da kanser kök hücreler için önemli bir biyobelirteç olabilir. Benzer şekilde JAG1 reseptörü olan NOTCH1'in CD133+ GKH'lerde yüksek ifade ediliyor olması bu reseptör-ligand bağlanması ile aktif hale gelen NOTCH sinyal yolağının kanser kök hücrelerinde aktif olduğu belirlenmiştir.

10. TIE2 (TEK)

Ligandı Anjiyopoietin1 olan reseptör, embriyonik kas gelişiminden sorumlu sinyal yolağını başlatır. Bu gendeki mutasyonlar kas malformasyonlarına sebebiyet veren hastalıkları ortaya çıkarır. 1999 yılında yapılan çalışmada Tie2 ligandı olan Anjiyopoietin1'in tümör anjiyogenezindeki rolü belirtilmiştir (Zagzag ve ark.1999). Bir diğer yayında ise anjiyogenez ilişkili olan Flk-1'in Tie2 gibi diğer ilişkili proteinlerle beraber GBM hücrelerindeki ifade farklılıkları ve anjiyogenez ve tümör büyümesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Millauer ve ark.2006). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise Ang1/Tie2 ekspresyonunun glioma ve endotel hücreleri arasındaki iletişimdeki rolünü araştırmış ve siRNA ile Tie2 susturulduğunda glioma hücrelerinin adheziv özelliğinin azaldığını göstermiştir. Ayrıca Tie2/Ang1 sinyal yolağının tümör hücrelerinin endotel hücrelerinin bulunduğu mikroçevrede invazivlik özelliğini kazanmasında rolü olduğunu ve GBM tedavisinde hedeflenmesi gerektiğini belirtmektedir (Dan Liu ve ark.2010). Ancak Tie2 proteinin CD133 GBM kök hücreleri ile doğrudan ilişkisini açıklayan bir yayın bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise CD133-lerde Tie2 7 kat artarken CD133+'lerde 50 kat artmaktadırlar (Çizelge 3.6). CD133- hücrelerde ifade olduğu belirlenmiştir, ancak CD133+ hücrelerde bu denli bir artış gözlenmesi bu proteini yine kanser kök hücreler için önemli bir belirteç konumuna getirmektedir. Bu sebeple Tie2 proteinin CD133+ kanser kök hücreleri için önemli bir biyobelirteç olabileceği **ilk kez** bu tez çalışması ile belirlenmiştir.

11. PLAUR

Diğer adı uPAR olan bu reseptör, ürokinaz plasminojen aktivatörü olmakla birlikte, plazmin oluşumu ve lokalizasyonunda görev alır. Transmembran bölümü bulunmayan protein GPI ile hücre membranına çakılıdır. Bu enzim plasminojeni kesimleyerek aktif plazmine çevirir. Plazmin ise ECM'yi kesimleyerek invazyon ve metastaza neden olabilmektedir. GBM ile ilgili 2002 yılında yapılmış olan çalışmada bu reseptörün ligandı olan uPA'ya bağlanması ile başlayan kesilme yolağının hücrelerin invazyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Mohanam ve ark.2002). Bir diğer çalışma PLAUR'ın FOXM ile beraber kolon kanser metastazından sorumlu olduğunu ve 203 kolon kanseri primer dokusundaki yüksek ifadeli olduğunu göstermektedir (Dawei Li ve ark.2013). Duriseti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 12 farklı uPAR'a karşı olan antikör denenmiş, en efektif olanı seçilmeye çalışırken, sonuç olarak ise bu proteinin kanserde bloklanması hücre içi uPAR sinyal yolağını blokladığı ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Duriseti ve ark.2010). Bir diğer çalışma ise uPAR ligandının bir kısmını içeren kimerik bir protein olan DTAT'ın verilmesiyle GBM U87 immün yetmezliği olan fare beyin tümörünün küçülmesi gözlenmiştir. Bu etki ise uPAR alt sinyal yolağının bloklanması ile gerçekleşmiştir (Rustamzadeh ve ark.2007).

Bu çalışmalardan da anlaşılabileceği gibi PLAUR kanser hücre invazyonunda, migrasyonunda ve metastazında oldukça etken bir proteindir. Bu proteinin GBM CD133 GKH'lerinde etkili olduğunu ve siRNA ile susturulduğunda GBM invazivliğini düşürebileceğini Alapati ve arkadaşları 2012 yayınında bildirmişlerdir (Alapati ve ark.2012). Bizim çalışmamızda PLAUR, CD133+ hücrelerde 1131.4 kat görülürken CD133- hücrelerde 779.8 kat bulunmuştur (Çizelge 3.1). Ayrıca tüm GBM hücrelerinde ekspresyonu oldukça yüksek çıkmıştır (Çizelge 3.13). Bu sonuç da PLAUR reseptörünün kanser kök hücrelerinde daha fazla iken, tüm tümörigenez için önemli bir hedef olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla GBM tümör hücrelerinin hedeflemesi yapılırken, PLAUR'un önemi vurgulanmaktadır. Ayrıca, CD133+ kanser kök hücrelerin yüzeyinde yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir.

12. CXCR3

Bu reseptörün, CXCL11, CXCL10 ve CXCL9 ligandlarına bağlanmasıyla başlayan sinyal yolağı integrin aktivasyonunda, hücre iskeleti değişikliklerinde ve migrasyonda rol oynamaktadır. Bu reseptörün GBM ile ilişkili olduğuna dair ilk yayın 2008 de yapılmış ve CXCR3/CXCL10 proteinlerinin bağlanması GBM proliferasyonunda etkili olduğu vurgulanmıştır (Maru ve ark.2008). Bir çalışmada CXCR3 bulunmayan farelerdeki tümör hücre sayısında azalma ve daha uzun yaşam gözlenmiştir. Bunun üzerine CXCR3 antagonisti NBI-74330 verilmesiyle anti-glioma etkisi oluşturulmuştur (C Liu ve ark.2011). Yine bu reseptörün GBM yayılması ile ilişkili olduğu da belirtilmiştir (Pu ve ark.2015). Bir diğer çalışmada, CXCR3 izoformları olan CXCR3-A ve CXCR3-B'nin kanser kök hücrelerinin metastaz, proliferasyon ve migrasyon üzerindeki etkileri rapor edilmiştir (Yanchun Li ve ark.2015). Bu sebeple bu reseptörün hedefleme tedavilerinde kullanılması önemli bir terapötik yöntem olacaktır. Bizim çalışmamızda CXCR3 ifadesi hem CD133 negatif hem de CD133 pozitif hücrelerde normal dokuya oranla yaklaşık 100 kat yüksek bulunmuştur.

13. CD44

Bu protein hücre adhezyonunda ve migrasyonunda görev yapan bir hücre yüzey glikoproteinidir. Hyaluronic acid (HA), osteopontin, kollojenler ve bir çok MMP bu reseptörün ligandı konumundadır. Bu reseptör, hücre homeostazı, yerleşmesi, yuvarlanması ve tümör metastazına katılmaktadır. CD44 hücre yüzey belirteci, meme, pankreas, yumurtalık, akciğer gibi birçok kanser tipi için kök hücre belirteci olarak rapor edilmiştir (Chanmee ve ark.2015). Bu protein yapılan bir çalışmaya göre GBM de CD133'ten ayrı olarak farklı bir alt grubu oluşturmaktadır. Bu sebeple bu iki belirteç kullanılarak ko-ekspresyon deneyleri yapılmış ve sonuç olarak CD133-modülünde artan hücre büyümesi gözlemlenirken, CD44- modülünde invaziv kapasitenin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Brown ve ark.2015). Bir diğer çalışmada ise Notch yolağını inhibe etmek için kullanılan γ -sekretaz inhibitörüne karşı hassas olan GBH'lerin CD44-yüksek CD133-düşük olduğu gösterilmiştir.

Dolayısıyla bu ilacın yalnızca bu popülasyon üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Shingo Tanaka ve ark.2014).

Bradshaw ve arkadaşlarının yayımladığı revizyon makalesi, GBM kanser tipinde kanser kök hücrelerinin tam olarak net olarak anlaşılmadığı ve bir hiyerarşi içinde alt tiplerinin olabileceğini vurgulamış ve CD44 gibi bilinen kanser kök hücre belirteçlerinin incelenmesi gerektiğini belirtmiştir (Bradshaw ve ark.2016). 2016 mayısta yayımlanan bir çalışmada nekrotik alanların etrafında bulunan GBM tümör hücrelerinin en önemli EMT indükleyicisi, dönüştürücü büyüme faktörü olan TGF- β ve beraberinde kanser kök hücre belirteçleri CD133,APL ve CD44'ün yüksek ifade olduklarını belirtmiştir. Hastaların genel yaşam sürelerinin kısa olmasını da bu faktörlerin yüksek ifade olmasına bağlamıştır (Iwadate ve ark.2016).

Bizim çalışmamızda CD133+ ve CD133- hücrelerde ifade farklılıkları saptanmamıştır (60.75 ve 54.7 kat sırasıyla) (Çizelge 3.1). Kök hücre ayırmaksızın yapılan akım sitometri analizinde ise CD44 boyamaları çoğunlukla %100e yakın çıkmıştır (Çizelge 3.13). Bizim bulgularımıza göre CD44 proteini tüm GBM hücrelerinde ifade olmaktadır. Dolayısıyla CD44'ün, GBM'de bir kök hücre belirteci değil, önemli bir GBM tümör belirteci olabileceği saptanmıştır. Bu çalışma birçok tümörde önemli bir kanser kök hücre belirteci olan CD44'ün GBM için bir kök hücre belirteci olmadığını gösteren **ilk çalışmadır**. Ayrıca bu protein tüm GBM tümör hücrelerinin yüzeyinde ifade olduğu bulgularımızda gösterildiğinden GBM tanısında ve hedeflenmesinde CD44 proteinin kullanılabileceğini gösteren **ilk** yayın olacaktır.

14. MYH9

Bu protein konvansiyonel kas-olmayan miyozin olarak adlandırılır. Bu protein sitokinez, motilite ve hücre şeklini koruma gibi birçok sürece katılır. Bu gendeki mutasyonlar sonucunda Epstein Sendromu, Alport Sendromu, Sebastian Sendromu, Fechtner Sendromu birçok hastalık meydana çıkar. Katano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Myh9 ekspresyonu ile akciğer kanserinde invazyon ve migrasyon araştırılmış, bu proteinin ifade yüksekliği invazyon ve metastazla ilişkilendirilirken,

kötü diferensiyasyon ve prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Katono ve ark.2015). Bir diğer çalışmada ise alkolizm tedavisinde kullanılan disulfiram ilacının yayında aynı zamanda Myh9'u hedeflediği belirtilmiştir, Üçlü negatif meme kanserinde kullanılan doxorubicin ilacı ile kullanılması ile $ESA^+/CD24^{-low}/CD44^+$ kök hücre popülasyonu azalmıştır. Bu çalışma Myh9'un kök hücreleri hedeflemek için önemli bir protein olduğunu göstermektedir (Robinson ve ark.2013). Bir diğer çalışma ise arada invazyon açısından farklılığı olduğu bilinen iki meme kanseri hücre tipinin moleküler incelemesini yapmış ve aradaki farkın sadece MYH9 protein ekspresyonunun olduğunu göstermiştir. Bu protein ifadesi invazyon kapasitesi yüksek olandan fazla iken, düşük olanda yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu protein siRNA metodu ile susturulduğunda kanser hücrelerinin invazyonunun da bloklandığı tespit edilmiştir. Bu yayın MYH9 proteinin kanser invazyonu için önemini ortaya koymaktadır (Derycke ve ark.2011). GBM hücreleri ile ilgili yapılan çalışma GBM hücrelerini 2 modele ayırmıştır; transforme olmayan GBM hücreler nörosfer gibi tüm hücre sitoplazmik hareketi ile hareket ettiğinden miyozin II bulunduranlar ve 2 boyutlu düzlemde fibroblast gibi hareket eden ve miyozin II bulundurmayanlar. Sonuç olarak GBM hücrelerin çok küçük deliklerden geçebilmek için 1. Model olan nörosfer modelinde olması gerektiğini ve dolayısıyla miyozin II bulundurduklarını vurgulamıştır. Bu çalışma GBM hücrelerinin invazyon, hareket, migrasyon ve metastazını hedeflemede MYH9 proteinin önemini vurgular niteliktedir (Beadle ve ark.2008).

Çalışmamızda da paralel sonuçlar elde edilmiş, CD133+ (40198.9 kat) ve CD133- (28823 kat) hücrelerde kontrole oranla yüksek oranda ekspresyon gözlenirken bu iki grup karşılaştırıldığında kanser kök hücrelerde çok daha yüksek saptanmıştır. Bu nedenle, MYH9 proteinin kanser kök hücreler için önemli bir belirteç olacağı vurgulanmaktadır.

15. MYH10

Bu protein, sitokinez, motilite ve hücre polaritesinde rol oynamaktadır. Bu gendeki mutasyonlar May-Hegglin anomalisi, beyin ve kalpteki gelişim bozukluklarına sebep olmaktadır. Akut miyeloid lösemi ve miyelomonositik

lösemide trombosit oluşumunda etken olduğu düşünülen RUNX1 geninin Myh10 proteini ile ilişkilendirilmiş, bu ve buna benzer trombosit hastalıklarında Myh10 geninin anahtar olabileceği vurgulanmıştır (Antony-Debre ve ark.2012). Bir diğer çalışma ise Myh10'un akciğer kanseri için önemli bir biyobelirteç olan Bmp4'ün alt yolağında bulunduğunu belirtmiş ve bu kanser tipinin tedavisinde kilit konumunda olacağını vurgulamıştır (Jeong Seon Kim ve ark.2015). BMP4'ün GBM'de kanser kök hücrelerini diferensiyasyon için indükleyen bir belirteç konumunda olduğu vurgulandığından MYH10'un kanser kök hücreler için önemli olduğu çıkarımı yapılabilir. Ancak bu proteinle kanser kök hücrelerin ilişkisine dair her hangi bir yayın bulunmamaktadır. Bu tezin sonucunda ise CD133- hücrelerde ekspresyon hiç bulunmazken, CD133+ hücrelerde kontrole oranla 93.97 kat artış görülmüştür. Bu çalışma Myh10 proteinin GBM ile ilişkisi gösteren **ilk çalışma** konumundadır.

16. NFKB1

Bu protein 105kD ağırlığında transkripsiyon faktörü olarak da görev yapan bir proteindir. Bu faktörün stimülasyonu hücre dışı yoldan sitokinler aracılığı ile olmaktadır. Aktive olan NFKB, çekirdeğe girer ve birçok genin ekspresyonunu etkiler. Normal dışı aktive olan protein, uygun olmayan immün sistem aktivasyonuna ve beraberinde inflamatuvar hastalıklara sebep olur. Konsantre lösemi kök hücrelerinde kullanılan bir ilacın, bu hücrelerde etkin olduğu düşünülen NF- κ B ve TGF- β proteinlerinin ifadesini azaltarak proliferasyonu azaltmaktadır. Bu çalışma NFKB1 proteininin kök hücre proliferasyonundaki rolünü belirtmektedir (Li-Na Wang ve ark.2015). Glioblastoma hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise miRNA16'nın NFKB1 ve MMP-9'u down-regüle ederek glioma invazivliğini ve malignansiyi azalttığı bildirilmiştir. Bu sebeple NFKB1, GBM hücrelerinin büyümesi ve invazivliğinde önem arz etmektedir (Tian-Quan Yang ve ark.2014). Bir diğer çalışma ise GBM'de pronöral ve mezenkimal seviyeleri incelemiş ve bu seviyeler arasında geçişin NFKB sinyal yolağı ve CD44 ifadesi ile regüle olduğunu göstermiştir. Mezenkimal imza, CD44 ekspresyonu ve NFKB aktivasyonu GBM de zayıf radyasyon cevabı ile ilişkilendirilmiştir (Bhat ve ark.2013). NFKB'nin GBM patogeneziindeki rolünü özetleyen revizyon makalesine göre GBM tedavisinde ve diğer tedavilere cevabını değiştirmede NFKB yolağı hedeflenmeli ve önem arz

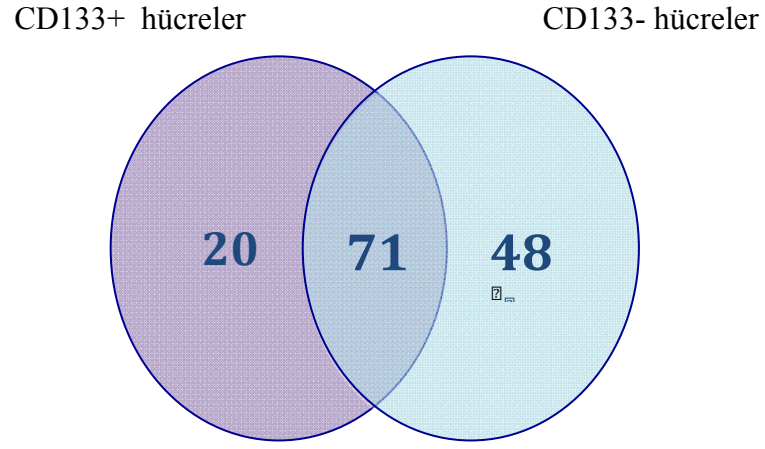
etmektedir (Puliyappadamba ve ark.2014). GKH'leri ile yapılan bir çalışma ise GBM'de nörosferdeki GKHler alınmış ve bunlardaki gen profiline bakılmıştır. Buna göre GKHler en önemli yolak Notch sinyal yolağı ve bu yolağın düzenlenmesi ile NFkB ve STAT yolaklarının yüksek ekspresyonu ile gerçekleşmektedir (Garner ve ark.2013). Ancak literatürde NFkB1'in doğrudan CD133+ GBM kök hücreleri ile ilişkisini gösteren bir yayın bulunmadığından bu çalışma **ilk** olacaktır. . Bizim sonuçlarımızda ise NFkB1 ifadesi CD133- hücrelerde bulunmazken, CD133+ hücrelerde normale kıyasla 4.79 kat arttığı gözlenmiştir (Çizelge 3.2).

17. CD40L

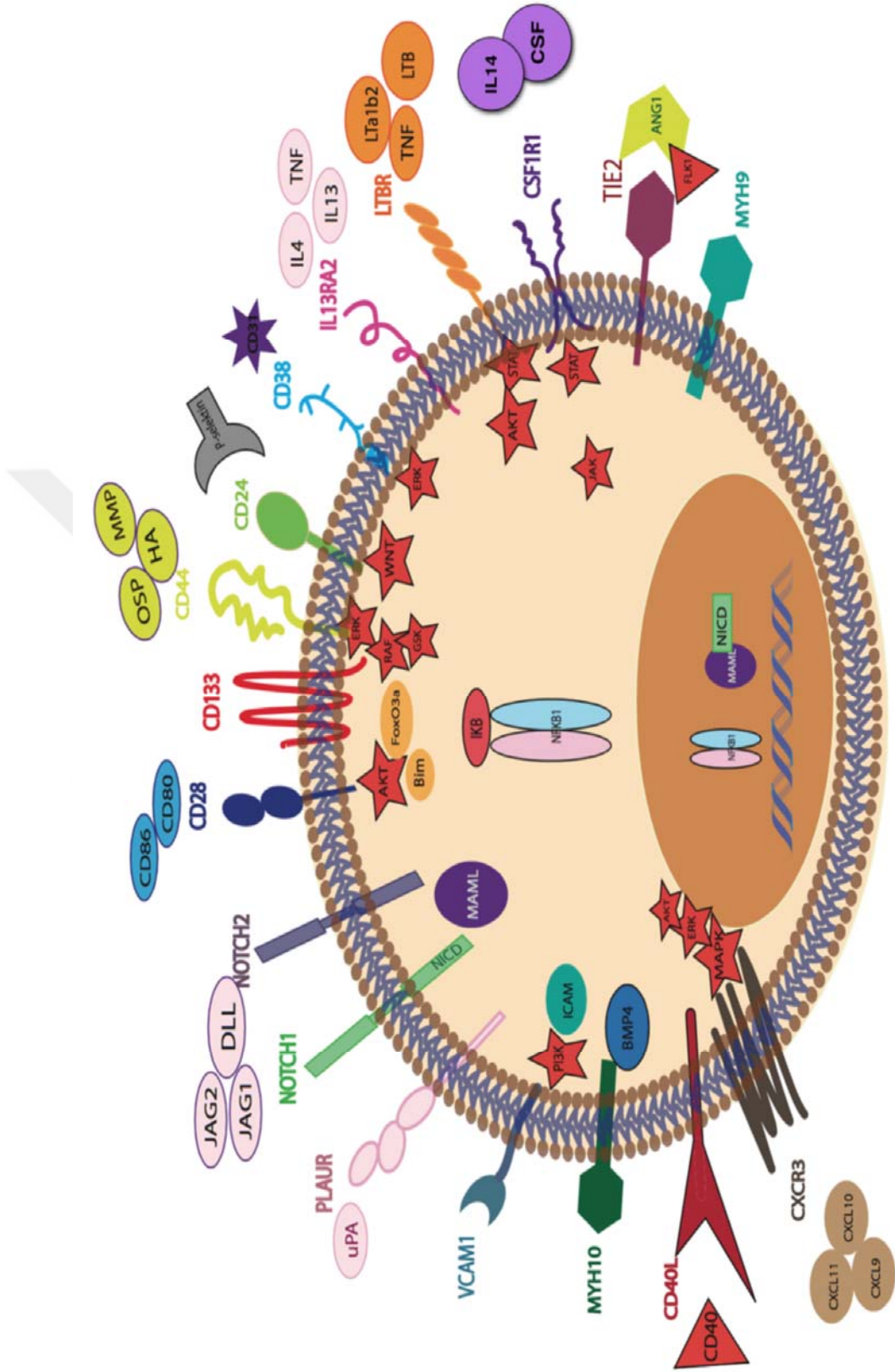
CD154 olarak da bilinen CD40 ligandı T hücre yüzeyinde bulunmakta ve B hücre yüzeyindeki CD40'a bağlanarak B hücre fonksiyonunu düzenlemektedir. Yapılan bazı çalışmalar CD40L indüklendiğinde hücre için ölüm yolaklarını tetikleyebileceği ve bu sebeple kanser hücrelerinde hedeflenmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Elmetwali ve ark.2016; Soliman ve ark.2015). CD40L ve CD40'ın tümörde beraber ifade olması ise tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırıcı ve anti apoptotik etki oluşturmaktadır. Hassan ve arkadaşlarının yazdığı revizyon makalesi CD154'ün bu özelliğine dikkat çekerek istenirse kanser terapisinde uygun ve hedeflenebilecek bir belirteç olduğunu vurgulamamaktadır (Hassan ve ark.2015).Tong ve arkadaşları ise meme kanserinde hem CD40 hem de CD40L yüksek ifade olduklarını göstermişlerdir. Bu sebeple etraftaki tümör infiltrate lökositler yüzeylerindeki CD40L ile yeterince hücre büyüme inhibisyonu yapamamaktadırlar. Bu yüzden kanser hücrelerinin eliminasyonu için CD40-CD40L hattı hedeflenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Tong ve ark.2001). Walker ve arkadaşlarının 2015 revizyon makalesi ise aynı görüşü GBM üzerinden değerlendirmekte ve CD40/ CD40L hattının önemini vurgulamaktadır (Walker ve Migliorini 2015). Ancak bu proteinin GBM'deki rolüne dair yapılmış henüz bir çalışma bulunmamaktadır. CD40L GBM ve hatta GKH'lardaki ekspresyonu ve farklılıklarını belirten **ilk çalışma** bu tez olacaktır. Bulgularımızda RT-PCR analizinde CD133 negatiflerde oldukça az bulunurken, CD133 pozitif GKH'lerde

normale kıyasla 17 kat artış görülmektedir (Çizelge 3.4). Literatürden de anlaşılacağı gibi CD40L'nin ligandına kanser hücreleri üzerinde bağlaması hücrelölüm yolağı engellenmektedir. Yine aynı yolak özellikle kanser kök hücrelerinde hedeflenirse kanser kök hücrelerin ve tümör hücrelerin ölümü indüklenebilecektir. CD40L bu anlamda CD133+ GKH'lerde iyi bir hedef olabileceği **ilk kez** bu çalışma ile saptanmıştır.

Özet olarak, bu tez çalışmasında GBM'de CD133+ kanser kök hücreleri ve CD133- hücreleri ayrılmış ve bunlarda toplamda 264 gen ifadesi araştırılmıştır. Bu genlerden 139 gen istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu genlerin arasında 20 gen CD133 pozitiflere özgü bulunurken, bunlardan 48 gen CD133- hücrelere özgü olarak bulunmuştur. Geriye kalan 71 gen ise her iki hücre tipinde ortak olarak tespit edilmiştir. Bu genlerden 17'si istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir. CD133+ yüzeyinde bulunan bu genlerin protein düzeyinde doğrulama deneyleri akım sitometrisi metodu ile yapılmıştır. Bu genlerden 8'i (CD24,CD38,CSF1R1, CD28,IL13RA2,VCAM1, NOTCH1,LTBR) sadece CD133+ kanser kök hücrelerine özgü ve yeni ve CD133 proteini ile beraber kanser kök hücre belirteci olmaya aday olarak saptanmıştır. Bu proteinlerin saptanması ile GBM'de CD133+ hücrelerde farklı alt kök hücre klonları olabileceği düşünülmektedir (CD133+ CD24+ CD38+). Bununla beraber CD133 pozitif ve negatif hücrelerde ifade olan, başta %100 boyama gösteren CD44 proteini olmak üzere, proteinlerin sadece kanser kök hücre değil tüm GBM tümör hücrelerinin belirteci olduğu ve dolayısıyla hedefleme tedavilerinde önemli birer biyobelirteç olabilecekleri saptanmıştır. Aşağıdaki Venn şeması toplamda çalışılan genlerden anlamlı çıkanlarının CD133+ ve CD133- hücrelere özgü olan ve ortak olan gen sayılarını belirtmektedir (Şekil 4.1). Şekil 4.2.'de bu genlerden CD133+ GKH'lere özgü olanlar hücre modeli üzerinde özetlenmiş ve gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Gerçek zamanlı PZR analizi sonrasında anlamlı çıkan gen sayıları



Şekil 4.2. CD133 + GKH hücre yüzey belirteçleri, ligandları ve alt yolları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması beyin tümörleri arasında en ölümcül olanı Glioblastoma Multiforme (GBM) olarak adlandırılan astrositoma tümörünün rekürrensinde ve metastazında etkin olan kanser kök hücrelerin karakterizasyonuna yönelik bir araştırmayı kapsamaktadır.

Çalışmamızda 4 farklı hücre hattı ve 10 GBM hastasından elde edilen primer hücrelerinin kültürü yapıldı. Bu hücrelerdeki CD133+ kanser kök hücreleri MACS yöntemi ile ayrıldı ve ileriki analizler bu ayrıma göre yapıldı.

Bu tez çalışmasında kanser kök hücrelerinde ve kök hücre olmayan tümör hücrelerinde RT-PCR Array yöntemiyle kanser kök hücre, hücre yüzey belirteci ve sitokin reseptör panelleri uygulandı ve olası kanser kök hücre yüzey proteinlerinin mRNA düzeyindeki seviyeleri belirlendi. Ayrıca sağlıklı beyin dokularında aynı genler taranarak bu değerler kanser kök hücre (CD133+) ve olmayan (CD133-) hücrelerin değerleriyle kıyaslanarak istatistiksel anlamlı genler çıkarıldı. CD24, CD38, CSF1R1, CD28, IL13RA2, VCAM1, NOTCH1, LTBR genleri kanser kök hücrelere özgü genler belirlendi.

Kanser kök hücrelerinin, günümüz terapileri ile eliminasyonu mümkün olmadığından her ne kadar tümör hücreleri temizlense bile –kanser kök hücre teorisine göre kanser kök hücrelerinin tümör başlatabilme kapasitesinden dolayı- tümör rekürrensi gözlenmektedir. Bu sebeple GBM gibi kanserlerin tam olarak tedavisinin yapılabilmesi için kanser kök hücrelerin immunoterapi gibi doğrudan bu hücrelere spesifik tedavilerle hedeflenmesi gerekmektedir.

GBM kanser kök hücrelerini hedefleme tedavileri gün geçtikçe artmaktadır. Ancak literatürde GBM kanser kök hücrelerinin yüzey özelliklerini tanımlayan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının, GBM kanser kök hücrelerine özgü olan proteinleri belirlediğinden hedefleme tedavilerine kaynaklık edeceği düşünülmektedir.

Belirlenen kanser kök hücrelerinden CD24 proteini, CD133 GBM kanser kök hücre belirteci ile bereberlik oranlarına bakıldığında en yüksek olanıdır. Bu bulguya göre CD24 proteini, CD133 proteini gibi, yeni bir kanser kök hücre belirteci olarak kabul edilip ileri tedavi aşamalarında kanser kök hücreleri hedeflemede kullanılabilecektir. Bu tez çalışması ile GBM’de CD24+ CD133+ bir klon olduğu tespit edilmiştir.

Bir diğer önemli kanser kök hücre belirteci CD38’dir. Bu proteinin de yine CD133 kanser kök hücrelerde yüksek ifade olduğu ve GKH’ler için yeni ve önemli bir biyobelirteç olduğu bu çalışma ile saptanmıştır. CD24 ile birlikte belirlenen klon CD133+CD24+CD38+ olarak adlandırılmaktadır.

Farklı tip kanserlerde kök hücre belirteci olarak belirlenen CD44 proteini, GBM CD133+ hücre hattı ve primer hasta kültür hücrelerinde araştırılmış ve bu hücrelerde %100 oranında boyama gözlenmiştir. Bu sonuca göre CD44 proteininin tüm GBM hücrelerinde ifade olduğu saptanmış ve GBM hücreleri CD44^{yüksek} olarak belirtilmektedir. Dolayısıyla CD44’ün, GBM’de bir kök hücre belirteci değil, önemli bir GBM tümör belirteci olabileceği saptanmıştır.

Kanser kök hücrelerine özgü olduğu düşünülen diğer proteinler olan CSF1R1, CD28, IL13RA2, LTBR, MYH10, NKB1, VCAM1, NOTCH1, CD40L genleri hem transkriptomik hem de proteomik açıdan incelenmiş, bu proteinler CD133- hücrelerde yokken, CD133+ hücrelerinde normale kıyasla ifadelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu proteinlerden CSF1R1, CD28, IL13RA2, LTBR, MYH10, NKB1, CD40L genlerinin CD133+ hücrelerde varlığını gösteren literatürde hiçbir yayın bulunmamaktadır ve bu tez ile **ilk kez** tespit edilmiş olup yayınlanacaktır. NOTCH1 ve VCAM1 proteinlerinin bulguları ise literatür ile uyumlu bulunmuştur. Bunlardan CD40L’nın kanser kök hücrelerinde ölüm yolağını tetiklemede önemli olduğu vurgulanmıştır. CD28 ise kanser hücrelerinin immunoprotektif özelliklerini kaybetmeleri açısından önem arz etmektedir. NOTCH proteini, ligandı olan JAG1 ile birlikte GKH’lerde artmaktadır. Bu sinyal yolağının hedeflenmesi kök hücre tedavisi açısından önem taşımaktadır. LTBR’nin başlattığı sinyal yolağı ise anti-apoptotik

sinyalleme ile ilgili olduğundan iyi bir hedef olacaktır. CSF1R'üne karşı kullanılan inhibitörler GBM tedavisinde terapötik olarak denenmekte olup, GKH'lere spesifik çalışmaların gerekliliği halen bulunmaktadır. IL13RA2 ise GBM hücrelerinin ilaç direncinin kırılmasında ve immün sisteme açık hale gelmelerinde önemli bir hedef olacaktır.

Protein ifadeleri araştırılmak üzere seçilen diğer genler TIE2, MYH9, JAG1, PLAUR ve CD44'tür. Bu proteinler, CD133 pozitif ve negatif hücrelerde ifade olunurken, kat artışları anlamlı bulunduğundan seçilmiştir. Bunlardan CD44'ün önemi vurgulanmıştır. TIE2 geninin mRNA ifadesi ise CD133- hücrelerde 7 kat iken CD133+ hücrelerde 50 kattır. Bu artış yine bu proteini kanser kök hücreler için önemli bir hedef konumuna getirmektedir. Bu proteinin ifade farklılığına benzer şekilde MYH9 geni de yine hem CD133- hem de CD133+ hücreler için çok yüksek ifade edilmektedir. Ancak, CD133+ hücrelerde CD133- hücrelere nazaran yaklaşık 1,5 kat daha fazla ifade olmaktadır. Bu fark elbette ki kanser kök hücre hedeflemeleri açısından önem arz etmektedir. Benzer şekilde JAG1 ekspresyonu da CD133- hücrelerde bulunurken, CD133+ hücrelerde kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu proteinin reseptörü konumunda olan NOTCH1'in de GKH'lerde yüksek olması bu proteinin başlattığı sinyal yolağının GKH'lerde aktif olduğunu göstermektedir. PLAUR proteini de CD44 gibi hem CD133 pozitif hem de CD133 negatif hücrelerde önemli derecede artış göstermektedir. Ancak PLAUR geni, CD133+ hücrelerde daha fazla ifade olduğundan kanser kök hücreler için de önemli bir belirteç olarak kabul edilebilmektedir.

5.1. Öneriler

1. Bu tezde belirlenen genler hücre kültürü metodu ile büyütülen ve pasajı yapılan hücreler ile belirlenmiştir. Ancak organizma içi tümör mikroçevre faktörlerinin de protein ekspresyonunda etken olacağı düşünüldüğünden ileri hedefleme tedavilerine geçilmeden bu proteinlerin ekspresyon farklılıklarına organizma içinde de bakılması önerilmektedir.
2. Bu tezde belirlenen belirteçlerin kanser başlatma özelliklerinin in vivo çalışmalarda test edilmesi planlanmıştır.

3. Belirlenen belirteçlerin GBM’de TMZ’ye duyarlılıklarını ölçmek adına ilaç uygulamasının yapılmasından sonra bu proteinlerin test edilmesi planlanmaktadır.
4. Bu yüzey belirteçlerinin hücre içi yolaklarını hedefleyen inhibitörlerin kullanımı planlanmaktadır.
5. Bu belirteçlerin hücre içi yolaklarını hedefleyen küçük molekülerin sentezlenmesi düşünülmektedir.
6. Bu belirteçleri hedefleyen özellikle CD24 e karşı antikor sentezlenmesi planlanmaktadır.



ÖZET

Glioblastoma CD133 Kanser Kök Hücrelerinde Yeni Yüzey Belirteçlerinin Araştırılması

Glioblastoma multiforme (GBM) merkezi sinir sisteminin en sık rastlanan seviye IV tümörüdür. Her yıl ortalama 10,000 kişiye GBM teşhisi koyulmaktadır ve ortalama yaşam süresi maksimum 14.6 aydır.

GBM için günümüzde farklı tedaviler uygulanmaktadır. Radyoterapi olarak 2Gy olarak toplamda 60Gy radyasyon, kemoterapi olarak ise kan beyin bariyerini geçebilen TMZ verilmektedir. Ancak bu terapiler GKH'leri öldürmede yetersiz olduklarından kanser nüksü görülmektedir. Bir diğer tedavi seçeneği immunoterapi olarak adlandırılmakta ve organizmanın bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine karşı kullanılmasını hedeflemektedir. Ancak beyin immunojenitesi düşük bir organ olduğundan seçilen antijenin antikor bağlanma afinitesi yüksek olması gerekmektedir.

GKH'ler, sağlıklı kök hücre özellikleri olan kendini yenileme, farklılaşma oluşturabilme (diferensiyasyon) özelliklerine ek olarak tümör başlatabilme özellikleri de olan hücrelerdir. CD133 proteini prominin geninden sentezlenen bir GBM kanser kök hücre belirtecidir. Kanser kök hücrelerini hedeflemede daha özgün olmak adına CD133 ile birlikte yeni yüzey belirteçlerinin tanımlanması önem arz etmektedir. Tezin hedefi ise CD133 ile birlikte hedeflenebilecek yeni yüzey belirteçleri araştırmak ve kanser kök hücrelerin yüzey profilini tanımlamaktır.

Bu tezde öncelikle kanser kök hücreleri, CD133 proteine özgü antikor kullanılarak MACS yöntemi ile ayrılıp; RNA izolasyonunun ardından genlerin transkripsiyon düzeylerinin belirlenmesi amacı ile RT-PCR array uygulanmıştır. Kanser kök hücre proteinleri, hücre yüzey proteinleri ve sitokin reseptörlerini 88'er gen olarak toplamda 264 gen mRNA düzeyinde taranmış ve kat artışları kontrole oranla anlamlı olanlar tespit edilmiştir. Bunlardan en anlamlı 17 gen seçilmiş ve bu genlerin hücredeki ifadeleri akım sitometri analizi ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, bu genlerden özellikle CD24, CD38 kanser kök hücre yüzeyi için önemli birer belirteç olacağı belirlenmiştir. Belirlenen bu genler CD133+ kanser kök hücrelerinin yüzey özelliklerini belirlemede ve ileride kanser kök hücreleri hedefleme tedavilerinde kullanılmak üzere önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: GBM, CD133, GKH, kanser kök hücre

SUMMARY

Investigation of New Cell Surface Biomarkers in Glioblastoma CD133 Cancer Stem Cells

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequently observed stage IV brain tumor. Every year approximately 10,000 people newly diagnosed as GBM and their overall survival average is 14.6 months.

Nowadays, there are several therapies applied in GBM. One of them is radiotherapy and in a radiation dosage of 2Gy in each session applied for 60Gy in total. In another option, one is chemotherapy in which TMZ, an alkylating drug that can pass BBB is given. However, since those therapies are unable to diminish cancer stem cells, tumor recurrence is observed. Another option is immunotherapy in which it is aimed the attacking of self immune system of organism against tumor cells. However, since brain has the lowest immunogenicity, antigens targeted with this therapy have to have high binding affinity for the applied antibodies.

Glioma stem cells (GSC), in addition to healthy stem cell features that are self-renew and differentiation capacity, they also also have tumor formation feature. CD133 protein, transcribed from prominin gene, is a GSC cell surface marker. In order to target GSCs precisely, it is important to seek new cell surface markers to be able to use with CD133. The aim of this thesis is to investigate novel cancer stem cell surface markers which can be targeted along with CD133 and describe cancer stem cell surface profile.

In summary, cancer stem cells were separated from the tumor mass by using MACS system using the CD133 antibody. Then, following RNA isolation, RT-PCR array to determine transcription levels of the genes is performed. There are 88 genes in each panel applied which are characteristics for cancer stem cell, cell surface and chemokine/cytokine receptors (264 genes in total). Among them 17 genes that are statistically important were selected to confirm by proteomics using flow cytometry. Consequently, among these genes, especially CD24 and CD38, was defined novel significant cancer stem cell surface biomarkers in GBM. Defined genes are crucial to determine cell surface properties of CD133+ cancer stem cells and to apply future applications in targeting cancer stem cells.

Keywords: cancer stem cell, GBM, CD133, GSC

KAYNAKLAR

- ABDOUH, M, S FACCHINO, W CHATOO, V BALASINGAM, J FERREIRA. 2009. 'BMI1 Sustains Human Glioblastoma Multiforme Stem Cell Renewal', *Journal of Neuroscience*, **29**.28: 8884–96
- ACHYUT, B R, ADARSH SHANKAR, A S M ISKANDER, ROXAN ARA, KARTIK ANGARA, 2015. 'Bone Marrow Derived Myeloid Cells Orchestrate Antiangiogenic Resistance in Glioblastoma Through Coordinated Molecular Networks.', *Cancer Letters*, **369**.2 (Elsevier): 416–26
- ALAPATI, KIRANMAI, SREELATHA GOPINATH, RAMA RAO MALLA, VENKATA RAMESH DASARI, VE JASTI S RAO. 2012. 'uPARveCathepsin B Knockdown Inhibits Radiation-Induced PKC Integrated Integrin Signaling to the Cytoskeleton of Glioma-Initiating Cells.', *International Journal of Oncology*, **41**.2 (Spandidos Publications): 599–610
- ALTANER. 2008. 'GlioblastomaveStem cellsMinireview': **1–6**
- ANTONY-DEBRE, ILE ANA, DOMINIQUE BLUTEAU, RAPHAEL ITZYKSON, VE RONIQUE BACCINI, ALINE RENNEVILLE. 2012. 'MYH10 Protein Expression in Platelets as a Biomarker of': **1–5**
- BAO, S, Q WU, Z LI, S SATHORNSUMETEE, H WANG, VEOTHERS. 2008. 'Targeting Cancer Stem Cells Through L1CAM Suppresses Glioma Growth', *Cancer Research*, **68**.15: 6043–48
- BAYIN, NERMIN SUMRU. 2014. 'Glioblastoma Stem Cells: Molecular CharacteristicsveTherapeutic Implications', *World Journal of Stem Cells*, **6**.2: 230–10
- BEADLE, CHRISTOPHER, MARCELA C ASSANAH, PASCALE MONZO, RICHARD VALLEE, STEVEN S ROSENFELD 2008. 'The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain.', *Molecular Biology of the Cell*, **19**.8 (American Society for Cell Biology): 3357–68
- BECHILL, JOHN, VEWILLIAM J MULLER. 2014. 'Herpesvirus Entry Mediator (HVEM) Attenuates Signals Mediated by the Lymphotoxin B Receptor (LTβR) in Human Cells Stimulated by the Shared Ligand LIGHT.', *Molecular Immunology*, **62**.1: 96–103
- BENAYOUN, LIAT, VE YUVAL SHAKED. 2013. 'In Vitro Enrichment of Tumor-Initiating Cells From Human Established Cell Lines.', *Current Protocols in Stem Cell Biology*, Chapter 3 (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.): Unit3.7–3.7.15
- BHAT, KRISHNA P L, VEERAKUMAR BALASUBRAMANIYAN, BRIAN VAILLANT, RAVESANKER EZHILARASAN, KARLIJN HUMMELINK, 2013. 'Mesenchymal Differentiation Mediated by NF-κB Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma.',

- Cancer Cell*, **24.3** (Elsevier): 331–46 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>>
- BLACHER, ERAN, BAR BEN BARUCH, AYELET LEVY, NURIT GEVA, KEITH D GREEN, 2015. 'Inhibition of Glioma Progression by a Newly Discovered CD38 Inhibitor.', *International Journal of Cancer*, **136.6**: 1422–33
- BRADSHAW, AMY, AGADHA WICKREMSEKERA, SWEE T TAN, LIFENG PENG, PAUL F DAVIS, 2016. 'Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme.', *Frontiers in Surgery*, **3.8** (Frontiers): 21
- BRESCIA, PAOLA, BARBARA ORTENSIO, LORENZO FORNASARI, DANIEL LEVI, GIOVANNI BROGGI, 2013. 'CD133 Is Essential for Glioblastoma Stem Cell Maintenance.', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **31.5** (Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company): 857–69
- BROWN, DANIEL V, PAUL M DANIEL, GIOVANNA M DABACO, ANDREW GOGOS, WAYNE NG, 2015. 'Coexpression Analysis of CD133 ve CD44 Identifies Proneural ve Mesenchymal Subtypes of Glioblastoma Multiforme': **1–14**
- BUTOWSKI, NICHOLAS, HOWARD COLMAN, JOHN F DE GROOT, ANTONIO M OMURO, LAKSHMI NAYAK, 2016. 'Orally Administered Colony Stimulating Factor 1 Receptor Inhibitor PLX3397 in Recurrent Glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium Phase II Study.', *Neuro-Oncology*, **18.4** (Oxford University Press): 557–64
- CARTER, T, H SHAW, D COHN-BROWN, K CHESTER, VE P MULHOLLAND. 2016. 'Ipilimumab ve Bevacizumab in Glioblastoma.', *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, **0.0** (Elsevier)
- CHANMEE, THEERAWUT, PAWARED ONTONG, KOJI KIMATA, VE NAOKI ITANO. 2015. 'Key Roles of Hyaluronan ve Its CD44 Receptor in the Stemness ve Survival of Cancer Stem Cells', *Frontiers in Oncology*, **5.11**: 767–11
- CHO, DER-YANG, SHINN-ZONG LIN, WEN-KUANG YANG, HAN-CHUNG LEE, DEN-MEI HSU, 2013. 'Targeting Cancer Stem Cells for Treatment of Glioblastoma Multiforme', *Cell Transplantation*, **22.4**: 731–39
- CHOCKALINGAM, S, VE SIDDHARTHA SANKAR GHOSH. 2013. 'Amelioration of Cancer Stem Cells in Macrophage Colony Stimulating Factor-Expressing U87MG-Human Glioblastoma Upon 5-Fluorouracil Therapy', *PLoS ONE*, **8.12**, ed. by Rajesh Agarwal (Public Library of Science): e83877–79
- CHOI, JUNG KYOUNG, BYUNG HYUNE CHOI, YOON HA, HYEONSEON PARK, SEUNG HWAN YOON, 2007. 'Signal Transduction Pathways of GM-CSF in Neural Cell Lines', *Neuroscience Letters*, **420.3**: 217–22
- DE, I, M D STEFFEN, P A CLARK, C J PATROS, E SOKN, 2016. 'CSF1 Overexpression Promotes High-Grade Glioma Formation Without Impacting the Polarization Status of Glioma-Associated Microglia ve Macrophages', *Cancer Research*: **1–10**
- DENG, JIANPING, GUODONG GAO, LIANG WANG, TAO WANG, JIA YU, 2012. 'CD24 Expression as a Marker for Predicting Clinical Outcome in Human Gliomas.', *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012.4 (Hindawi Publishing Corporation):

517172–77

- DERYCKE, LARA, CHRISTOPHE STOVE, ANNE-SOPHIE VERCOUTTER-EDOUART, OLIVIER DE WEVER, LAURENT DOLLÉ, 2011. 'The Role of Non-Muscle Myosin IIA in Aggregation ve Invasion of Human MCF-7 Breast Cancer Cells.', *The International Journal of Developmental Biology*, **55.7-9** (UPV/EHU Press): 835–40
- DURISETI, SAI, DAVID H GOETZ, DANIEL R HOSTETTER, AARON M LEBEAU, YING WEI, 2010. 'Antagonistic Anti-Urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR) Antibodies Significantly Inhibit uPAR-Mediated Cellular Signaling ve Migration.', *The Journal of Biological Chemistry*, **285.35** (American Society for Biochemistry ve Molecular Biology): 26878–88
- DUZAGAC, FAHRIYE, SEVINC INAN, FATMA ELA SIMSEK, EDA ACIKGOZ, UMMU GUVEN, 2015. 'JAK/STAT Pathway Interacts with Intercellular Cell Adhesion Molecule (ICAM) ve Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) While Prostate Cancer Stem Cells Form Tumor Spheroids.', *Journal of B.U.on. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, **20.5**: 1250–57
- ELMETWALI, T, A SALMAN, VE D H PALMER. 2016. 'NORE1A Induction by Membrane-Bound CD40L (mCD40L) Contributes to CD40L-Induced Cell Death ve G1 Growth Arrest in P21-Mediated Mechanism.', *Cell Death ve Disease*, **7.3** (Nature Publishing Group): e2146
- FERNANDES, MÓNICA T, EMMANUEL DEJARDIN, VE NUNO R DOS SANTOS. 2016. 'Context-Dependent Roles for Lymphotoxin-B Receptor Signaling in Cancer Development.', *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1865.2**: 204–19
- FLEURENCE, JULIEN, DENIS COCHONNEAU, SOPHIE FOUGERAY, LISA OLIVER, FANNY GERALDO, 2016. 'Targeting ve Killing Glioblastoma with Monoclonal Antibody to': 1–14
- FREIBERGER, SANDRA N, PHIL F CHENG, GUERGANA IOTZOVA-WEISS, JOHANNES NEU, QINXIU LIU, 2015. 'Ingenol Mebutate Signals via PKC/MEK/ERK in Keratinocytes ve Induces Interleukin Decoy Receptors IL1R2 ve IL13RA2.', *Molecular Cancer Therapeutics*, **14.9** (American Association for Cancer Research): 2132–42
- GARNER, JO MEAGAN, MEIYUN FAN, CHUAN HE YANG, ZIYUN DU, MICHELLE SIMS, 2013. 'Constitutive Activation of Signal Transducer ve Activator of Transcription 3 (STAT3) ve Nuclear Factor κB Signaling in Glioblastoma Cancer Stem Cells Regulates the Notch Pathway.', *The Journal of Biological Chemistry*, **288.36** (American Society for Biochemistry ve Molecular Biology): 26167–76
- GILBERT, CANDACE A, VE ALONZO H ROSS. 2013. 'Glioma Stem Cells: Cell Culture, Markers ve Targets for New Combination Therapies': **1–27**
- GIROUARD, SASHA D, VE GEORGE F MURPHY. 2011. 'Melanoma Stem Cells: Not Rare, but Well Done', **91.5** (Nature Publishing Group): 647–64
- GUAN, HONGGENG, YANG LAN, YUQIU WAN, QIN WANG, CHENG WANG, 2016. 'PD-L1 Mediated the Differentiation of Tumor-Infiltrating CD19(+) B Lymphocytes ve T Cells in Invasive Breast Cancer.', *Oncoimmunology*, **5.2**: e1075112

- GUICHET, PIERRE-OLIVIER, SOPHIE GUELF, MARISA TEIGELL, LIESA HOPPE, NORBERT BAKALARA, 2015. 'Notch1 Stimulation Induces a Vascularization Switch with Pericyte-Like Cell Differentiation of Glioblastoma Stem Cells.', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **33.1**: 21–34
- HASSAN, GHADA S, JOHN STAGG, VE WALID MOURAD. 2015. 'Role of CD154 in Cancer Pathogenesis ve Immunotherapy.', *Cancer Treatment Reviews*, 41.5 (Elsevier): 431–40
- HERNÁNDEZ-PEDRO, NORMA Y, EDGAR RANGEL-LÓPEZ, GUSTAVO VARGAS FÉLIX, BENJAMÍN PINEDA, VE JULIO SOTELO. 2013. 'An Update in the Use of Antibodies to Treat Glioblastoma Multiforme.', *Autoimmune Diseases*, **2013.1** (Hindawi Publishing Corporation): 716813–14
- HOLLMÉN, MAIJA, SINEM KARAMAN, SIMON SCHWAGER, ANGELA LISIBACH, AILSA J CHRISTIANSEN, 2016. 'G-CSF Regulates Macrophage Phenotype ve Associates with Poor Overall Survival in Human Triple-Negative Breast Cancer.', *Oncoimmunology*, **5.3** (Taylor & Francis): e1115177
- HU, YI, PENG CHENG, YI-XUE XUE, VE YUN-HUI LIU. 2012. 'Glioma Cells Promote the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: a Possible Mechanism for Their Tropism Toward Gliomas.', *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, **48.1**: 127–35
- ISE, MIKIKO, KEIKO MATSUBAYASHI, HIDEKI TSUJIMURA, VE KYOYA KUMAGAI. 2016. 'Loss of CD38 Expression in Relapsed Refractory Multiple Myeloma', *Clinical Lymphoma Myeloma ve Leukemia*: **1–6**
- IWADATE, YASUO, TOMOO MATSUTANI, SEIICHIRO HIRONO, NATSUKI SHINOZAKI, VE NAKOKATSU SAEKI. 2016. 'Transforming Growth Factor-B ve Stem Cell Markers Are Highly Expressed Around Necrotic Areas in Glioblastoma.', *Journal of Neuro-Oncology* (Springer US): 1–7
- JUBB, ADRIAN M, LISA BROWNING, LETICIA CAMPO, HELEN TURLEY, GRAHAM STEERS, 2012. 'Expression of Vascular Notch Ligands Delta-Like 4 ve Jagged-1 in Glioblastoma.', *Histopathology*, **60.5** (Blackwell Publishing Ltd): 740–47
- KARAKASHEVA, TATIANA A, TODD J WALDRON, EVGENIY ERUSLANOV, SANG-BAE KIM, JU-SEOG LEE, 2015. 'CD38-Expressing Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Tumor Growth in a Murine Model of Esophageal Cancer.', *Cancer Research*, **75.19** (American Association for Cancer Research): 4074–85
- KASE, MARJU, AVE MINAJEVA, KRISTI NIINEPUU, SANDRA KASE, MARKUS VARDJA, 2015. 'Impact of CD133 Positive Stem Cell Proportion on Survival in Patients with Glioblastoma Multiforme', *Radiology ve Oncology*, **47.4**: 1–6
- KATONO, KEN, YUICHI SATO, SHI-XU JIANG, MAKOTO KOBAYASHI, RYO NAGASHIO, 2015. 'Prognostic Significance of MYH9 Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer.', *PLoS ONE*, **10.3**, ed. by John Souglakos (Public Library of Science): e0121460
- KEMPER, K, M R SPRICK, M DE BREE, A SCOPELLITI, L VERMEULEN, 2010. 'The AC133 Epitope, but Not the CD133 Protein, Is Lost Upon Cancer Stem Cell

- Differentiation', *Cancer Research*, **70.2**: 719–29 <<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1820>>
- KIM, JEONG SEON, JONATHAN M KURIE, VE YOUNG-HO AHN. 2015. 'BMP4 Depletion by miR-200 Inhibits Tumorigenesis ve Metastasis of Lung Adenocarcinoma Cells.', *Molecular Cancer*, **14.1** (BioMed Central): 173
- KIM, KYUBO, HYE SOOK MIN, EUI KYU CHIE, JIN-YOUNG JANG, SUN WHE KIM, 2013. 'CD24 Expression Predicts Distant Metastasis in Extrahepatic Bile Duct Cancer.', *World Journal of Gastroenterology*, **19.9**: 1438–43
- KRELL, DANIEL, MAWUELIKEM ASSOKU, MALCOLM GALLOWAY, PAUL MULHOLLAND, IAN TOMLINSON, 2011. 'Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH ve L2HGDH Mutations in Glioblastoma', *PLoS ONE*, **6.5**, ed. by Joseph Charles Glorioso: e19868–4
- KUPPNER, M C, M F HAMOU, VE N DE TRIBOLET. 1990. 'Activation ve Adhesion Molecule Expression on Lymphoid Infiltrates in Human Glioblastomas.', *Journal of Neuroimmunology*, **29.1-3**: 229–38
- LATHIA, JUSTIN D, JOSEPH GALLAGHER, JOHN M HEDDLESTON, JIALIANG WANG, CHRISTINE E EYLER, 2010. 'Integrin Alpha 6 Regulates Glioblastoma Stem Cells', *Cell Stem Cell*, **6.5**: 421–32
- LEVY, AYELET, ERAN BLACHER, HANANYA VAKNINE, FRANCES E LUND, REUVEN STEIN, 2012. 'CD38 Deficiency in the Tumor Microenvironment Attenuates Glioma Progression ve Modulates Features of Tumor-Associated Microglia/Macrophages.', *Neuro-Oncology*, **14.8** (Oxford University Press): 1037–49
- LI, DAWEI, PING WEI, ZHIHAI PENG, CHEN HUANG, HUAMEI TANG, 2013. 'The Critical Role of Dysregulated FOXM1-PLAUR Signaling in Human Colon Cancer Progression ve Metastasis.', *Clinical Cancer Research*, **19.1** (American Association for Cancer Research): 62–72
- LI, YANCHUN, JOCELYN C READER, XINRONG MA, NAMITA KUNDU, TYLER KOCHER, 2015. 'Divergent Roles of CXCR3 Isoforms in Promoting Cancer Stem-Like Cell Survival ve Metastasis.', *Breast Cancer Research ve Treatment*, **149.2**: 403–15
- LIU, C, D LUO, B A REYNOLDS, G MEHER, A R KATRITZKY, 2011. 'Chemokine Receptor CXCR3 Promotes Growth of Glioma', *Carcinogenesis*, **32.2**: 129–37
- LIU, DAN, VANESA MARTIN, JUAN FUEYO, OK-HEE LEE, JING XU, 2010. 'Tie2/TEK Modulates the Interaction of Glioma ve Brain Tumor Stem Cells with Endothelial Cells ve Promotes an Invasive Phenotype.', *Oncotarget*, **1.8**: 700–709
- LIU, GENTAO, XIANGPENG YUAN, ZHAOHUI ZENG, PATRIZIA TUNICI, HIUSHAN NG, 2006. '1476-4598-5-67.Fm', *Molecular Cancer*, **5.1**: 67–12
- LIU, H, Y-J WANG, L BIAN, Z-H FANG, Q-Y ZHANG, 2016. 'CD44+/CD24+ Cervical Cancer Cells Resist Radiotherapy ve Exhibit Properties of Cancer Stem Cells.', *European Review for Medical ve Pharmacological Sciences*, **20.9**: 1745–54

- LIU, MINGLI, KOICHI INOUE, TIANDONG LENG, SHANCHUN GUO, VE ZHI-GANG XIONG. 2014. 'TRPM7 Channels Regulate Glioma Stem Cell Through STAT3 ve Notch Signaling Pathways', *Cellular Signalling*, **26.12**: 2773–81
- LOUIS, DAVID N, ARIE PERRY, PETER BURGER, DAVID W ELLISON, GUIDO REIFENBERGER, 2014. 'International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification ve Grading', *Brain Pathology*, **24.5**: 429–35
- LOUIS, DAVID N, HIROKO OHGAKI, OTMAR D WIESTLER, WEBSTER K CAVENEE, PETER C BURGER, 2007. 'The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System', *Acta Neuropathologica*, **114.2**: 97–109
- LUBESSEDER-MARTELLATO, CLARA, ANA HIDALGO-SASTRE, CAROLIN HARTMANN, KATHARINA ALEXANDROW, ZAHRA KAMYABI-MOGHADDAM,. 2016. 'Membranous CD24 Drives the Epithelial Phenotype of Pancreatic Cancer': **1–13**
- LUKASHEV, MATVEY, DOREEN LEPAGE, CHERYL WILSON, VÉRONIQUE BAILLY, ELLEN GARBER, 2006. 'Targeting the Lymphotoxin-Beta Receptor with Agonist Antibodies as a Potential Cancer Therapy.', *Cancer Research*, **66.19** (American Association for Cancer Research): 9617–24
- MARIE, SUELY K N, OSWALDO K OKAMOTO, MIYUKI UNO, ANA PAULA G HASEGAWA, SUELI M OBA-SHINJO, 2007. 'Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase Transcript Abundance Correlates with Malignancy Grade in Human Astrocytomas', *International Journal of Cancer*, **122.4** (Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company): 807–15
- MARSH, TIMOTHY, IRENE WONG, JACLYN SCENEAY, AMEY BARAKAT, YUANBO QIN, 2016. 'Hematopoietic Age at Onset of Triple-Negative Breast Cancer Dictates Disease Aggressiveness ve Progression.', *Cancer Research*, **76.10** (American Association for Cancer Research): 2932–43
- MARU, SEEMA V, KAREN A HOLLOWAY, GERALDINE FLYNN, CHRISTINE L LANCASHIRE, A JANE LOUGHLIN,. 2008. 'Chemokine Production ve Chemokine Receptor Expression by Human Glioma Cells: Role of CXCL10 in Tumour Cell Proliferation.', *Journal of Neuroimmunology*, **199.1-2** (Elsevier): 35–45
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.029>>
- MILLAUER, BIRGIT, MICHAEL P LONGHI, KARL H PLATE, LAURA K SHAWVER, WERNER RISAU, 2006. 'Dominant-Negative Inhibition of Flk-1 Suppresses the Growth of Many Tumor Types in Vivo': **1–7**
- MOHANAM, SANJEEVA, NIRMALA CHANDRASEKAR, NIRANJAN YANAMANDRA, SIDDIQUE KHAWAR, FAIZ MIRZA,. 2002. 'Modulation of Invasive Properties of Human Glioblastoma Cells Stably Expressing Amino-Terminal Fragment of Urokinase-Type Plasminogen Activator': **1–7**
- MURRAY, MEGAN E, CATHERINE M GAVILE, JAYAKUMAR R NAIR, CHANDANA KOORELLA, LOUISE M CARLSON,. 2014. 'CD28-Mediated Pro-Survival Signaling Induces Chemotherapeutic Resistance in Multiple Myeloma.', *Blood*, **123.24** (American Society of Hematology): 3770–79

- NARAYANAPPA, RAJESWARI, PRITILATA ROUT, MADHURI G S AITHAL, VE ASHIS KUMAR CHAND. 2015. 'Aberrant Expression of Notch1, HES1, ve DTX1 Genes in Glioblastoma Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues.', *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology ve Medicine* (Springer Netherlands): **1–8**
- NOSRATI, ANAHITA, FARSHAD NAGHSHVAR, IRADJ MALEKI, VE FATEMEH SALEHI. 2016. 'Cancer Stem Cells CD133 ve CD24 in Colorectal Cancers in Northern Iran.', *Gastroenterology ve Hepatology From Bed to Bench*, **9.2** (Shahid Beheshti University of Medical Sciences): 132–39
- OHGAKI, H, VE P KLEIHUES. 2013. 'The Definition of Primary ve Secondary Glioblastoma', *Clinical Cancer Research*, **19.4**: 764–72
- PAPAGEORGIS, PANAGIOTIS, SAIT OZTURK, ARTHUR W LAMBERT, CHRISTIANA M NEOPHYTOU, ALEXANDROS TZATSOS, 2015. 'Targeting IL13Ralpha2 Activates STAT6-TP63 Pathway to Suppress Breast Cancer Lung Metastasis', *Breast Cancer Research* (Breast Cancer Research): **1–15**
- PATEL, MIRA A, VE DREW M PARDOLL. 2015. 'Concepts of Immunotherapy for Glioma.', *Journal of Neuro-Oncology*, **123.3** (Springer US): 323–30
- PEI, ZHEN, GUANGCHAO ZHU, XIAOLEI HUO, LU GAO, SHAN LIAO,. 2016. 'CD24 Promotes the Proliferation ve Inhibits the Apoptosis of Cervical Cancer Cells in Vitro.', *Oncology Reports*, **35.3** (Spandidos Publications): 1593–1601 <<http://dx.doi.org/10.3892/or.2015.4521>>
- POINTER, KELLI B, PAUL A CLARK, MICHAEL ZORNIK, BAHAUDDEEN M ALRFAEI, VE JOHN S KUO. 2014. 'Glioblastoma Cancer Stem Cells: Biomarker ve Therapeutic Advances', *Neurochemistry International*, **71**: 1–7
- PONNURANGAM, SIVAPRIYA, PRASAD R DANDAWATE, ANIMESH DHAR, OSSAMA W TAWFIK, RAJASHRI R PARAB, 2016. 'Quinomycin a Targets Notch Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Stem Cells.', *Oncotarget*, **7.3** (Impact Journals): 3217–32
- PORET, NICOLAS, QIANGWEI FU, SOIZIC GUIHARD, MEYLING CHEOK, KATIE MILLER, 2015. 'CD38 in Hairy Cell Leukemia Is a Marker of Poor Prognosis ve a New Target for Therapy.', *Cancer Research*, **75.18** (American Association for Cancer Research): 3902–11
- PROKOPI, MARIANNA, CHRISTINA A KOUSPAROU, VE AGAMEMNON A EPIKETOS. 2014. 'The Secret Role of microRNAs in Cancer Stem Cell Development ve Potential Therapy: a Notch-Pathway Approach.', *Frontiers in Oncology*, 4.Suppl 1 (Frontiers): **389**
- PU, YI, SHOUWEI LI, CHUANBAO ZHANG, ZHAOSHI BAO, ZHENGXIANG YANG, 2015. 'High Expression of CXCR3 Is an Independent Prognostic Factor in Glioblastoma Patients That Promotes an Invasive Phenotype.', *Journal of Neuro-Oncology*, **122.1** (Springer US): 43–51
- PULIYAPPADAMBA, VINESHKUMAR THIDIL, KIMMO J HATANPAA,

- SHARMISTHA CHAKRABORTY, VE AMYN A HABIB. 2014. 'The Role of NF- κ B in the Pathogenesis of Glioma', *Molecular & Cellular Oncology*, **1.3**: e963478–79
- PYONTECK, STEPHANIE M, LEILA AKKARI, ALBERTO J SCHUHMACHER, ROBERT L BOWMAN, LISA SEVENICH, 2013. 'CSF-1R Inhibition Alters Macrophage Polarization ve Blocks Glioma Progression.', *Nature Medicine*, **19.10**: 1264–72
- QIU, XIAN-XIN, CHEN-HONG WANG, NA YOU, BI-JUAN CHEN, XING-FU WANG, 2015. 'High Jagged1 Expression Is Associated with Poor Outcome in Primary Glioblastoma.', *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, **32.1**: 341
- QUAIL, DANIELA F, ROBERT L BOWMAN, LEILA AKKARI, MARSHA L QUICK, ALBERTO J SCHUHMACHER, 2016. 'The Tumor Microenvironment Underlies Acquired Resistance to CSF-1R Inhibition in Gliomas.', *Science (New York, N.Y.)*, **352.6288** (American Association for the Advancement of Science): aad3018–18
- RAZAVI, SEYED-MOSTAFA, KAREN E LEE, BENJAMIN E JIN, PARVIR S AUJLA, SHARAREH GHOLAMIN, 2016. 'Immune Evasion Strategies of Glioblastoma', *Frontiers in Surgery*, **3.32**: 796856–59
- RESTREPO, ANDRES, CHRISTIAN A SMITH, SAMEER AGNIHOTRI, MARYAM SHEKARFOROUSH, PAUL N KONGKHAM, 2011. 'Epigenetic Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein by DNA Methylation in Human Malignant Gliomas.', *Neuro-Oncology*, **13.1** (Oxford University Press): 42–50
- ROBINSON, TYLER J W, MELODY PAI, JEFF C LIU, FREDERICK VIZEACOMAR, THOMAS SUN,. 2013. 'High-Throughput Screen Identifies Disulfiram as a Potential Therapeutic for Triple-Negative Breast Cancer Cells: Interaction with IQ Motif-Containing Factors.', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **12.18** (Taylor & Francis): 3013–24
- RUSTAMZADEH, EDWARD, WALTER A HALL, DEBORAH A TODHUNTER, VINCENT D VALLERA, WALTER C LOW, 2007. 'Intracranial Therapy of Glioblastoma with the Fusion Protein DTAT in Immunodeficient Mice.', *International Journal of Cancer*, **120.2** (Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company): 411–19
- SAFA, AHMAD R, MOHAMMAD REZA SAADATZADEH, AARON A COHEN-GADOL, KAREN E POLLOK, VE KHADIJEH BIJANGI-VISHEHSARAEI. 2016. 'Emerging Targets for Glioblastoma Stem Cell Therapy', *Journal of Biomedical Research*, **30.1**: 19–31
- SAITO, NORIHIKO, KAZUYA AOKI, NOZOMI HIRAI, SATOSHI FUJITA, JUNYA IWAMA, 2015. 'Effect of Notch Expression in Glioma Stem Cells on Therapeutic Response to Chemo-Radiotherapy in Recurrent Glioblastoma.', *Brain Tumor Pathology*, **32.3**: 176–83
- SAKA, MAKOTO, TAKAYUKI AMANO, KOJI KAJIWARA, KOICHI YOSHIKAWA, MAKOTO IDEGUCHI, 2010. 'Vaccine Therapy with Dendritic Cells Transfected with Il13ra2 mRNA for Glioma in Mice.', *Journal of Neurosurgery*, **113.2** (American Association of Neurological Surgeons): 270–79

- SALARIA, SAFIA, ANNA MEANS, FRANK REVETTA, KAMRAN IDREES, ERIC LIU,. 2015. 'Expression of CD24, a Stem Cell Marker, in Pancreatic ve Small Intestinal Neuroendocrine Tumors.', *American Journal of Clinical Pathology*, **144.4** (The Oxford University Press): 642–48
- SANTONI, MATTEO, LUCIANO BURATTINI, MASSIMO NABISSI, MARIA BEATRICE MORELLI, ROSSANA BERARDI, 2013. 'Essential Role of Gli Proteins in Glioblastoma Multiforme.', *Current Protein & Peptide Science*, **14.2**: 133–40
- SAUV, CLAIRE MARIE-ELISABETH, JESSICA LEIGH WEATHERBEE, SANTOSH KESARI, JESSICA BARNES, SUSAN ELIZABETH WINTERS,. 2009. 'Efficacy of the HSP90 Inhibitor 17-AAGin Human Glioma Cell Lines ve Tumorigenic Glioma Stem Cells': 1–13
- SCARZELLO, ANTHONY J, QUN JIANG, TIMOTHY BACK, HIEN DANG, DEBORAH HODGE, . 2015. 'LT β R Signalling Preferentially Accelerates Oncogenic AKT-Initiated Liver Tumours.', *Gut* (BMJ Publishing Group Ltd ve British Society of Gastroenterology): gutjnl–2014–**308810**
- SHIBASAKI, NOBORU, TOSHINARI YAMASAKI, TORU KANNO, RYUICHIRO ARAKAKI, HIROMASA SAKAMOTO, . 2015. 'Role of IL13RA2 in Sunitinib Resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.', *PLoS ONE*, **10.6**, ed. by Soumitro Pal (Public Library of Science): e0130980
- SOLIMAN, HATEM, MELANIE MEDIAVILLA-VARELA, VE SCOTT J ANTONIA. 2015. 'A GM-CSF ve CD40L Bystander Vaccine Is Effective in a Murine Breast Cancer Model.', *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, **7** (Dove Press): 389–97
- STOPSCHINSKI, BARBARA E, CHRISTOPH P BEIER, VE DAGMAR BEIER. 2013. 'Glioblastoma Cancer Stem Cells Â€“ From Concept to Clinical Application', *Cancer Letters*, **338.1** (Elsevier Ireland Ltd): 32–40
- TANAKA, SHINGO, MITSUTOSHI NAKADA, DAISUKE YAMADA, ICHIRO NAKANO, TOMOKI TODO, . 2014. 'Strong Therapeutic Potential of Γ -Secretase Inhibitor MRK003 for CD44-High ve CD133-Low Glioblastoma Initiating Cells', *Journal of Neuro-Oncology*, **121.2** (Springer US): 239–50
- TANAKA, TOMOHITO, YOSHITO TERA, YUHEI KOGATA, KEISUKE ASHIHARA, KAZUYA MAEDA, . 2015. 'CD24 Expression as a Marker for Predicting Clinical Outcome ve Invasive Activity in Uterine Cervical Cancer.', *Oncology Reports*, **34.5** (Spandidos Publications): 2282–88
- THOMAS, ALISSA A, MARC S ERNSTOFF, VE CAMILO E FADUL. 2012. 'Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma', *The Cancer Journal*, **18.1**: 59–68
- TONG, A W, M H PAPAYOTI, G NETTO, D T ARMSTRONG, G ORDONEZ, . 2001. 'Growth-Inhibitory Effects of CD40 Ligand (CD154) ve Its Endogenous Expression in Human Breast Cancer.', *Clinical Cancer Research*, **7.3**: 691–703
- VIGNESWARAN, KRISHANTHAN, STEWART NEILL, VE COSTAS G HADJIPANAYIS. 2015. 'Beyond the World Health Organization Grading of Infiltrating Gliomas: Advances in the Molecular Genetics of Glioma Classification':

1-13

- WALKER, PAUL R, VE DENIS MIGLIORINI. 2015. 'The CD40/CD40L Axis in Glioma Progression ve Therapy.', *Neuro-Oncology*, **17.11** (Oxford University Press): 1428–30
- WANG, JIANPENG, CHAO WANG, QINGHAI MENG, SHIFANG LI, XIAOPENG SUN, . 2012. 'siRNA Targeting Notch-1 Decreases Glioma Stem Cell Proliferation ve Tumor Growth.', *Molecular Biology Reports*, **39.3** (Springer Netherlands): 2497–2503
- WANG, LI-NA, ZI-JIAN LI, YA-MING XI, CHE CHEN, TING MA, . 2015. '[Effect of Emodin Combined with AZT on the Proliferation ve the Expression of BCL-2, NF- κ B, TGF-B in the Leukemia Stem Cells-KG-1a Cells].', *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi / Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui = Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, **23.5**: 1265–71
- XU, HAINENG, JIASHENG MU, JING XIAO, XIANGSONG WU, MAOLAN LI, . 2016. 'CD24 Negative Lung Cancer Cells, Possessing Partial Cancer Stem Cell Properties, Cannot Be Considered as Cancer Stem Cells.', *American Journal of Cancer Research*, **6.1** (e-Century Publishing Corporation): 51–60
- YANG, CHUN-HUNG, HUI-LING WANG, YI-SHENG LIN, K P SHRAVAN KUMAR, HUNG-CHI LIN, . 2014. 'Identification of CD24 as a Cancer Stem Cell Marker in Human Nasopharyngeal Carcinoma', *PLoS ONE*, **9.6**, ed. by Masaharu Seno (Public Library of Science): e99412–14
- YANG, TIAN-QUAN, XIAO-JUN LU, TING-FENG WU, DA-DONG DING, ZHAO-HUI ZHAO, . 2014. 'MicroRNA-16 Inhibits Glioma Cell Growth ve Invasion Through Suppression of BCL2 ve the Nuclear Factor- κ B1/MMP9 Signaling Pathway', *Cancer Science*, **105.3**: 265–71
- ZAGZAG, D, A HOOPER, D R FRIEDLANDER, W CHAN, J HOLASH, . 1999. 'In Situ Expression of Angiopoietins in Astrocytomas Identifies Angiopoietin-2 as an Early Marker of Tumor Angiogenesis.', *Experimental Neurology*, **159.2**: 391–400
- ZARNESCU, OTILIA, FELIX MIRCEA BREHAR, CORALIA BLEOTU, VE RADU MIRCEA GORGAN. 2011. 'Co-Localization of PCNA, VCAM-1 ve Caspase-3 with Nestin in Xenografts Derived From Human Anaplastic Astrocytoma ve Glioblastoma Multiforme Tumor Spheres.', *Micron (Oxford, England : 1993)*, **42.8**: 793–800
- ZHANG, HAN, ZHENG CHEN, SATTVA S NEELAPU, JORGE ROMAGUERA, VE NAMI MCCARTY. 2016. 'Hedgehog Inhibitors Selectively Target Cell Migration ve Adhesion of Mantle Cell Lymphoma in Bone Marrow Microenvironment.', *Oncotarget*, **7.12** (Impact Journals): 14350–65
- ZHANG, KAI-LIANG, LEI HAN, LU-YUE CHEN, ZHEN-DONG SHI, MING YANG, . 2014. 'Blockage of a miR-21/EGFR Regulatory Feedback Loop Augments Anti-EGFR Therapy in Glioblastomas.', *Cancer Letters*, **342.1** (Elsevier): 139–49
- ZHENG, YANHUA, WEIWEI YANG, KENNETH ALDAPE, JIE HE, VE ZHIMIN LU. 2013. 'Epidermal Growth Factor (EGF)-Enhanced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Expression Promotes Macrophage ve Glioblastoma Cell Interaction ve Tumor Cell Invasion.', *The Journal of Biological Chemistry*, **288.44** (American Society for Biochemistry ve Molecular Biology): 31488–95

ZHU, THANT S, MARK A COSTELLO, CAROLINE E TALSMA, CALLIE G FLACK, JESSICA G CROWLEY, . 2011. 'Endothelial Cells Create a Stem Cell Niche in Glioblastoma by Providing NOTCH Ligands That Nurture Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells.', *Cancer Research*, **71.18** (American Association for Cancer Research): 6061–72

ZHU, YUAN, VE LUIS F PARADA. 2002. 'The Molecular ve Genetic Basis of Neurological Tumours.', *Nature Reviews. Cancer*, **2.8**: 616–26



ÖZGEÇMİŞ

MERVE GÜLSEN BAL

Adres: Aşıyan sk. 3/4 kavacık subayevleri/ 06130/

KeçiörenAnkara

Telefon numarası: +90 537 9847204

Email: bal@ug.bilkent.edu.tr



BİREYSEL

Doğum Günü: 15.01.1991

Doğum yeri: Ankara/ TÜRKİYE

Uyruğu: T.C.

Cinsiyet: Bayan

EĞİTİM

2014-2016, Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı

CGPA:3.80/4.00

2009-2014 Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü

CGPA:3.08/4.00

2005-2009 Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi

Lise Mezuniyet Ortalaması: 90/100

BECERİLER

•Laboratuvar Teknikleri

Teorik olarak

PCR, Agarose Gel Electrophoresis for DNA&RNA, Tissue staining methods (Haematoxyline ve Eosin Technique), Chromosome staining methods (Acetoorcein), Quantification of protein from cultured cells (Bradford Protein Assay),

Tissue ve organ dissection from rats, Several animal experiments with C.elegans and Drosophila melanogaster, Cell culture, Quantification of proteins ve nucleic acids with Nanodrop, RT-PCR, DNA Isolation from parafinized tissue, synthesis of cDNA, RNA isolation from tissues, DNA isolation from blood samples, Approaches to genetic analysis based on PCR ve Primers, basic microbiological methods.

Pratik olarak

PCR, Western Blot, SDS Page, Agarose Gel Electrophoresis, Bradford Protein Assay, DNA Isolation, Quantification of proteins ve nucleic acids with Nanodrop, dark room protein observation, wet transfer of the proteins, cDNA synthesis , Invasion Assay, Cell Counting, Cell Seeding, SiRNA Transfection., Microarray, RT PCR, MACS, FACS, Confocal Microscopy

•Bilgisayar ve Hesaplama Becerisi

Matlab& Java Programming,

Microsoft Office

Adobe CC illüstratör

SPSS, Prism Statistics

•Dil

İngilizce (akıcı), Almanca (başlangıç), Türkçe (anadil)

Ders Kapsamı

Biology I&II, Genetics, Principles of Chemistry I&II, Calculus I-II, General Physics I-II,

English ve Composition I&II, Introduction to Computing in Engineering ve Science I, Statistical Methodology, Cultures Civilizations ve Ideas (Humanity) I & II, Molecular Biology of Cell I & II, Biochemistry I & II, Molecular Biology of Gene, Microbiology, Introduction to Bioinformatics, Physiology, Science ve Ethics, Translation I(English to Turkish)

Deneyim

2011 Ocak-Şubat Ara Tatil Stajı: Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi/Tıbbi Genetik Bölümü

2011 Temmuz Ağustos Yaz Stajı; Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarla Bitkileri Bölümü; GDO Laboratuvarı, ANKARA

2012 Haziran-Temmuz Yaz Stajı: Seoul National Üniversitesi,Kanser Araştırma Merkezi, Meme Kanseri Bölümü

KATILDIĞI SEMİNER VE KONUŞMALAR

2010 “Switches ve Latches: Getting In ve Out of Mitosis”adlı konuşma, Nobel Ödüllü Prof. Dr. Tim Hunt, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Turkey

2010 3th Horizontals in Genetics, Bilkent Üniversitesi Turkey

2014 IFCC at İstanbul

2014 Nobel Ödüllü Prof. Dr. Aziz Sancar Konuşması Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye

SERTİFİKALAR

İncekaralar seminer-02.11.2013

Abcam ELISA & CHIP seminer-13.05.2015

XI.Ankara Biyoteknoloji günleri Days-20-21 May 2015

IX. Uluslararası Anadolu Adli Bilimler Kongresi-18.12.2015

II. International Symposium on Clinal ve Basic Investigation on Glioblastoma, Spain-09.10.2015

Experimental Biology 2016 □ San Diego Convention Center, San Diego, California
2-6 April, 2016

POSTERLER

II. International Symposium on Clinal ve Basic Investigation on Glioblastoma, Spain

Sunguroglu A¹, Akcora Yildiz D^{1,2}, Yukselten Y¹, **Bal M.G¹**, Bunsuz M¹, Demircan K³, ve Ugur H.C⁴.

“Flow Cytometry Assessment Of Anti-Cd13 Antibodies In
Human Glioblastoma Multiforme Cells”

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

Merve Gulsen Bal¹, Yunus Yukselten¹, Seyma Ozkanca¹, Esra Akguⁿ², Hasan Caglar Ugur³, Asuman Sunguroglu¹.

“Status of INSR, LRP1 ve VCL transcripts on CD133+
Glioblastoma Multiforme Stem Cells”

Seyma Ozkanca¹, **Merve Gulsen Bal¹**, Yunus Yukselten¹, Dilara Akcora Yildiz³,
Hasan Caglar Ugur², Kadir Demircan⁴, Asuman Sunguroglu

“PRKCA, PTPN1 ve ZYX Are Possible Markers to Target
CD133+ GBM Stem Cells”

Asuman Sunguroglu¹, Merve Bunsuz¹, Yunus Yukselten¹, **Merve Gulsen Bal¹**,
Seyma Ozkanca¹, Dilara Akcora Yildiz³, Kadir Demircan⁴, Hasan Caglar Ugur².

“PXN ve TRIO are elevated in CD133+GSCs
transcriptomically”

Yunus Yukselten¹, **Merve Gulsen Bal¹**, Seyma Ozkanca¹, Dilara Akcora Yildiz³,
Merve Bunsuz¹, Hasan Caglar Ugur², Asuman Sunguroglu¹.

“The Role of BCAR1 ve FYN on CD133+ GBM stem cells”

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

Sena E. Aydos¹, Yunus Yukselten¹, **Merve Gulsen Bal**,²İşıl Yükselen³, Kaan Aydos⁴,
 Asuman Sunguroglu¹

“Analyzing the differences between Sertoli cells obtained from
 Nonobstructive Azoospermia ve Obstructive Azoospermia
 patients for mitochondrial numbers ve metabolic pathways”

Sunguroglu Asuman¹, **Bal Merve Gulsen**², Yukselten Yunus¹, Ozkanca Seyma¹,
 Yukselen Isıl³

“Glycolytic Energy Metabolism In Glioblastoma Cancer Stem
 Cells”

KATILDIĞI PROJELER

TUBİTAK 1003: Glioblastoma Multiforme (GBM) İlaç Direncinde Rol Oynayan
 CD133+ Glioblastoma Kök Hücrelerini (GKH) Hedefleyen Terapötik Monoklonal
 Antikor Geliştirilmesi

TUBİTAK 1001: GBM CD133+ kök hücrelerinin miRNA profilleri çıkartılarak ilaç
 direncini azaltmak

TUBİTAK 3001:Endometriosis Patofizyolojisinde Extrasellüler Matrix Proteinleri
 Ve Apoptozis İle İlgili Moleküler Belirteçlerin Saptanması

Araştırmada İlgi Alanları

Kök hücre yaşlanma, immunoloji, kanser (Breast Cancerhücre biyolojisi, Cell
 Signaling, Neurobiology, Biochemistry, developmental biology, microbiology,
 Chromosomal Disorders

REFERANSLAR

Prof.Dr.Asuman Sunguroğlu	Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı asungur@medicine.ankara.edu.tr
Yard.Doç.Dr. Özgür Şahin	Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi sahinozgur@gmail.com
Yard.Doç.Dr. Dilara Akcora Yıldız	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Öğretim Üyesi akcoradilara@yahoo.com