



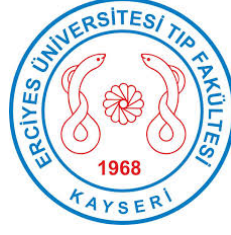
T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

**IDH MUTANT OLMAYAN GLİOBLASTOMA'DA LC3
GENİN INTEGRİN β 1/FAK/SRC YOLAĞI ÜZERİNDEN
OTOFAJİYE VE U87 GBM HÜCRE HATTINDA HÜCRE
DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Ökkeş Celil GÖKÇEK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2020



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**IDH MUTANT OLMAYAN GLİOBLASTOMA'DA LC3
GENİN INTEGRİN β 1/FAK/SRC YOLAĞI ÜZERİNDEN
OTOFAJİYE VE U87 GBM HÜCRE HATTINDA HÜCRE
DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Ökkeş Celil GÖKÇEK

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2019-9774 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2020

TEŞEKKÜR

Bu tezin kurgulanmasında, uzmanlık tezi olarak bana verilmesinde ve bu bağlamda vizyon olarak bana katkıda bulunan tez danışmanım ve aynı zamanda da bir ağabey kadar yakın olan değerli hocam Doktor Öğretim Üyesi Halil Ulutabanca'ya,

Tez çalışması boyunca tüm bilgi, tecrübe ve iyi niyeti ile her zaman yanımda olan ve yol gösteren Doç. Dr. Zühal Hamurcu hocama, Doktora Öğrencisi Nursultan Nurdinov'a ve değerli GEN-KÖK ekibine;

2015 yılında büyük bir hevesle başladığım nöroşirürji maceramda bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Selçuklu, Prof. Dr. Suat Öktem, Prof. Dr. Ali Kurtsoy, Prof. Dr. Kemal Koç, Doç. Dr. Ahmet Küçük'e;

Gece gündüz demeden birlikte çalıştığımız asistan hekim, hemşire, teknisyen, hasta bakıcı ve tüm yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma,

Asistanlık sürecinde çoğu zaman nöbetlerden, yoğunluktan dolayı beni göremeyen, buna rağmen tek bir gün dahi yüzünü ekşitmeden bana destek olan, düştüğüm zaman elimden tutup kaldıran ve varlığı ile her şeyi daha güzel kılan çok değerli Yol Arkadaşım, Eşim Gözde Hanım ve biricik kızım Elif Zeynep'e,

Hayır dualarını üzerimden bir gün dahi olsa eksik etmeyen Annem, Babam'a,

Nihayetsiz teşekkürlerimi sunarım...

Ö. Celil Gökçek

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri	3
2.1.1. Piloitik Astrositomlar	4
2.1.2. Pleomorfik Ksantroastrositom	4
2.1.3. Diffüz Düşük Dereceli Astrositomlar	4
2.1.4. Anaplastik Astrositom	4
2.1.5. Glioblastoma	4
2.1.6. Oligodendrogliom	4
2.1.7. Ependimomlar	5
2.2. Glioblastoma (GBM)	5
2.2.1. Epidemiyoloji	6
2.2.2. Moleküler Patogenez ve Genom	7
2.2.2.1. Glioblastoma'da Genetik Hedefler	8
2.2.2.1.1 Epidermal büyüme faktörü reseptörü	8
2.2.2.1.2. İzositrat Dehidrogenaz	9
2.2.2.1.3. Poli-ADP-riboz polimeraz 1 (PARP1)	9
2.2.2.1.4. TERT-promoter mutasyonları, ATRX mutasyonları	10
2.2.2.1.5. Notch sinyal iletim yolağı	10
2.2.2.1.6. PTEN	11

2.2.2.1.7. AXL	11
2.2.2.1.8. Retinoblastoma Gen Yolağı	11
2.2.3. Patoloji	12
2.2.4. SSS tümör sınıflandırması	13
2.2.5. Glioblastoma'da Klinik Bulgular	16
2.2.6. Glioblastoma Tedavisi	18
2.2.6.1. Cerrahi Tedavi	18
2.2.6.2. Medikal Tedavi (Kemoterapi)	19
2.2.6.2.1. Temozolamid	20
2.2.6.3. Radyoterapi	21
2.2.6.4. siRNA Temelli Gen Susturma Tedavisi	22
2.2.6.4.1. Küçük interferans RNA'lar (siRNA)	22
2.3. Otofaji	24
2.3.1. Otofaji ve kanser ilişkisi	27
2.3.1.1. Otofajinin Fonksiyonu	27
2.3.1.2. Otofaji ve Kanser Arasındaki İlişki	28
2.4. Sunulan Tez Çalışmasında Hedef Alınan LC3 Geni	29
3. YÖNTEM VE GEREÇLER	30
3.1. Gereçler	30
3.2. Yöntem	33
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
4.1. LC3-siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87 MG hücrelerinin çoğalmasına/canlılığına etkisi	41
4.2. LC3-siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87 MG GBM hücrelerinin klon oluşturma üzerine etikleri	43
4.3. LC3-siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87MG hücrelerinin migrasyon özelliğine etkisi	44

4.5. siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87MG hücrelerinde otofajik vezikül oluşumuna etkisi.....	46
4.6. LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin canlılığına etkisi.....	46
4.7. LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin klon oluşturma özelliğine etkisi.....	48
4.8. LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin klon oluşturma özelliğine etkisi.....	49
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR.....	56
KAYNAKLAR.....	57
ONAY.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
2-HG	: 2-Hydroxyglutarat
BER	: Base Excision Repair
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
C°	: Santigrat Derece
CNS (MSS)	: Central Nervous System (Merkezi Sinir Sistemi)
Da	: Dalton
DMEM/F-12	: Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium/F-12
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dsRNA	: Double-stranded RNA
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal Growth Factor Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Food and Drug Administration
GBM	: Glioblastoma multiforme
Gy	: Gray
IC50	: İnhibitör konsantrasyon 50 (%50)
ICP	: Kafa içi basıncı
IDH 1 ve 2	: İzositrat dehidrogenaz enzim 1 ve 2
ISN	: International Society of Neuropathology
kDa	: Kilodalton
KPS	: Karnofsky Performans Statüsü
LC3	: Light Chain 3
MGMT	: Methylguanine-DNA methyltransferase
ml	: Mililitre
MMR	: Mismatch Repair

mRNA	: Mesajcı RNA
MTS	: Methods for Testing and Specification
NADP⁺	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
NEC	: Not Elsewhere Classified
NOS	: Not Otherwise Specified
nt	: Nükleotit
NT	: Non-treatment
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tuz tamponu)
pH	: Power of hydrogen
PMS	: Fenazin metosülfat
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
RB	: Retinoblastoma
RISC	: RNA-induced silencing complex
RNAi	: RNA interference
SD	: Standart Deviation (Standart sapma)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
siRNA	: Small İnterfering RNA
TERT	: Telomerase Reverse Transcriptase
ULK	: Unc-51-Like Kinase
UTR	: Untranslated Region
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
WHO (DSÖ)	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
α-KG	: Alpha- ketoglutarate
μl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Otofaji işlevinde görev alan proteinler	25
Şekil 2.	Otofaji basamaklarının şematik diyagramı	26
Şekil 3.	Thoma lamının sayım yapılan kareleri (Toplam görüş sahası)	35
Şekil 4.	İki farklı siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 proteinin ekspresyon seviyesi	41
Şekil 5.	72 saat LC3 siRNA ile transfekte edilmiş U-87MG hücrelerinde proliferasyon oranı	42
Şekil 6.	Kontrol siRNA ve iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen U-87MG hücrelerinde koloni oluşum oranı	43
Şekil 7.	72 saat siRNA ile transfekte edilmiş U-87MG hücrelerinde migrasyon oranı.....	44
Şekil 8.	Kontrol siRNA ve iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen U-87MG hücrelerinde hücre çoğalması ve migrasyonda görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri.....	45
Şekil 9.	Kontrol siRNA ve iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen U-87MG hücrelerinde asidik vezikül oluşumları	46
Şekil 10.	Artan TMZ konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi.....	47
Şekil 11.	TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi.....	47
Şekil 12.	TMZ ve siRNA kombinasyonunun otofajik vezikül oluşumuna etkisi.....	48
Şekil 13.	TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücrelerde klon oluşumuna etkisi.....	49
Şekil 14.	TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücrelerde klon oluşumuna etkisi.....	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. 2016 DSÖ SSS Glial Tümörler Sınıflaması	14
Tablo 2. Faz aşamasında olan siRNA temelli ilaçlar	23



IDH MUTANT OLMAYAN GLİOBLASTOMA'DA LC3 GENİNİN INTEGRİN β1/FAK/SRC YOLAĞI ÜZERİNDEN OTOFAJİYE VE U87 GBM HÜCRE HATTINDA HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Glioblastoma (glioblastoma multiform, GBM) insanlarda en sık görülen beyin tümörüdür. Kötü prognozlu tümör olmasının yanısıra moleküler patojenezi hala aydınlatılamamıştır. GBM primer (%80) ve sekonder GBM (%20) olarak iki tipe ayrılır.

GBM morfolojik heterojenite içeren yüksek selülarite, nükleer atipi, artmış anjiogenez ve mitotik aktiviteye sahip tümördür. GBM tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoteropatik tedavi yöntemleri kullanılsa da hastalarda sağ kalım süresi çok düşüktür. Ortalama yaşam ömrü 12-15 aydır [1, 2]. Bu nedenle, tanı, prognoz ve tedavi açısından GBM patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılması ve bu mekanizmaları hedefleyen terapilerin uygulanması gerekmektedir.

Otofaji, uzun ömürlü ve yanlış katlanmış proteinlerin yanı sıra fazla ve hasarlı organellerin, bir çift membran vezikül veya otofagosom kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldığı koruyucu bir hücrel işlemdir [3]. Kanserde ise, otofajinin, sistemik ve aşamalı bir şekilde tümör büyümesini kolaylaştırmada veya önlemede çelişkili bir rol oynadığı bilinmektedir [4].

Otofaji sürecinde LC3 proteini, fagoforun uzatılması ve kapanmasının gerçekleşmesinde görevlidir, bu yüzden en yaygın kullanılan otofagosom belirteçidir [5]. LC3 otofajide kritik bir rol oynamasının yanı sıra, otofajiden bağımsız olarak bazı kanser hücrelerinin proliferasyonunda da rol aldığı gösterilmiştir. Bu özelliğinden dolayı LC3'in teröpatik bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Ancak glioma hücrelerinde LC3'nin rolü ile ilgili çok az bilgi olup, bu proteinin kanser hücrelerinde rolünün araştırılması gerektiği önerilmektedir.

Son zamanlarda, RNA müdahalesi (RNAi) GBM dahil birçok kanserin tedavisi için kullanılan yeni bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Sunulan tezde LC3 genini hedefleyen LC3-siRNA kullanılarak, LC3 geninin GBM hücrelerinin proliferasyon, klon oluşturma, apoptoza direnç ve migrasyon gibi agresif özellikler kazanmasında ve bu

yolaklarda ana medyatör olarak görev yapan CyclinD1/Integrin β 1/Src ve apoptozda rol oynayan PARP proteinlerinin ekspresyonlarına etkisi araştırılarak, LC3'ün GBM'de göz önünde bulundurulması gereken teröpatik bir hedef olup olmayacağının açığa çıkartılması ve LC3'ün bu özelliklerde olası bir rolünün olduğunun bulunması durumunda LC3-siRNA'nın teröpatik bir ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağının gösterilmesi amaçlandı. Bu amaç için GBM hücre hattı olan U-87 MG hücreleri LC3 geninin hedefleyen iki farklı LC3 siRNA'ları ve hiçbir geni hedeflemeyen kontrol siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücrelerin canlılığı MTS analizi, hücrelerin klon oluşturma özellikleri klonojenik analizi, hücrelerin migrasyonu yara iyileştirme analizi, CyclinD1/Integrin β 1/Src ve PARP proteinlerinin ekspresyonları Western blot analizleri ile test edildi. Analiz sonuçlarımıza göre, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, hücre canlılığının, klon oluşumunun ve migrasyonun önemli oranda baskılandığı bulundu ($p < 0.001$). Ayrıca, LC3'ün siRNA aracılı baskılanmasının CyclinD1/Integrin β 1/Src ve PARP içeren birçok proto-onkogenik sinyal yolağının inhibisyonuna yol açtığı bulundu.

Sonuç olarak verilerimiz, in vitro ortamda LC3'ün GBM'de hücre proliferasyonu, canlılığı ve migrasyonu için gerekli olduğunu, yüksek agresiflik gösteren ve metastatik GBM hücrelerinde tümör büyümesi ve progresyonuna katkı sağladığını gösterdi. Bu sebeple otofaji geni olan LC3'ün GBM tedavisi için stratejik teröpatik hedef olma potansiyeline sahip olduğunu ve LC3-siRNA'nın teröpatik bir ajan olarak kullanılabilirliğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, GBM, U-87 MG, LC3B, LC3-siRNA, Temozolomid, Proliferasyon, klon, migrasyon, CyclinD1/Integrin β 1/Src, PARP.

**EFFECT OF LC3 GENE ON AUTOPHAGY THROUGH INTEGRIN
B1/FAK/SRC PATHWAY IN NON-IDH MUTANT GLIOBLASTOMA AND
CELL BEHAVIOR IN U87 GBM CELL LINE**

ABSTRACT

Glioblastoma (glioblastoma multiform, GBM) is the most common brain tumor in humans. Although it is a tumor with poor prognosis, its molecular pathogenesis is still unclear. GBM is divided into two types as primary (80%) and secondary GBM (20%).

GBM is a tumor with morphological heterogeneity, high cellularity, nuclear atypia, increased angiogenesis and mitotic activity. Although surgical resection, chemotherapy and radiotherapy treatment methods are used in GBM treatment, the survival time of patients is very low. Average life expectancy is 12-15 months [1, 2]. Therefore, it is necessary to investigate the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of GBM in terms of diagnosis, prognosis and treatment and to apply therapies targeting these mechanisms.

Autophagy is a protective cellular process in which long-lived and misfolded proteins as well as excess and damaged organelles are removed using a pair of membrane vesicles or autophagosomes [3]. In cancer, autophagy is known to play a contradictory role in facilitating or preventing tumor growth in a systemic and gradual manner [4].

During the autophagy process, the LC3 protein is involved in the lengthening and closing of the phagophore, so it is the most widely used autophagosome marker [5]. In addition to playing a critical role in LC3 autophagy, it has also been shown to be involved in the proliferation of some cancer cells independent of autophagy. Because of this feature, LC3 is thought to be a therapeutic target. However, there is little information about the role of LC3 in glioma cells, and it is suggested that the role of this protein in cancer cells should be investigated.

Recently, RNA intervention (RNAi) has emerged as a new strategy used for the treatment of many cancers, including GBM. In the presented thesis, using LC3-siRNA targeting the LC3 gene, LC3 gene in GBM cells gaining aggressive properties such as proliferation, clone formation, resistance to apoptosis and migration, and the effects of

Cyclin D1 / Integrin β 1 / Src, which act as the main mediator in these pathways, and PARP proteins playing a role in apoptosis were investigated. Thus, it was aimed to reveal whether LC3 would be a therapeutic target to be considered in GBM and to show whether LC3-siRNA could be used as a therapeutic agent in case LC3 had a possible role in these features. For this purpose, U-87 MG cells, the GBM cell line, were transfected with two different LC3 siRNAs targeting the LC3 gene and control siRNA targeting no gene. Cell viability after transfection was tested by MTS analysis, clone-forming properties of cells, clonogenic analysis, migration of cells, wound healing analysis, expression of CyclinD1/Integrin β 1/Src and PARP proteins by Western blot analysis. According to our analysis results, it was found that cell viability, clone formation and migration were significantly suppressed in cells transfected with two different LC3 siRNAs compared to cells transfected with control siRNA ($p < 0.001$). It was also found that siRNA mediated suppression of LC3 leads to inhibition of many proto-oncogenic signaling pathways including CyclinD1/Integrin β 1/Src and PARP.

In conclusion, our data show that LC3 is necessary for GBM cell proliferation, viability and migration, contributes to tumor growth and progression in high aggressiveness and metastatic GBM cells, that the autophagy gene LC3 has strategic therapeutic potency for the treatment of GBM and Demonstrated the usability of LC3-siRNA as a therapeutic agent.

Keywords: Glioblastoma, GBM, U-87 MG, LC3B, LC3-siRNA, Temozolomide, Clone, Proliferation, Migration, Cyclin D1/Integrin B1/Src, PARP.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser son zamanlarda modern dünyada giderek yaygın görülen bir sağlık sorunudur. Gerek tanı gerekse de tedavinin komplike olması sebebiyle üzerine en çok araştırma yapılan konuların başında gelmektedir. Santral sinir sistemi kanserleri ise, yerleşim yeri itibariyle diğer kanserlere göre daha ciddi mortalite ve morbiditeye neden olabilmektedir.

Glioblastoma, santral sinir sistemi tümörleri içinde en sık görülen, en kötü prognoza sahip ve moleküler patogenezi hala gizemini koruyan bir tümör olması yönüyle oldukça önem arz etmektedir. Primer (IDH mutant olmayan/wild type) ve sekonder (IDH mutant) olmak üzere iki tipe ayrılır. Morfolojik olarak oldukça heterojen olan bu tümörün tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri kullanılmasına rağmen, sağkalım süresi oldukça kısadır. Bu sebeple altta yatan moleküler düzeydeki olayların açığa çıkarılması ve buna yönelik tedavilerin düzenlenmesi adeta bir zorunluluk halini almıştır.

Otofaji; yanlış katlanmış veya ömrünü doldurmuş proteinlerin ve hasarlı organellerin geri dönüşümün sağlandığı bir hücre fonksiyonudur. Kanserde ise tümör büyümesinde hem önleyici, hem de kolaylaştırıcı çelişik bir rol oynadığı bilinmektedir.

LC3 proteini, otofaji sürecinde fagofor oluşum ve kapanmasında rol alan ve en sık kullanılan otofagosom belirtecidir. Bu sebeple LC3'ün tedavide bir hedef olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Ancak glial tümörlerde LC3 ile alakalı veri çok az olup, bu konuda ileri araştırmalar yapılması önerilmektedir.

Yakın dönemde, RNA'lar kullanılarak genleri susturmak, bu yolla da kanserleri tedavi etmek temelinde yeni bir tedavi modalitesi ortaya çıkmıştır. RNAi (RNA interference/RNA müdahalesi) de denilen bu yöntemde siRNA'lar kullanılarak patogeneizde rol aldığı düşünülen genler susturularak, yöntemin tedavi açısından kullanılabilirliği araştırılmaktadır.

Sunulan tez çalışmamızda, IDH mutant GBM hücre hatlarında otofagozom oluşumunun ana belirteci olarak kabul edilen LC3'ün iki farklı LC3-siRNA kullanılarak susturulmasıyla ortaya çıkan otofaji inhibisyonunun, Integrin β 1/Fak/Src yolağı üzerine etkisinin ve buna bağlı olarak glioblastoma hücrelerinin çoğalma ve migrasyon özelliklerindeki değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, giderek yaygınlaşan bir sağlık sorunudur. Teşhis ve tedavinin karmaşıklığından dolayı araştırmacıların üzerinde en çok çalıştığı konulardan biridir. Hastalığın süreci, mortalitesinin yüksek oluşu ve kansere bağlı morbidite nedeniyle işgücü kaybının görülmesi sebebiyle, sağlık sistemlerinin tedavi açısından öncelikleri arasında yer almaktadır.

Santral sinir sistemi ise, vücudun kontrol, koordinasyon ve regülasyon gibi önemli fonksiyonlarını yöneten adeta bir yönetici konumundadır. Santral sinir sistemi tümörleri ise, buldukları yer nedeniyle diğer kanserlere göre daha ciddi ölüm ve fonksiyon kayıplarına neden olabilmesi yönüyle ayrı bir öneme sahiptir.

2.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri

Primer beyin tümörlerinin yıllık insidansı yaklaşık 10/100.000 oranındadır [6, 7]. Bunun da çok büyük bir oranını glial tümörler oluşturmaktadır. 2016'da WHO tarafından gliomlar; diffüz astrositik-oligodendrogial tümörler, diğer astrositik tümörler ve ependimal tümörler olarak üç temel grupta sınıflandırılmıştır [8]. Klinik olarak glial tümörler pratikte tümör derecesine göre sınıflandırılır. Düşük ve yüksek dereceli olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. WHO grade I-II düşük dereceli gliomlar olarak adlandırılırken, grade III-IV ise yüksek dereceli gliomlar olarak adlandırılır [9].

2.1.1. Pilositik Astrositomlar

Astrositik hücre kökenli tümörler içindeki en benign lezyonu olup; tüm gliomların yaklaşık %10'unu teşkil eder. Who grade I olarak sınıflandırılır. İyi sınırlı olup, çevre dokuya invazyon oranı oldukça düşüktür. Serebellar yerleşim de gösterebilir. Çocuklarda görülen serebellar astrositomların da büyük oranını oluştururlar [10, 11].

2.1.2. Pleomorfik Ksanastrostom

Daha çok fokal yerleşimli, nöbete sebep olan astrositomlardır. Büyük oranda supratentorial yerleşim gösterir. Bunun da yine çoğunluğu frontal ve temporal lobda yer alır. Dural invazyon görülme oranı oldukça düşüktür. İyi sınırlı kortikal kitle olarak görüntülemelerde karşımıza çıkar. Kistik ve solid komponentleri olabilir. Çocuk ve genç erişkinlerde daha sık izlenip, genel seyri benignedir. Ancak anaplazi de görülme durumu olabilir.

2.1.3. Diffüz Düşük Dereceli Astrositomlar

DSÖ grade II, astrositik serinin yavaş seyirli, diffüz infiltratif olarak görülen gliomlarıdır. Her ne kadar iyi seyirli olsa da malign transformasyon gösterme ihtimali de vardır. Yaklaşık 1/3'ü infratentorial yerleşimlidir. Uzun süre semptom vermeden büyüyebilir. Frontal ve temporal yerleşimli olanları ise genelde konvülsiyon ile prezente olur. 4-5 dekatlarda tanı alırlar ve ortalama sağ kalım süresi 10 senedir. IDH mutasyonu gösteren, ek mutasyonu olmayan olgularda hastalık seyri daha iyidir[12].

2.1.4. Anaplastik Astrositom

DSÖ grade III, anaplazi, anlamlı düzeyde proliferasyon indeksi ve IDH gen mutasyonu olabilen yüksek dereceli glial tümörlerdir. Progrese olarak glioblastoma dönüşme ihtimali mevcuttur. Sıklıkla frontal ve temporal lob yerleşimlidir. Proliferasyon indeksi yüksek olmasına rağmen, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz görülmez [11, 13]

2.1.5. Glioblastoma

İleride detaylı tartışılacaktır. (Bkz: 2.2 Glioblastoma)

2.1.6. Oligodendrogliom

Derin beyaz cevherde yerleşimli, myelin yapımında görevli olan oligodendroglial hücre kökenli, non-astroitik glial tümörlerdir. Glioblastom ve anaplastik astroitom'dan sonra üçüncü en çok görülen glial tümördür. İyi diferansiye (WHO grade II) ve anaplastik (WHO grade III) olmak üzere ikiye ayrılır. Oligodendrogliomların yarısı iyi diferansiye iken, diğer yarısı anaplastik olarak izlenir [8].

Ekseriya 5. dekatta görülür, sıklıkla supratentorial yerleşim gösterip, frontal lobu tutar. Spinal kord ve serebellar tutulum oldukça nadirdir. Pediatrik yaş grubunda spinal kord ve serebellar tutulum görülebilir. Kalsifikasyon, kistik dejenerasyon tipik olmakla birlikte zaman zaman hemoraji de görülebilir.

2.1.7. Ependimomlar

Ventriküler sistem ile omurilikte bulunan santral kanalı çevreleyen ince bir nöroepitel astarı oluşturan, BOS üretimi ve nörorejenerasyon için rezervuar görevi gören ependim hücrelerinden köken alır. Nöral aks üzerinde her yerde yerleşim gösterebilir. Supratentorial, posterior fossa ve spinal kord yerleşimi gösterir. Bu üç tip yerleşim yerindeki lezyonlar histolojik olarak birbirine benzemesine rağmen, genetik farklılıkları olduğu bildirilmiştir. WHO 2016 sınıflamasına göre de "Subependimom, miksopapiller ependimom, RELA füzyon (+) ependimom, klasik ependimom ve anaplastik ependimom" olmak üzere 5 alt tipi belirtilmiştir [8].

2.2. Glioblastoma (GBM)

Glioblastomalar insanda görülen en malign ve en ölümcül seyirli santral sinir sistemi tümörüdür [14]. Glial tümörler içinde de en malign seyir gösteren tipi olup, DSÖ grade IV olarak sınıflandırılır. De novo olarak yahut düşük dereceli glial tümörlerden sekonder olarak gelişebilir. DSÖ sınıflamasına göre sekonder gelişenlere IDH mutant, primer (de novo) görülenlere ise IDH- wild tip denilir [15]. Tüm GBM'lerin %95'i primer olarak gelişir.

Birkaç ay içerisinde oluşup semptom verirler. Beyaz cevher traktusları üzerinden yayıldığı için yaklaşık %20 oranında multifokal yerleşimlidir. Korpus kallozum yoluyla karşı hemisfere yayılım gösterebilir (kelebek tarzı tutulum). Histopatolojik özellikleri arasında belirgin nükleer atipi ve mitotik aktivite ile birlikte mikrovasküler endotelial proliferasyon ve nekrotik aktivite mevcut olup, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO)

santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırmasında en ileri olan evre 4 olarak sınıflandırılmıştır. Bütün malign primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin %19.3'ünü oluşturmaktadır [16]. Tipik mikroskobik özelliği mikrovasküler proliferasyon ve nekrozdur. Patolojik preparatlarda pleomorfik fibriller astrositom, iki çekirdekli hücreler, büyük çok çekirdekli dev hücreler ve mikroglia görülebilir. Bu nedenle, "glioblastoma multiforme" olarak da adlandırılırlar [11, 13].

En sık 40-75 yaşları arasında rastlanır. Ancak her yaşta karşımıza çıkabilmektedir primer GBM'ler genelde 60 yaş üzerinde görülürken, sekonder GBM'ler ise 5.-6. dekatlarda daha sıktır. Oldukça malign seyirli olup, beklenen yaşam süresi bir yılın altındadır. Sekonder GBM'lerde ise bu süre daha uzundur [11, 13].

Yaşlılarda, erkeklerde ve sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelerde daha sık görülen glioblastomların rutin tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi kendi içinde kombinasyonlar ile uygulanmaktadır. Tümör biyolojisi, yapılan çalışmalarla daha iyi anlaşılmasına rağmen, tedavide maalesef belirgin bir aşama kaydedilememiştir. Genetik tedavi çalışmaları ise henüz deneme aşamasında olup rutin tedavi şemasına girmiş değildir.

2.2.1. Epidemiyoloji

GBM istatistiklere göre tüm dünyada en sık görülen malign primer beyin tümörüdür. Görülme sıklığı ülkeye ve ülkenin tanı imkanlarına göre değişmekle birlikte; Avrupa'da Amerika'dan, beyaz ırkta diğer ırklardan daha sık görülür [17, 18]. Yaşla birlikte insidansı artar [19]. Ortanca görülme yaşı 64'tür, erkeklerde daha sık izlenir. GBM'in mortalite ve morbidite oranı çok yüksektir. Yaş ve cinsiyete göre değişmekle birlikte ortalama 5 yıllık yaşam beklentisi yalnızca %6.8'dir [20].

GBM için bilinen tek risk faktörü baş ve boyun bölgesinde iyonize radyasyona maruziyet iken, koruyuculuğu saptanan tek faktör ise atopik (allerji, astım, egzema, alerjik rinit) yapıya sahip olmaktır [21-23].

Atopik yapıya sahip olmanın neden olduğu koruyuculuk hem düşük, hem de yüksek gradeli gliomlar için geçerlidir. Bu ilişkiden sorumlu olan mekanizma ise halen bilinmemektedir.

Radyasyona maruziyet düşük dozda da olsa GBM riskini artırdığını göstermiştir [24]. Radyasyona maruz kalma ne kadar erken dönemde olursa, gliom gelişme riski o kadar yüksektir. Inskip ve ark yaptıkları çalışmada 5 yaşından önce 50 Gy kranial radyoterapi alanların riskinin 30 kat arttığını göstermiştir [25].

Cep telefonu kullanımı (radyasyon maruziyeti) beyin tümörlerinde risk faktörü olması açısından kuvvetli şekilde çalışılmasına rağmen, sonuçlarda belirgin bir kanıt elde edilememiştir [22, 26]. Buna rağmen hastalığın tanısından sonraki radyasyona maruziyetin sonuçları bilinmediğinden, hastaların bu anlamda gözlenmesi gerekir.

GBM hastalarının çok büyük çoğunluğunda aile öyküsü yoktur. Gliomların yalnızca %5'i aileseldir [27]. Gliom ve glioblastom Mendelian kalıtılan bazı sendromlarda nadiren de olsa görülebilir (örn: TP53 geni mutasyonuna bağlı Li-Fraumeni Sendromu gibi) [28] sendromik veya semptomatik olmayan glioma kalıtımı, glioma vakalarının yalnızca küçük bir bölümünü oluşturur. Hastalık ailede birçok kişide görülür ve otozomal dominant kalıtım ve otozomal resesif kalıtım gibi kalıtım kalıplarına uyar. Hastada tek bir organ sistemi tutulumu da olabilir (örneğin birçok insanda sadece glioma) veya birçok organ sistemini etkileyebilir, buna Mendelian kalıtsal sendrom denir.

2.2.2. Moleküler Patogenez ve Genom

Merkezi sinir sistemi hücreleri, farklı tipteki gliomaların öncüleridir ve bu hücrelerin, glioma tipini oluşturabileceğini bildiğimiz "kanser programına" nasıl ve hangi sırada dönüştüğü açık değildir. Bu alandaki en önemli gelişmelerden biri, 2004 yılında varlığı iddia edilen kanser kök hücresi kavramı olmuştur [29]. Bu kavrama göre kanserin devamlılığında sorumlu bir kök hücresi mevcuttur. Bilindiği üzere kök hücreler, doku devamlılığı ve tamirinden sorumlu hücre grubudur. Yaşamları boyunca çok az bölünme geçirerek, genetik hatalardan arınmış olarak saf kalabilirler. Ayrıca bu hücreler yapıları gereği çevresel ve zararlı faktörlerin büyük kısmından korunma mekanizmalarına sahiptirler. GBM özelinde de varlığı gösterilen bu hücreler tümörün oldukça küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen, sayıları çok çok azalsa dahi GBM'in tüm özelliklerini yeniden teşkil edebilecek potansiyele sahiptirler [29]. Bu teori tedavi sonrası hastalığın nasıl tekrarladığını, radyoterapi ve kemoterapiye karşı gelişen direnci, damar etrafındaki dizilimi ve GBM'lerdeki hipervaskülerizasyonu açıklayabilmektedir.

Bu teori de zaman içinde değişim ve gelişime uğrayarak; tek bir kök hüresinden bahsetmekten ziyade farklı yaş gruplarında farklı glial/nöral progenitörler üzerine izah edilen bir kanserleşme modeline evrilmiştir [30].

Yapılan çalışmalar, aynı genetik hasar nedeniyle farklı progenitör hücre popülasyonlarının farklı fenotiplere sahip tümörlere dönüşebileceğini göstermiştir [31]. Bazı gliomalarda, öncü hücrenin hangi nöral/glial progenitör hücre olduğu gösterilmiştir. Deneyler, bu öncüllerin oligodendroglioma ve diffüz orta hat gliomadaki oligodendrosit progenitör hücreleri olduğunu göstermiştir[32, 33]. Ancak klinikte karşılaştığımız GBM'nin hangi hücre kökenli olduğunu ve bunun klinik ve terapötik açıdan nasıl bir etkisi olacağını gösteren bir yöntem henüz mevcut değildir.

GBM'lerin klinik olarak görülmesinde çok geniş bir heterojenite olduğu gibi, genetik özelliklerinde de aynı şey söz konusudur. Ancak buna rağmen ortak belirteçler de yok değildir. Çoğu GBM'de ortak belirteçler tespit edilebilir. GBM olarak adlandırılan tümörlerin en yaygın moleküler özellikleri PTEN delesyonu, EGFR amplifikasyonu ve TERT promoter mutasyonlarıdır. Bu değişikliklere hastaların %70 ila %80'inde rastlanır.

2.2.2.1. Glioblastoma'da Genetik Hedefler

Glioblastomalar tümör içinde de yüksek derecede heterojenite gösterdiğinden genetik olarak birden fazla hedef söz konusudur. Tümörün genetik olarak daha iyi anlaşılması, tedavi açısından daha yol gösterici olması yönüyle bu hedeflerin anlaşılması ve buna göre stratejiler geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir.

Genetik hedeflerden kısaca bahsedilecektir.

2.2.2.1.1 Epidermal büyüme faktörü reseptörü

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geninin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, primer glioblastomdaki en yaygın genetik değişikliklerden biridir. EGFR ve EGFR-ilişkili hüresel yolaklardaki değişiklikler, tümör büyümesini, migrasyonu ve anjiyogenezi artırmıştır [34].

EGFR over-ekspresyonu, GBM'ler için kötü bir prognoz göstergesidir, sağkalım süresini kısalttığı bilinmektedir [35].

2.2.2.1.2. İzositrat Dehidrogenaz

İzositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geni, izositratın alfa-ketogluterata dönüşümünü katalizleyen enzimin kodlanmasından sorumludur. Burada görülen mutasyonlar, enzimin normal işlevini bozarak, kanserojenik bir metabolit olan 2-hidroksigluteratın (2-HG) overekspresyonuna sebep olur[36]. 2-HG, epitel-mezenkimal geçişi (EMT) uyararak protoonkogenlerin ekspresyonunu arttırabilir; ek olarak, dioksijenazları inhibe ederek, DNA ve histon modifikasyonlarına ve hücre mikroçevresinin değişmesine katkıda bulunur [37]

IDH mutasyonlarının glioblastom oluşumunda rol aldığına dair (driver mutasyon) kanıtlar vardır. Koivunen ve arkadaşlarının retrovirüsleri kullanarak insan astrositer seri hücrelerinde IDH1 R132H mutasyonunu göstermiş ve bu mutasyonun olduğu hücrelerin bölünme hızında artış olduğu, koloni oluşturma yeteneği kazandığını göstermiştir [38].

IDH mutasyonları, glioblastomun proneural alt tipi ile alakalıdır ve sekonder glioblastomda bulunur [39]. Ek olarak, IDH1 mutasyonu, glioblastomlarda iyi prognozu için bağımsız bir belirteçtir [40, 41]

IDH inhibitörleri hakkında çok sayıda çalışma yapılmakta olup, IDH inhibitörlerinin etkinliği ve tedaviye direnç hakkında değerli bilgiler sağlayacağı için çok önemlidir.

2.2.2.1.3. Poli-ADP-riboz polimeraz 1 (PARP1)

PARP1, homolog rekombinasyon(HR) yoluyla tek zincir üzerindeki DNA kırıklarının tamirinde görev alan önemli bir proteindir. Aşırı eksprese edilmesi, nöroblastom, meme kanseri, kolon kanseri, endometrial kanser, yumurtalık kanseri gibi çeşitli onkolojik türlerde rastlanan bir durumdur. Bu sebeple PARP1 proteininin ifadesinin engellenmesi, DNA hasar tamirinde bozulmaya, dolayısıyla hücre ölümüne neden olur.

PARP inhibisyonu yoluyla yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda glioblastom hücrelerinin radyoterapiye duyarlı hale getirdiğini göstermektedir [42, 43]

Karpel-Massler ve ark. iki farklı PARP inhibitörü kullanarak yaptıkları çalışmada, glioblastom hücrelerinin TRAIL-ilişkili apoptotik hücre ölümüne duyarlı hale geldiğini göstermişlerdir [44]. Ek olarak, PARP ekspresyonunu inhibe etmek için RNA müdahalesi kullanılması, glioblastoma hücrelerinin TRAIL direncini tersine çevirmektedir [44]. Sonuç olarak, PARP inhibisyonu, glioblastoma'da için alternatif bir tedavi strateji olma potansiyeli taşımaktadır.

2.2.2.1.4. TERT-promoter mutasyonları, ATRX mutasyonları

Gliomları gruplamak ve kökenlerini tahmin etmek için en önemli kılavuzlardan biri, telomeraz (TERT) enziminin aktivasyonudur. Bölünme özelliğinin ehemmiyet arz ettiği hücrelerde (örneğin, kök hücreler) telomeraz olarak adlandırılan bir enzim kromozom uçlarını, ters transkriptaz aktivitesi ile, yeniden yapar. Telomerlerin bu şekilde yenilenmesi hücreye sonsuz bölünme potansiyeli kazandırır. Daha önce malign melanomlarda TERT düzenleyici bölgesinde bulunan spesifik bir mutasyonun enzim yapımını arttırdığı, böylece hücreye sınırsız çoğalma kabiliyeti kazandırdığı bulunmuştur. Kısa süre içerisinde benzeri bir çalışma ile aynı sürecin gliomlarda da (özellikle glioblastom ve oligodendrogliom) görüldüğünü gösteren çalışmalar yayınlanmıştır [45]

Başka çalışmalarda ise TERT mutasyonu izlenmeyen olgularda, bunun yerine ATRX ve DAXX mutasyonlarının görüldüğünü raporlanmıştır [46]. Günümüzde telomer uzamasının gliomlarda olmazsa olmaz bir mekanizma olduğu kabul edilmektedir. IDH mutant ve 1p/19q kodelasyonu olan oligodendrogliomların tümünde ve primer GBM'lerin %80 gibi bir kısmında TERT düzenleyici mutasyonları izlenir [47]

2.2.2.1.5. Notch sinyal iletim yolağı

Notch sinyal iletim yolu aktive edildiğinde, fizyolojik duruma ve/veya aktivasyonun meydana geldiği hücre tipine bağlı olarak, iki olası etki gözlenir: tümör büyümesini inhibe etmek veya tümör büyümesini uyarmak [48-50]

Notch sinyal yolu, düşük dereceli astrositom ve sekonder glioblastomda etkisizdir, ancak primer glioblastomda etkilidir [51].

2.2.2.1.6. PTEN

10. kromozom üzerinde yer alan PTEN, iyi bilinen bir tümör süpresör gen olup, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat 3-fosfataz'ın kodlanmasından sorumludur. Hücre çekirdeği veya sitoplazmada yer almasına göre farklı aktivitede bulunur. Sitoplazmik PTEN fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal iletim yolunda düzenleyici olarak görev yapar. Çekirdekte yer alan PTEN ise kromozom stabilitesi düzenlenmesi, DNA tamiri ve apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde rol alır [52-55]

2.2.2.1.7. AXL

Reseptör tirozin kinaz AXL, hayatta kalma, hücre proliferasyonu ve göç gibi farklı fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Growth arrest-specific 6 (Gas6) proteini AXL'nin doğal ligandı olup, AXL-Gas6 sinyal iletiminin çok fazla ekspresyonu, akciğer, meme kanseri, melanom, lösemi gibi değişik kanser türünde karşımıza çıkmaktadır [56]. AXL'nin çifte mutant olarak glioblastoma hücreleri ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, AXL-Gas6 sinyal iletim yolunun yokluğunda, glioblastoma hücreleri arasındaki etkileşimin azaldığını, göç ve tümör büyümesinin engellediği gözlenmiştir [57]. Ayrıca Keating ve ark.'nın yaptığı bir çalışma RNAi ile AXL susturulmasının apoptozu arttırdığını ve TMZ, karboplatin, vinkristin duyarlılığını arttırdığını göstermiştir [58].

2.2.2.1.8. Retinoblastoma Gen Yolağı

Kanser hücrelerinin çoğalmasında önemli rol alması nedeniyle retinoblastoma (RB) gen yolağı araştırmacıların ilgisini çeken bir konu olmuştur. Bu yolda Ink4 ailesi ve RB protein ailesinin fonksiyonu tümör baskılayıcı durumdayken; Siklin D, CDK4/6 ve E2F protein aileleri tümör hücresinin proliferasyonu yönünde etki etmektedirler. Primer glioblastoma tümörü üzerinde yapılmış kapsamlı genom ve transkriptom analizi çalışmasında, RB yolağının primer glioblastoma örneklerinde değiştiği görülmüştür [59]

GBM ksenograftlarında CDK4/6 inhibitörleri üzerine yapılan bir çalışmada, retinoblastoma tümör baskılayıcı protein RB1 durumunu tümör terapötik etkinliğinin bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır [60]

CDKN2A / p16-CDK4 / 6-RB yolağındaki anormallikler GBM'de yaygındır [61-63] ve bunların düşük dereceli astrositomlardan gliomagenез veya tümör progresyonunda kritik olduğu gösterilmiştir [64]. CDK4 ve CDK6 RB1'i fosforilize eder, bu da transkripsiyon faktörü E2F'nin salınmasını indükler, böylece hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini kolaylaştırır. Normal hücrelerde bu hücre döngüsü geçişi, CDK4 / 6 fonksiyonunu bağlayan ve inhibe eden p16 proteini tarafından negatif olarak düzenlenir. Bu nedenle, p16, CDK4, CDK6 veya RB1 ekspresyonundaki değişiklikler hücre döngüsünün düzensizliğine neden olabilir [65]. Gerçekten de, Kanser Genom Atlası (TCGA) projesi, bu yolun, birincil GBM'lerin yaklaşık% 80'inde değiştiğini ve en sık görülen genetik değişikliklerin CDKN2A gen delesyonu veya mutasyonu, CDK4 amplifikasyonu ve RB1 mutasyonu veya delesyonu olduğunu göstermiştir [59]. Yakın tarihli bir prelinik çalışmada, intrakraniyal GBM ksenograft tümörlerinde bir CDK4 / 6'ya özgü inhibitörün (PD-0332991) etkinliğini araştırdı ve bunun GBM büyümesinin güçlü bir inhibitörü olduğunu gösterildi [60]. Bununla birlikte, beklendiği gibi, bu antitümör etkisi, RB1'den yoksun tümörlerde görülmemiştir çünkü son hücre sinyalleme değişikliği, ilaç hedefinin aşağı akışındadır. Bu nedenle, tümörlerinin RB1 durumuna göre sınıflandırılması önemli olabilir [66].

2.2.3. Patoloji

Geçtiğimiz yüzyılda beyin tümörleri histolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Tümörler, köken aldığı düşünülen hücreler ile benzerlik ve farklılaşma derecesine göre klasifiye edilir. Bu histolojik benzerliği karakterize etmek için ışık mikroskobu altındaki bulgular, immünohistokimyasal ekspresyon profili ve elektron mikroskobu altındaki bulgular kullanılmıştır [67].

Uluslararası Nöropatoloji Derneği tarafından 2014'te düzenlenen bir toplantıda, beyin tümörlerinin teşhisine moleküler bulguların nasıl dahil edileceğine dair kılavuzlar geliştirilmiştir. Bu durum, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2007'de Merkezi Sinir Sistemi (CNS) sınıflandırmasının büyük bir revizyonuna sebep olmuştur [68]. Mevcut 2016 WHO CNS sınıflandırmasında, tamamen mikroskobik bakıya dayanan eski tanı ilkesi kırılarak moleküler parametreler de sınıflandırmaya dahil edilmiştir [8].

Kapsamlı tanı için; histolojik tip, derece ve moleküler değişiklikleri içine alan standart bir format kullanılmalıdır [68]. Histolojik ve moleküler değişikliklerin tanısal kullanımı,

bazen tutarsız sonuçların olasılığını artırabilmektedir. Histolojik ve moleküler özellikler arasında uyumsuzluk olması durumunda moleküler özellikler ön plandadır ve tümörler moleküler özelliklerine göre sınıflandırılır[67].

Gliyal tümörlerin mikroskopik olarak derecelendirmesinde St Anne/Mayo sistemi kullanılmaktadır. Bu sisteme göre tümörler hücresel atipi (derece II), mitoz varlığı (derece III), endotel proliferasyonu ve/veya nekroz görülmesine(derece IV) göre derecelendirilir [69]. Bu derecelendirme tümörün biyolojik davranışı ve hastanın prognozu hakkında bilgi sağlar. Tedavi seçiminde tümörün derecesi en önemli unsurdur. Glioblastom ve embriyonel tümörler derece IV tümörlerdir [8].

2.2.4. SSS tümör sınıflandırması

WHO SSS tümörleri için 1979, 1993, 2000 ve 2007 olmak üzere 4 kere sınıflama kitabı yayınlamıştır [70-73].

2007 sınıflaması sonrasında tümörlerin moleküler özelliklerindeki çalışma sayısının giderek artması ile birlikte sınıflamanın gereklilikleri karşılayamaması üzerine 2014 yılında Uluslararası Nöropatoloji Topluluğu (ISN-International Society of Neuropathology) 4. Edisyon güncellemesi adıyla bir kitap yayınlamıştır [70]. Bununla birlikte morfolojik bulgulara ek olarak moleküler bileşenler de değerlendirilmeye alınarak entegre bir tanı sistemi gündeme gelmiştir [68].

2007'deki sınıflamada sadece patolojik özelliklere göre tümör sınıflaması yapılırken, DSÖ 2016 sınıflandırmasında IDH mutasyonları, 1p/19q kodelesyonu, H3K27M mutasyonları ve RELA füzyonları gibi moleküler/genetik özellikler doğrudan yeni sınıflandırmaya dahil edilmiştir.

2016 yılında güncellenen DSÖ SSS tümör sınıflandırmasında 16 kategori bulunmaktadır (Tablo 1). Önceki sınıflandırmalarda olduğu gibi, ana kategorilerin çoğu, tümör hücrelerinin histolojik kökenine ve bunların gözlemlendiği belirli alanlara dayanmaktadır. Hücre kaynağına göre ana gruplar glial, nöronal, mikst nöronal-gliyal, embriyonel, meningeal, mezenkimal, melanositik, lenfositik, germ hücreli ve histiyositik tümörlerdir.

Tablo 1. 2016 DSÖ SSS Glial Tümörler Sınıflaması

1. DİFFÜZ ASTROSİTİK VE OLGİODENDROGLİAL TÜMÖRLER
<ul style="list-style-type: none">• Diffüz Astrositom, IDH-Mutant<ul style="list-style-type: none">-Gemistositik Astrositom, IDH-Mutant• Diffüz Astrositom, IDH-Wild Tip• Diffüz Astrositom, NOS• Oligodendrogliom, IDH-Mutant ve 1p/19q Kodelesyonu• Oligodendrogliom, NOS• Oligoastrositom, NOS• Anaplastik Astrositom, IDH Mutant• Anaplastik Astrositom, IDH-Wild Tip• Anaplastik Astrositom, NOS• Anaplastik Oligodendrogliom, IDH-Mutant ve 1p/19q Kodelesyonu• Anaplastik Oligodendrogliom, NOS• Anaplastik Oligoastrositom, NOS• Glioblastom, IDH-wild tip<ul style="list-style-type: none">• Dev hücreli glioblastom• Gliosarkom• Epiteloid glioblastom• Glioblastom, IDH-mutant• Glioblastom, NOS• Diffüz Orta Hat Gliomu, H3 K27M-mutant
2. DİĞER ASTROSİTİK TÜMÖRLER
<ul style="list-style-type: none">• Pilositik Astrositom<ul style="list-style-type: none">-Pilomiksoid Astrositoma• Subependimal Dev Hücreli Astrositom• Pleomorfik Ksantoastrositom• Anaplastik Pleomorfik Ksantoastrositom
3. EPENDİMAL TÜMÖRLER
<ul style="list-style-type: none">• Subependimom• Miksopapiller Ependimom• Ependimom<ul style="list-style-type: none">• Papiller Ependimom• Clear Cell Ependimom• Tanisitik Ependimom• Ependimom, RELA Füzyon Pozitif• Anaplasiton Ependimom
4. DİĞER GLİOMLAR
<ul style="list-style-type: none">• Üçüncü Ventrikül Kordoid Gliomu• Angiosentrik Gliom• Astroblastom

Koroid pleksus, pineal bölge ve sellar bölgede görülen tümörler özel alan kategorisine dahil edilir. Tümörlerin farklılaşmalarına göre sınıflandırılması sağkalım, prognoz ve tedavi yöntemleri açısından çok önemli olduğu için Dünya Sağlık Örgütü bu tümörleri ayrıca derecelendirmektedir [74].

Buna ek olarak sürekli yeni bilgilerin ortaya çıkması üzerine ISN (International Society of Neuropathology) WHO tarafından yeni bir sınıflama yayınlanana kadar bazı yenilikleri, güncel nöropatoloji pratiğinde kullanılmak üzere makale şeklinde yayınlamaya karar vererek cIMPACT-NOW (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy) duyurmuştur. Bu sayede nöropatolog, nöroonkolog ve nöroşirürjiyenlere yol haritası olmak hedeflenmiştir [75, 76].

cIMPACT-now'un ilk güncellemesi 2018 Ocak [77], ikinci güncelleme aynı yıl Mart [78], üçüncü güncelleme yine aynı yıl Eylül [79] ve dördüncü güncelleme ise 2019 Mart ayında [80] yayınlanmıştır.

İlk güncelleme ile NOS(Not otherwise specified-tanımlanmamış) kavramına ek olarak NEC(Not elsewhere classified) ifadesi kullanılmaya başlamıştır [77]. NOS ifadesinin 2016'da moleküler değişikliklere karar verilemediği ve test sonuçlarında uyumsuzluk olduğunda kullanılması önerilmiştir [8]. Ancak zamanla tanıda zorluk yaşanan her olguda bu ifadenin kullanılması klinik karmaşaya yol açtığı görülmüştür. Bu güncelleme ile bu ifadenin kullanımı moleküler değişiklikler yönüyle test yapılamadığı durumlar ile sınırlandırılmıştır.

Önerilen yeni ifade olan NEC'in ise tüm gerekli moleküler testlerin yapılmasına rağmen sonuçların uyumsuz olduğu durumlarda kullanılması önerilmiştir.

İkinci güncelleme ile 2016 sınıflamasında sadece orta hat gliomlarına spesifik olduğu bildirilen H3K27M mutant tümörleri yeniden düzenleme getirilmiştir. Bu mutasyonun varlığı tümörü doğrudan grade 4 olarak evrelemenin doğru olmadığı, bu mutasyonun tek bir antiteye spesifik olmadığı vurgulanmıştır.

Ayrıca yine bu ikinci güncelleme ile diffüz glial tümörlerde öncelikle IDH mutasyonu araştırılması, mutasyon varlığında ise ATRX mutasyonuna, 1p/19q kodelesyonuna bakılması, bunun saptanması halinde de p53 mutasyonuna bakılması önerilmiştir [81].

Öncesinde eş zamanlı olarak yapılan bu testler, ikinci güncelleme ile sıralı hale getirilerek daha akılcı hale getirilmiştir.

Üçüncü güncelleme 2018 Eylül ayında yayınlanmıştır [79]. Bu güncelleme ile IDH-wild type hücrelere açıklık getirmiştir. Son 10 yıl klinik pratiğinde IDH wild-type diffüz gliomların evre kaç olursa olsun kötü prognoz seyrettiği anlaşılmıştı. 2016 sınıflamasında mitoz görülmediği durumlarında WHO grade II, mitoz olup nekroz ve vasküler/endotelyal proliferasyon olmaması halinde WHO grade III olarak değerlendiriliyordu [8]. Sadece nekroz ve vasküler/endotelyal proliferasyon görülmesi durumunda WHO grade IV olarak tanı alıyorlardı.

Bu üçüncü güncelleme ile, IDH-wt tümör morfolojisi glioblastomayı desteklemese bile, TERT mutasyonu, EGFR amplifikasyonu, Kromozom 7 kazanımı/ Kromozom 10 kaybına bakılması gerekliliğini vurgulayarak, bunların herhangi birinin saptanması halinde “Glioblastom moleküler özellikleri gösteren difüz glial tümör, WHO Derece IV” olarak sınıflanması önerilmiştir [82].

Dördüncü ve son güncelleme ise çocukluk çağı düşük dereceli difüz glial tümörleri üzerine olmuştur. Erişkinlerde görülen difüz glial tümörlerde IDH mutant olanlar iyi prognozlu, H3K27M mutant olanlar kötü prognozlu, H3-wt ve IDH-wt olanların ise yine kötü prognozlu oldukları anlaşılmıştı. Çocukluk çağı difüz glial tümörlerde farklılık söz konusuydu. IDH mutasyonu 17 yaş altında daha nadir izlenmekteydi [83]. Bu durumda çocukluk çağında izlenen tümörlerin çoğu IDH wild type oluyordu.

Dördüncü güncellemede; pediatrik tipte IDH-wt/H3-wt difüz glial tümörlerde; MYB-MYB1, FGFR değişiklikleri ve BRAFV600E mutasyonunun araştırılması, değişiklik saptanmaması halinde KRAS mutasyonu, BRAF füzyonu gibi diğer MAPK yolağı moleküler değişikliklere bakılması, bunların hiçbirinin olmaması veya araştırılmasının mümkün olmadığı durumlarda tanının “Diffüz Astrositom, IDH-wt” yerine; “Diffüz astrositom NEC” olarak belirtilmesi önerilmiştir.

2.2.5. Glioblastoma’da Klinik Bulgular

GBM, beyin anatomisinde ve intrakranial bölgedeki fizyolojik dinamiklerde farklı şekillerde değişikliklere neden olarak, parenkim infiltrasyonu, beyin ödemi, beyin omurilik sıvısının (BOS) drenajının tıkanmasına bağlı ortaya çıkan hidrosefali ve

herniasyon gibi farklı nörolojik semptomlarla prezente olabilir [84]. En sık görülen semptom baş ağrısıdır. Diğer bulgular arasında nöbetler, bilişsel ve psikolojik değişiklikler, konuşma ve anlama bozuklukları, bulantı ve kusma, sinir fonksiyonunun kaybı ve kraniyal çift tutulumları bulunur.

GBM yerleşim yeri ve invazyon alanına göre farklı fokal bulgular da görülebilmektedir [85]. Baş ağrısı bazı vakalarda tek taraflı, bazı vakalarda ise bilateral olduğu bildirilmiştir. Hastaların yaklaşık yarısında baş ağrısı 4 saatten uzun sürmekte ve uzun sürelerle bulantı ve kusma daha sık eşlik etmektedir [86]. GBM'in yer kaplayıcı etkisine bağlı kafa içi basınç artışına bağlı gelişen ağrı genel olarak iki taraflı hissedilirken, bölgesel olarak meninkslerin irritasyonunu sonucu ortaya çıkan baş ağrısı ise tek taraflı olarak hissedilir ve lezyonun lokalizasyonu ile ağrı yeri ilişkilidir [87].

Nöbet ise en sık temporal ve frontal lob yerleşimli tümörlerde görülür [85]. Fokal nörolojik semptomlar tümörün lokalizasyonu hakkında bilgi verir. Parietal lob yerleşimlerinde motor kayıp, yazma bozuklukları, konuşma bozuklukları, agnozi; temporal lob yerleşimlerinde amnezi, auralı nöbetler ve halüsinasyonlar; frontal lob yerleşimlerinde anosmi, kişilik değişiklikleri, koku duyusu değişimleri, oksipital lob yerleşimlerinde ise ipsilateral homonim hemianopsi şeklinde görme alanı kayıpları görülebilir [88]. Teşhis sırasında ortaya çıkan belirti ve semptomlar; hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ve tedaviye göre zamanla gerileyebilir, ilerleyebilir veya zamanla sabit kalabilir [89].

2.2.6. Glioblastoma'da Radyolojik Bulgular

Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MR), beyin ve omurilik lezyonlarının teşhisinde standart görüntüleme yöntemleri olarak kullanılmaktadır. BT / MR, non-invaziv olarak intrakranial tümörler hakkında bilgi sağlayabilir ve ayrıca tedavi ve takipte önemli bir rol oynar. Bununla birlikte tümör biyolojisi ve etkinliği hakkında daha spesifik bilgileri değerlendirmek için sınırlı bilgi sağlarlar [90]. GBM; BT'de izo yoğunluklu veya düşük yoğunluklu olarak izlenir, kalsifiye alanlar içerebilir. Hipodens ödem genellikle tümör bölgesinde görülür. Kontrast madde enjeksiyonundan sonra kontrast artışı olan alan tümöral bölgeyi gösterir. Bu tutulumun varlığı, yeni kan damarlarının oluşmasına bağlıdır. Yani bu bölgelerdeki görüntünün sebebi kan-beyin bariyerinin tahrip olmasının sonucudur.

İntratümöral alanlar ve yetersiz kan beslemesine sahip nekrotik alanlar da düşük yoğunluklu olarak kabul edilir. Ek olarak, BT cerrahi rezeksiyon sonrası kontrol için de kullanılan bir görüntüleme yöntemidir [91, 92].

MR, normal serebral anatomi ve parenkimal patolojiyi BT'den daha iyi gösterir. Heterojen bir görünüme sahip GBM'de; T1 ağırlıklı görüntüde, tümörün orta kısmındaki kistik veya nekrotik alan hipodens olarak izlenirken, düzensiz sınırları olan distal katı nodüller izodens veya hiperdens olarak izlenir. T2 ağırlıklı görüntülerde, genellikle merkez hipodens izlenirken, çevredeki heterojen yapılar hiperdens olarak görülür. T2 ağırlıklı görüntüleme tümör çevresindeki ödemli parenkimal dokunun görünümü de yine hiperdens olarak izlenir. Kontrast verilerek elde edilen görüntülerde kan-beyin bariyerinin tahrip olması nedeniyle, tümörün solid alanlarında da kontrast artışı gözlemlenecektir [92-95].

2.2.7. Glioblastoma Tedavisi

Günümüzde GBM tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ve bunların kombinasyonundan oluşan multidisipliner bir tedavi yaklaşımı söz konusudur. Hedefe yönelik tedaviler ise henüz deneme aşamasında olup, rutin tedavi şemasında yer almış değildir. Ancak farklı kanser türleri üzerinde yapılan gen tedavisi çalışmaları, GBM'in tedavisi için de umut ışığı oluşturmaktadır.

2.2.7.1. Cerrahi Tedavi

GBM cerrahisinin 4 temel amacı vardır:

- 1-Histolojik tanı,
- 2-Artan kafa içi basınç ve kompresyon bulgularını ortadan kaldırmak,
- 3-Yaşam kalitesini iyileştirmek ve
- 4-Sağkalımı uzatmak.

Histolojik tanı; cerrahi rezeksiyon, stereotaktik biyopsi veya açık biyopsi ile de yapılabilir. Ancak cerrahi kararlar verirken çok dikkatli olunmalıdır. Cerrahin temel amacı genişlemiş tümör hacminin tam bir cerrahi rezeksiyonunu yapmaktır. Bununla birlikte, glioblastoma fonksiyonel dokulara sızma eğiliminde olduğundan, etrafındaki

dokuların fonksiyonel durumu kapsamlı cerrahi rezeksiyondan önce ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir. Bazı durumlarda, kitle etkisini ortadan kaldırmak için planlı bir şekilde subtotal cerrahi gerçekleştirilebilir.

Ancak analizler, "glioma yaralanma sendromu" olarak tanımlanan, subtotal bir rezeksiyondan sonra kalan tümörlerde ödem ve sistemik koagülopatinin varlığını göstermiştir(39). Günümüzde birinci düzey kanıt olmamakla birlikte gros-total rezeksiyonun sağkalıma pozitif yönde katkısı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Dahası, nispeten "sessiz", dominant olmayan taraftaki temporal veya frontal loblarda lobektominin sağkalımı daha da iyileştirebileceğine dair artan kanıtlar vardır [96]. Günümüzde dünyada GBM cerrahisine yönelik ortak tutum, olası tüm teknik yöntemlerin desteği ile en güvenli rezeksiyondur [97].

2.2.7.2. Medikal Tedavi (Kemoterapi)

Kemoterapi, GBM'lerde alkilleyici ajanlar(temozolomid, prokarbazin, karmustin, lomustin, fotemustin, nimustin) ile temellendirilmiştir[98]. Temozolamid(TMZ) ve prokarbazin temel olarak DNA bazlarına metil grupları bağlararak etki eder. Buna karşın, daha toksik özelliklere sahip olan lomustin ve karmustin gibi ajanlar ise DNA sarmalları arasında çapraz bağlar da oluşturur. 2005 yılında Stupp ve ark.nın gösterdikleri temozolomidli radyoterapinin sağkalımı uzatabileceğine yönelik kanıt, bu şemanın standart tedavi olarak uygulanmasını sağlamıştır [1].

Bunun yanı sıra randomize faz II çalışmalardan görülen önemli yanıt oranına ve klinik faydalara dayanarak bevacizumab rekürren glioblastomaların kullanımı için 2009 yılında FDA onayı almıştır. Ancak henüz geniş çaplı faz III verileri mevcut değildir [99].

Vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) bağlanan bir monoklonal antikor olan bevacizumab, yeni teşhis edilmiş glioblastoma hastalarında rutin kullanım için önerilmemektedir. Bevacizumab'ın klinik fonksiyonları geliştirdiği ve bazı hastalarda antiödem estki göstererek glukokortikoid gereksinimini azalttığı bilinmesine rağmen, başlangıç tedavisinde verildiği takdirde sağkalım üzerine belirgin bir katkı sağlamaz ve yüksek toksisiteye neden olabilir [100].

Bu yüzden bevacizumabı, radyasyon tedavisi sırasında veya tamamlandıktan kısa bir süre sonra ortaya çıkabilecek refrakter ödem ve kitle etkisini kontrol etmek amacıyla, büyük, rezeke edilemeyen tümörleri olan seçilmiş hastalarda destekleyici bir ilaç olarak kabul edilmektedir.

2.2.7.2.1. Temozolamid

Küçük (194 Da) bir lipofilik molekül olan TMZ, imidazotetrazin sınıfının ağızdan kullanılabilen tek işlevli bir DNA alkilleyici ajandır [101]. TMZ, oral kullanıma izin veren bir özellik olan asidik pH değerlerinde stabil bir ön ilaç görevi görür [102]. Ancak, pH 7'in üzerinde labil hale geçer, 7.4 üzerindeki pH'da ise yarılanma ömrü yaklaşık 1.8 saattir [103]. Beyin tümörleri, çevreleyen sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında daha alkali bir pH'a sahiptir; bu, tercihen tümör dokusu içinde ön ilaç aktivasyonunu destekleyen bir durumdur [104]

Bu nedenle TMZ, beyin tümörlerini tedavi etmek için kullanılır (ancak glioblastoma mahsus değildir) ve GBM hastalarına önemli terapötik fayda sağlar [105]

Alkilleyici bir ajan olarak fonksiyon gösteren TMZ, DNA'da guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu eklemek yoluyla sitotoksik etkisini gösterir. Bu sitotoksik etki, tümöral hücrelerinde, hücre siklusunun G2/M fazında durmasını sağlayarak, hücrenin apoptozis'e doğru gitmesine neden olur [106]

Temozolomid sitotoksitesine esas olarak kanserojen, mutajenik ve toksik bir lezyon olan O6-MeG aracılık eder [107-110]

O6-MeG'nin intihar enzimi metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) tarafından doğrudan onarımı, metil eklentisini kaldırarak guanini geri kazandırır

Onarılmamış O6-MeG, DNA replikasyonu sırasında timinle (sitozin değil) yanlış eşleşerek DNA mismatch repair (MMR) mekanizmasını uyarır [111, 112]

MMR, yalnızca yavru iplikçikteki yanlış eşleştirilmiş timini tanır ve keser, ancak O6-MeG şablon iplikçikte kalır.

Bu nedenle, timin reinsersiyonunun ve eksizyonunun boş döngüleri kalıcı DNA ipliği kırılmalarına neden olarak replikasyon çatalı çökmesine neden olur [113]

A TR / CHK1'e bağlı sinyalleşme yolağıyla tedaviyi takiben ikinci hücre döngüsünde, G2/M evresinde duraklatılması tetiklenir; sonuç olarak apoptoz gerçekleşir [114-118]

Bu nedenle TMZ'ye iyi bir yanıt, işlevsel MMR ve düşük MGMT seviyeleri gerektirir.

Kantitatif olarak daha bol olan N7-MeG ve N3-MeA lezyonları, DNA bazlı eksizyon onarımı (BER) ile hızla onarılır. 7-MeG, belirgin bir şekilde sitotoksik görünmemektedir: aksine, N3-MeA lezyonları durdurulmadıkları takdirde ölümcüldür [119].

Bu nedenle, TMZ'nin etki mekanizmasını ve sitotoksitesini etkileyen en önemli DNA onarım sistemleri MGMT (doğrudan onarım), MMR ve BER'dir.

Temozolamid direncinde de en fazla sorumlu tutulan mekanizmalar da yukarıda bahsedilen MGMT, MMR ve BER'dir [120].

PARP-1 temel olarak eksprese edilir, DNA hasarına yanıt olarak aktive olur. Bu yüzden başarılı bir DNA hasar sinyali ve BER için anahtar rol oynayan bir proteindir. Tüm bu bilgiler ışığında daha önce yapılan çalışmalarda PARP inhibisyonunun TMZ aktivitesini güçlendirebileceğine yönelik bulgular mevcuttur [121-124].

Sunulan çalışmada, LC3 genin susturulması ile PARP ekspresyonunun da baskılanması öngörölmüş, bu sayede TMZ direncinin de azaltılması hedeflenmiştir.

Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda glioblastomun ana tedavisinde alkilleyici ajanlar dışında etkinliği gösterilmiş başka herhangi bir kemoteröpotik, hedefli ilaç, biyolojik ajan (immünoteröpotik, gen tedavisi, onkolitik virüs vs) olmamıştır [125].

2.2.7.3. Radyoterapi

Radyoterapi, kullanıma başlandığı 1950'li yıllardan itibaren gliomların tedavisinde gözle görülür bir şekilde sağkalıma katkıda bulunmuştur. Çok farklı teknik teknolojik yöntemler denenmiş olsa da günümüzdeki standart tedavi eksternal bım ışınlamadır [126]. GBM'de radyoterapi ekseriya 6 haftalık bir sürece yayılacak şekilde toplam 60 Gy olarak uygulanır. Yaşlı popölasyonda ise 40 Gy/20 gün şeklinde de uygulanımı vardır. Rekürren tümörlerde ise en önemli silahlardandır. Farklı uygulamalar olmakla

birlikte rekürrens durumunda en sık kullanılan yöntem; ikinci seri fraksiyonu radyoterapi ve radyocerrahidir.

2.2.7.4. siRNA Temelli Gen Susturma Tedavisi

Kromozomlar üzerinde bulunan genler, hücreler için hayati önem taşıyan proteinleri etkili bir şekilde üreten en küçük kalıtım birimleridir. Genlerdeki olası en ufak bir mutasyon, protein fonksiyonundaki değişiklikler nedeniyle hastalığa neden olacaktır [127]. Gen terapisi, temel olarak terapötik genetik materyalin, genetik ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde klinik yararlar elde etmek için en az toksisiteye yol açacak şekilde spesifik hücrelere veya dokulara aktarılması olarak tanımlanabilir [128-130]

Gen transfer stratejileri sayesinde gen fonksiyonları engellenebilir, geri yüklenebilir ve restore edilebilir veya yeni fonksiyonlar yeniden verilebilir [129]

Gen ekspresyonunu inhibe etmek için siRNA bazlı RNAi mekanizmalarının kullanılması ise, sadece spesifik gen fonksiyonlarını incelemek amaçlı olmayıp, aynı zamanda viral enfeksiyonlar, genetik ve kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarda da umut verici bir gen terapisi teknolojisidir.

Kanser tedavisinde tek bir genin bloke edilmesi genellikle hastalığı ortadan kaldırmak için yeterli değildir, bu nedenle birden fazla yolu aynı anda engellemek veya gen susturma stratejilerini diğer tedavi yöntemleriyle birleştirmek gerekir. Kemoterapi geleneksel kanser tedavi yöntemlerinden biridir olup, sağlıklı hücrelere verdiği zarar nedeniyle bu etkiyi ortadan kaldıracak şekilde yerini yeni nesil tedavi yöntemlerinin bırakmaktadır.

Son yıllarda geleneksel kemoterapi ile yeni geliştirilen siRNA temelli tedavilerin kombinasyonu yeni bir tedavi yolu olabilmesi açısından dikkat çekmiştir. Bu şekilde, kemoterapi ilaçları ve siRNA tedavisinin kombinasyonu, kemoterapinin yan etkilerini, olası tedavi direncini azaltmak için umut vericidir.

2.2.7.4.1. Küçük interferans RNA'lar (siRNA)

RNA interferans (RNAi), RNA aracılı doğal bir gen düzenleme sürecidir [131]. RNAi süreci, uzun çift iplikli RNA'nın Dicer enzimi ile parçalanması ile başlamaktadır.

Nükleaz aktivitesine sahip olan Dicer enziminin etkisi ile dsRNA 21-23 nükleotid uzunluğunda RNA'lara parçalanır, oluşan yapıya RNA indükleyici baskılama kompleksi (RISC) adı verilen bir multiprotein kompleksi bağlanır ve hedef mRNA parçalanır [132].

Küçük interferans RNA (siRNA)'lar, 21-25 nükleotid uzunluğunda çift iplikten oluşan kodlanmayan RNA'lardır [133]. İnterferans RNA (RNAi) yolağında yer alan siRNA'ların hedef dizileriyle oldukça iyi, mükemmel yakın eşleşme gösterirler. Bundan sebepten, hedef genlerin fonksiyonlarını saptamak amaçlı üretilen sentetik siRNA'lar son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

siRNA'lar, lipozom ve buna benzer sistemler kullanan basit transfeksiyon işlemi yoluyla kültürdeki hücrelere aktarılacakları gibi, direkt olarak gelişmiş canlı sistemlere de uygulanabilir [134, 135]. Tedavi amaçlı RNAi mekanizması, ilk kez kronik miyeloid lösemi'de kullanılmıştır. 22. kromozomda ortaya çıkan bir translokasyon sonucu normalin çok üzerinde aktive olan Bcr-Abl proteini siRNA kullanımıyla baskılanarak tedavi yoluna gidilmiştir [136]. siRNA'lar, yüksek spesifitesi, etkinliği, daha az yan etkisi ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle gen susturulması ve herhangi bir ilaç ile tedavi edilemeyen kanserlerin tedavisi için oldukça umut vericidir. Ancak, birçok başarılı klinik öncesi çalışma olmasına rağmen, klinik kullanım için hedefe spesifik nanotaşıyıcı ile beraber sadece birkaç siRNA onay alabilmiştir [137]. Bunun yanı sıra hala faz çalışması devam eden siRNA'lar vardır.2.3 (Tablo 2).

Tablo 2. Faz aşamasında olan siRNA temelli ilaçlar

siRNA temelli ilaç	Hedefi	Uygulanan Kanserler
CALAA 01	Ribonükleotid redüktazın M2 alt ünitesi	Solid Tümörler (Davis ve ark., 2)
The Atu – 027	Protein Kinaz N3	Metastatik Pankreatik Cancer (Aleku ve ark., 2008)
ALN-VSP02	Kinezin	Solid Tümörler (Cervantes ve ark., 2011)
TKM-PLK1	Polo-like kinaz	Gastrointestinal, Nöroendokrin Tümörler ve Adrenokortikal karsinoma (Xu ve ark., 2015)
DCR-MYC	c-Myc geni	Solid Tümörler ve Multiple Myeloma (Tolcher ve ark., 2015)

siRNA terapötiklerinin uygulamasında siRNA'ları hızlı yıkımı ya da hedef organa veya hücre içine taşınım gibi birçok zorlukta beraberinde gelir. Ancak siRNA yöntemi, başka ilaçların uygulanamadığı birtakım kanser ve diğer hastalık grupları için umut ışığı olan moleküller olarak karsımıza çıkmaktadır [138]. Farklı kanser türleri üzerinde yapılan gen tedavisi çalışmaları, GBM'in tedavisi için de umut ışığı oluşturmaktadır.

2.3. Otofaji

Kelime anlamı kendi kendini (auto) yeme (phagy) olan otofaji, açlıkta hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji, hücrenin kendi içeriği olan sitozolik proteinlerin veya organellerin otofagozomlar tarafından alınması ve yıkım için lizozoma taşınması, sonra da lizozomlarda yıkılan küçük moleküllerin tekrar kullanılmak üzere sitoplazmaya aktarılması olayıdır [139-142].

Otofajinin şaperon-aracılı otofaji, mikro-otofaji, makro-otofaji olmak üzere üç tipi bulunmaktadır [140, 143, 144]:

1. Şaperon aracılı otofaji: yüksek yapılı ökaryotlarda görülen otofaji tipidir. Şaperon protein önce hedefi olan sitozolük proteine bağlanır ve daha sonra da lizozom membranında bulunan reseptörüne bağlanır. Sitolük protein yıkım için lizozom içine alınır.

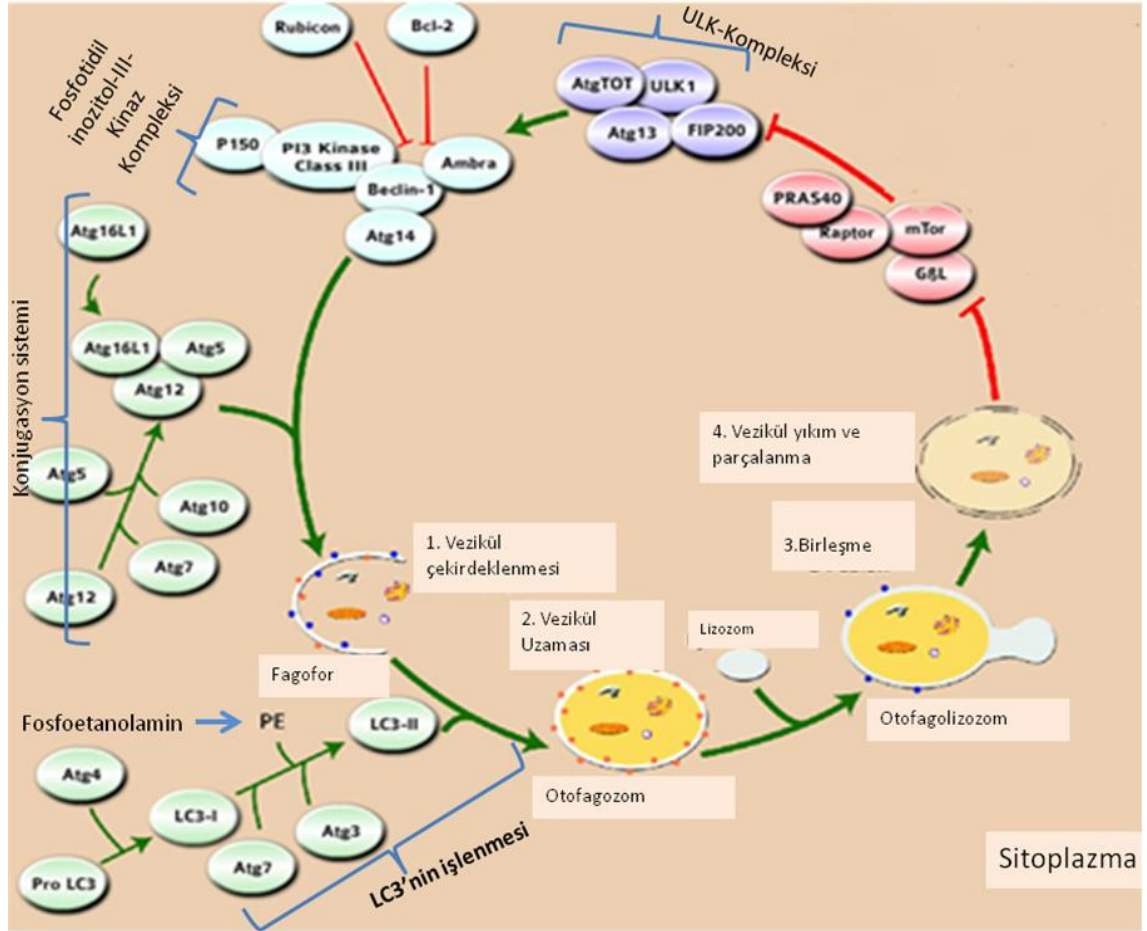
2. Mikro-otofaji: lizozom membranın içe doğru çıkıntı oluşturmasıyla sitoplazmik materyalin lizozomda doğrudan yıkılmasıdır.

3. Makro-otofaji: çift membranlı vezikül olan otofagozom oluşmasıyla tanımlanır. Makro-otofaji sırasında, sitoplazmik proteinler, organeller ve diğer bileşenler fagoforla çevrelenir. Fagofor genişler ve otofagozoma dönüşür. Otofagozom lizozom membranıyla birleşir ve otolizozoma dönüşür ve asit hidrolazlar tarafından sitoplazmik bileşenlerin yıkım gerçekleşir. Yıkım sonucu oluşan ürünler yeniden kullanılmak üzere lizozom membranında bulunan permeazlar tarafından tekrar sitozole taşınır.

Bu üç otofaji tipinden makro-otofaji en çok çalışılan otofaji tipidir [140, 143]; ve literatürde "makro-otofaji" otofaji olarak ifade edilmektedir.

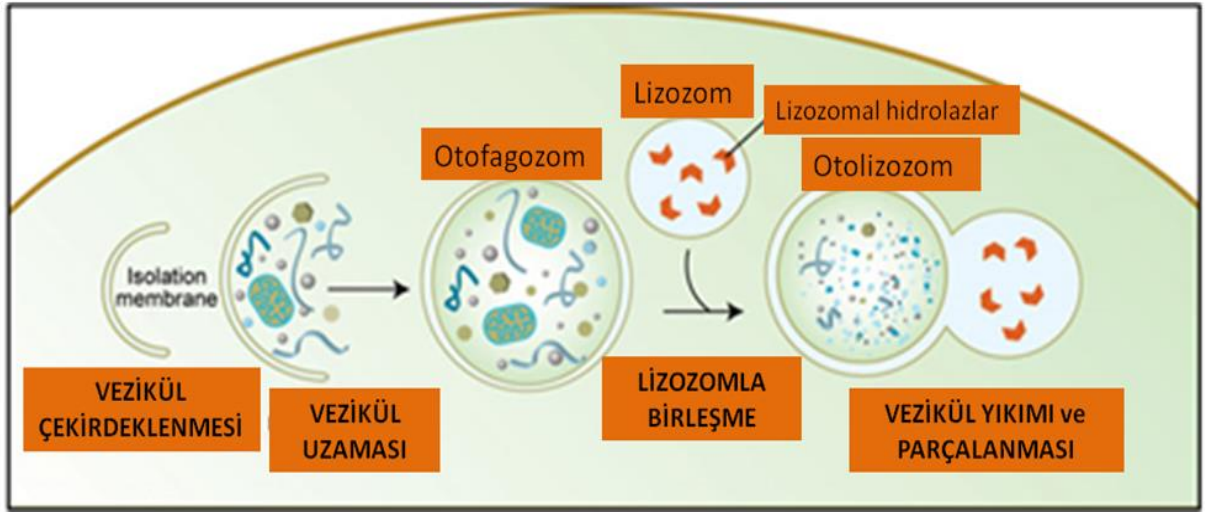
Sunulan çalışmada da makro-otofaji sinyal yolağı çalışılmıştır.

Mayalarda yapılan çalışmalarda otofaji ile ilgili (autophagy-related(Atg)) en az 37 protein tanımlanmıştır [82, 141, 144]. Otofaji için esas olan Atg proteinleri, integral membran proteinlerini, Atg9 ve en az dört büyük multiprotein kompleksini içerir. Bu proteinlerin herbirinin tam olarak görevi tanımlanmamakla birlikte otofajinin farklı basamaklarında görev yaparlar (Şekil 1).



Şekil 1. Otofaji işlevinde görev alan proteinler. ULK kompleksi (Unc-51-like Kinase) fagofor oluşumunu tetikler. PI3K (Fosfotidilinozitol-III-Kinaz) kompleksi fagoforun uzaması ve otofagozomun tamamlanması için gerekli olan konjugasyon sistemi ile etkileşime girer ve uyarır. Konjugasyon sistemi; LC3'ü aktive eder. Aktifleşen LC3 konjugasyon sistemi aracılığı ile PE (fosfotidiletanolamin)'ye bağlanır. Atg4 ve diğer Atg proteinleri LC3'ün işlenmesini sağlar. Son basamak olan otofagozomun lizozomla birleşmesi için otofagozom membranından Atg proteinleri uzaklaştırılır, otofagolizozom oluşur ve yıkım gerçekleşir (Autophagy- Covalab Biotechnologywww.covalab.com).

Otofaji (makro-otofaji), uyarılma, vezikül oluşumu, vezikül uzaması, vezikülün tamamlanması ve vezikülün lizozomla birleşmesi olmak üzere birçok basamağı içeren bir süreçtir (Şekil 2).



Şekil 2. Otofaji basamaklarının şematik diyagramı. Otofaji membran izolasyonu ve vezikül çekirdeklenmesi ile başlar, bu basamağı vezikül uzaması ve olgunlaşması takip eder. Olgunlaşmasını tamamlamış olan otofagozom lizozomla birleşir, otolizozom oluşur. Lizozomda bulunan hidrolaz enzimleri tarafından otofagozom içeriği otolizozomda parçalanır (Autophagy in C. elegans www.wormbook.org).

1. Otofajinin uyarılması ve fagofor oluşumu: Otofajinin oluşumunu başlatan en önemli faktör açlıktır, yani temel besin maddelerinden herhangi birinin bulunmaması otofajiyi başlatabilir. Otofajinin temel inhibitörü, mTOR (target of rapamycin) proteini olup, serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu kinaz besin varlığında, protein kinaz olan Atg1'i negatif olarak düzenler. Açlıkla mTOR'un inhibisyonu, Atg1'in aktivasyonuna sebep olur. Aktifleşen Atg1, diğer Atg proteinlerini fosforilleyerek otofagozom oluşumunu başlatır. Otofagozom oluşumundaki ilk basamak fagofor oluşmasıdır. Atg1'in memelilerdeki homoloğu ULK (Unc-51-Like Kinase) kompleksi olup, otofagozom oluşumunu başlatır. ULK kompleksi ULK1, ULK2, Atg13, fokal adezyon kinaz proteini olan FIP200 ve Atg101 proteinlerini içerir. Açlıkta mTOR inhibisyonu ULK kinazı aktive eder. Aktifleşen ULK, Atg13 ve FIP2000 proteinlerini fosforiller ve böylece fagofor oluşumu tetiklenir [142, 145-148] (Şekil 1, 2).

2. Fagofor uzaması ve olgun vezikül oluşumu: Fagofor oluşumunun başlangıç aşamasında, fagofor membranın yapılıması için fosfotidilinozitol-3- kinaz (PI3-K) kompleksi gereklidir. Bu kompleks membran için gerekli olan protein ve lipidlerin toplanmasını sağlar. IP3-K kompleksi, fagoforun uzaması ve otofagozomun tamamlanması için gerekli olan ubikutin-benzeri konjugasyon sistemiyle etkileşime girer (Şekil 1). Bu konjugasyon sisteminde görev alan Atg proteinleri LC3'ü aktive eder (Şekil 1). Aktifleşen LC3, Atg4'ün de rol aldığı Atg proteinleri tarafından işlendikten

sonra, hedefi olan lipid fosfotidil etanolamin (PE)'e bağlanır. Lipid bağlı forma transforme olan LC3, fagofor membranına yerleşerek otofaji için fagoforun genişlemesine ve tamamlanmasına sebep olur. (Şekil 1, 2) [5, 142, 145-147].

3. Olgunlaşmış fagozomun (vezikülün) lizozomla birleşmesi: Otofajide son evre, matüre olan otofagozomların, endolizozom membranı ile konjugasyonudur (Şekil 2). Bu basamak matür otofagozom membranından Atg proteinlerinin ayrılmasını gerektirir. Bu işlem de başta Atg4 olmak üzere yine bazı Atg proteinleri tarafından düzenlenir [5, 145-147, 149] (Şekil 1). Otofagozomun lizozomla konjugasyonu sonrası, vezikül içeriğinin yıkımı lizozomda yer alan asit-hidrolaz enzimlerince gerçekleştirilir. Yıkım sonrası ortaya çıkan küçük moleküller, özellikle amino asitler, açlık döneminde hücresel işlevlerin korunabilmesi için tekrar sitoplazmaya transfer edilir [5, 143, 145, 147].

2.3.1. Otofaji ve kanser ilişkisi

2.3.1.1. Otofajinin Fonksiyonu

Otofaji, hücre gelişiminde ve homeostazisinde önemli bir role sahiptir. Otofajinin primer görevi, açlık gibi stres şartlarına karşı hücreleri korumaktır. Açlık süresince otofaji sitoplazmik bileşenlerin yıkımını sağlar. Böylece yeni proteinlerin sentezi ya da ATP üretimi için ihtiyaç duyulan amino asit ve yağ asiti ihtiyacı karşılanır. Bununla birlikte otofaji aşırı uyarıldığı zaman, hücre ölümüne yol açabilir ve bu ölüm tipi, tip-II programlanmış hücre ölüm tipi olarak adlandırılır [5, 140, 147, 150].

Normal şartlar altında ve kısa süreli açlık süresince amino asit konsantrasyonunun korunması için otofajiden daha çok ubiquitin proteozom sistemi kullanılır. Ancak, birkaç saat devam eden açlık sırasında gerekli olan amino asitler otofaji ile üretilir. Besin kıtlığına ilaveten, hipoksik şartlar, metabolik stres de otofajiyi uyarır. Metabolik stres tipik olarak apoptozu indükler ama, apoptoz mekanizmasının bozulduğu hücreler hipoksik şartlar altında yaşamaya devam eder. Bu hücrelerin canlı kalması otofajiye bağlıdır. Hem apoptozis hem de otofaji baskılandığı zaman hücre canlılığını sürdürmede başarısız olur ve ölür [5].

Otofaji ya da fonksiyonundaki bozukluklar, kanser, kalp hastalıkları, nörodejenerasyon, gastrointestinal hastalıklar gibi patolojik durumlara yol açar [151, 152]. Birçok durumda

otofajinin çok ya da az olması hem pozitif hem de negatif etkiye sebep olur. Otofaji ile ilgili yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre, hücrelerde otofajik aktivitenin bozulması patolojik sonuçlar doğurabileceğinden, otofaji çok sıkı bir şekilde düzenlenmek zorundadır. Dolayısıyla, otofajinin terapötik amaçla kullanılabilmesi için, otofajiyi düzenleyen mekanizmaların çok iyi anlaşılması gerekmektedir [143, 147].

2.3.1.2. Otofaji ve Kanser Arasındaki İlişki

Katabolik rolünden dolayı otofaji, kanser gelişiminin başlangıç basamaklarında hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan koruyucu bir mekanizma olarak gösterilmektedir. Hipoksi, metabolik stres, kemoterapik ya da radyoterapik tedaviler otofajiyi tetikler. Tümör başlangıcında meydana gelen hipoksi ve metabolik stres şartlarında, pre-kanser ve kanser hücrelerinin enerji ihtiyaçlarının karşılanması, ATP seviyesinin korunması için, bu hücrelerde otofaji aktive edilir. Aynı zamanda otofaji, hücre ölürken özellikle apoptozun başlaması, apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu için ihtiyaç duyulan ATP gibi enerji kaynaklarının sağlanmasına da destek verir. Diğer taraftan da, otofajinin, tamoksifen gibi hormonal terapiler ve DNA hasarlayıcı ajanların yol açtığı apoptotik hücre ölümünü baskıladığı gösterilmiştir [145] Dolayısıyla, otofaji ve kanser arasındaki ilişki ile ilgili literatür oldukça karmaşık olup elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyumluluk göstermemektedir [140, 153, 154].

Özpolat ve ekibi meme kanser hücrelerinde siRNA kullanarak otofaji ile ilişkili hedef genleri susturduklarında, otofajik hücre ölümünün uyarıldığını ve baskılanmış otofajinin şu anda kullanılan tedavilerin etkisini artırabileceğini göstermişlerdir [155]. Yine, Özpolat ve ekibi, pankreatik kanser hücrelerinde otofajide anahtar rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarını baskıladıklarında otofajik hücre ölümünün tetiklendiğini göstermişler ve baskılanmış otofajinin tedaviye yanıt vermeyen kanser hücrelerinde alternatif bir mekanizma olabileceğini önermişlerdir [156]. Yine bazı araştırmacılar, otofajide rol alan Atg6, Beclin-1, Atg10 ve Atg12 genlerini siRNA ile ya da bafilomisin gibi farmakolojik inhibitörlerle susturarak otofajiyi baskıladıklarında, baskılanmış otofajinin kanserlerde kullanılan terapötik ajanların etkisini artırdığını göstermişlerdir [157, 158]. Ancak bazı çalışmalar, otofajinin düşük ekspresyonunun kanserin ilerleyişine katkı sağladığını, ayrıca otofajinin aşırı ekspresyonunun kanser hücrelerinin daha az agresif bir davranış sergileyerek kemoterapiye daha duyarlı hale gelmesine yol açtığını

göstermişlerdir [159, 160] Hamurcu ve ark, otofajinin agresif meme kanser hücrelerinde bir onkogenik mekanizma olarak davrandığını ve LC3-siRNA aracılı otofajinin baskılanmasının agresif meme kanser hücrelerinde proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu önemli oranda baskıladığını göstermiştir [161].

Sonuç olarak, bazı çalışmalar otofajinin hücre ölümüne yol açarak tümör süpressör bir rolü olduğunu, bazı çalışmalar ise otofajinin tümör hücrelerini yaşamaya ve çoğalmaya teşvik ederek onkogen olarak davrandığını ortaya koymuşlardır [145, 146, 162] Bununla birlikte, terapötik hedef olarak otofaji modülasyonu, tümör büyümesini inhibe etmek ve geleneksel tedavilerin etkinliğini arttırmak için kullanılabilir. Kanser tedavilerinde FDA onaylı temsirolimus ve everolimus gibi otofaji modülatörleri olan bazı farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır [163]. Şu anda, ULK kinaz inhibitörleri, Vps34 inhibitörleri, ATG4 inhibitörleri, klorokin, hidroksil gibi otofajinin inhibisyonu için veya Temozolomide, Rapamisin ve Metformin gibi otofaji indükleyici olarak bir dizi küçük molekül klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır [163, 164].

2.4. Sunulan Tez Çalışmasında Hedef Alınan LC3 Geni

1. Atg8 (LC3): Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3), Mayalarda tanımlanan 37 Atg proteinden, görevi en iyi şekilde açıklanan Atg8 (memelilerde homoloğu LC3) proteindir [165]. LC3B geni otofajide anahtar role sahip bir regülatördür ve memeli hücrelerinde otofagozomların formasyonu için temel oluşturur. LC3, ubiquitin benzeri bir protein olup, sitoplazmada LC3-I formunda serbest halde bulunur. Otofaji uyarıldığı zaman, LC3-I fosfotidiletanolamin bağlanır ve LC3-I formundan LC3-II formuna dönüşür. LC3-II (fosfotidiletanolamin bağlı formda iken) otofajik membranın yüzeyine yerleşir, otofagozomun uzamasında, olgunlaşmasında görev yapar [141] (Şekil 1). Bu nedenle, LC3-II otofajiye özgü bir belirteç olarak kullanılmaktadır [166].

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Gereçler

Çalışmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

- Laminar Akım Kabini (Clean Air, Esco Airstream®, Class II)
- CO₂'li İnkübatör (Panasonic, MCO-19 A/C (UV))
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Counter)
- Hassas Terazi (Sonyo)
- Su banyosu (Sanyo)
- Çalkalayıcı (Heidolph)
- Derin Dondurucu -20°C (Uğur)
- Buzdolabı +4°C (Siemens)
- İnvirt Mikroskop (Leica)
- Otoklav (Alp, CL-40M)
- Pipet Tabancası (Gilson)
- Mikropipet seti (Gilson)
- Vorteks (Heidolph)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)
- Biorad Western Görüntüleme Cihazı (ChemiDoc MP)
- Floresan Mikroskop (Nicon TI)
- SDS PAGE Sistemi (BioRad)
- ELISA Algılama Sistemi (Promega)
- Thoma Lamı (Neubauer)

Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

- DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)
- Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- L-Glutamine (Gibco)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco)
- Tripsin-EDTA (%0,05) (Gibco)
- Serolojik Pipet 5 ml, 10 ml, 25ml (Greiner Bio-one)
- Steril 6, 24, 96 Kuyucuklu Plaklar (Greiner)
- Pipet uçları (0,5-10, 10-100, 200-1000 µl) (Greiner)
- 25cm² ve 75cm² 'lik Hücre Kültür Plakları (Greiner)
- Steril Cryo Tüp (Isolab)
- Fosfat Buffer Saline (PBS) (Biochrom)
- Metanol (Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)
- Blotting Grade Blocker (BioRad)
- Tween 20 (BioRad)
- Glycine (Sigma)
- Tris (Merck-Millipore)
- Immun Blot PVDF Membran (BioRad)
- Jel (Mini-Protean TGX, Precast Gel)
- Filtre Kağıdı (BioRad Thick Blot Paper)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Gibco Invitrogen)
- Mutlak etanol ve 70% etanol
- LC3#1-siRNA (SASI_Hs02 00356118_AS)
- LC3#2-siRNA (SASI_Hs01 00212378_AS)
- Kontrol siRNA (mission siRNA Universal negatif Control#2)
- Hyperfect transfeksiyon ajanı (Qiagen)
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumve (MTS Reagent powder)
- Phenazine methosulfate (PMS)
- Kristal Viyole (violet) Çözeltisi (%10)
- Acridine Orange Boyası
- Temizolomid (TMZ) (Sigma-Aldrich)

Çalışmada Kullanılan Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Buffer

- 1 ml Cell lizis buffer
- 10 µl proteaz inhibitör kokteyl
- 10 µl fosfataz inhibitör kokteyl
- 4 µl NaF

Yürütme ve Transfer Solüsyonu 1L (10X)

- 30 gr Tris-Base
- 144 gr Glisin

Yürütme Solüsyonu 1L (1X)

- 100 ml 10X Yürütme Solüsyonu
- 890 ml dH₂O
- 10 ml %10 SDS

Transfer Solüsyonu 1L (1X)

- 100 ml 10X Transfer Solüsyonu
- 200 ml Metanol
- 700 ml dH₂O

Tris Buffered Saline 1L (TBS) (10X)

- 31.5 gr Tris-HCl
- 80 gr NaCl

TBS-Tween 20 (TBS-T) Çalışma Solüsyonu 1L

- 100 ml 10X TBS Buffer
- 898 ml dH₂O
- 2 ml Tween-20

Non- Fat Dry Milk Solüsyonu

- 350 mg non-fat dry milk
- 7 ml TBS-T

Kristal Viole Boya Solüsyonu

- 0,2 gr Kristal Viole

- 40 ml Metanol

Acridine Orange (AO) Boya Stok Solüsyonu

- 5mg Acridine Orange
- 1ml Etanol

Temizolomid Stok Solusyonu

- 2 mg TMZ
- 1 ml DMSO

3.2. Yöntem

Kullanılan hücre hatları

Çalışmamızda agresif GBM hücre hattı olarak insan kökenli U-87 (mutant olmayan) hattı kullanıldı. Hücre hatları ticari olarak ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alındı.

Hücre kültürü

Çalışmamızda kullanılan hücreler, steril şartlar altında uygun büyüme besiyeri (medya) kullanılarak önce %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübasyona bırakılarak çoğalması sağlandı, sonra pasajlama işlemleri yapıldı. Hücre kültürü çalışmalarının tamamı ve kültür işlemleri için gerekli olan malzemelerin hazırlanması steril laminar hava akımlı kabinlerde gerçekleştirildi.

Besiyeri Hazırlanması

DMEM/F12 medyum ortamına, inaktive edilmiş FBS (%5), L-glutamin (%1) ve Penisilin/Streptomisin (%1) ilave edilerek hücrelerin çoğalması için uygun besiyeri hazırlandı. Hazırlanan medyum kullanıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi, kullanmadan önce çıkartılarak su banyosunda 37°C 'ye getirildi, daha sonra çalışmalarda kullanıldı.

Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

Deney süresince tüm hücre kültürü aşamaları, çalışma öncesinde ultraviyole ışık ve %70 etanol ile sterilize edilen laminar hava akımlı çalışma kabininde yapıldı. Önceden

dondurulmuş ve kriyo vial içerisinde -196°C 'de sıvı azot tankında muhafaza edilen hücre hatları, sterilize edilmiş kabin içerisine alınarak buz üstünde erimeye bırakıldı. Çözünen hücreler 15 ml'lik steril falkon tüpe alındı ve üzerine 9 ml FBS (+) besiyeri eklendi ve 1500 rpm $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1ml FBS (+) besiyeri eklenerek, pipetaj yapıldı. Hücre kültürü için pelletin büyüklüğüne göre 25 cm^2 ya da 75 cm^2 'lik flask tercih edildi. Tercihe göre, 25 cm^2 'lik flask içerisine 4 ml, 75 cm^2 'lik flask içerisine 10 ml FBS (+) besiyeri eklendi. Besiyeri üzerine hücreler eklendi ve flask 37°C %5 CO_2 'li inkubatörde inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

Bu süreç içerisinde hücreler inverted mikroskopta incelendi. Hücrelerin flasklardaki yoğunluğu %80-90'lara ulaştığı zaman (konfluense) flask içerisindeki ölü hücreleri ve artıkları uzaklaştırmak için besiyeri atıldı ve flask tabanına tutunan hücreleri kaldırmak amacıyla 75 cm^2 'lik flask'a 3 ml, 25 cm^2 'lik flask'a 2 ml %0.05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C %5 CO_2 'li inkubatörde 2-3 dakika bekletildi. Hücrelerin tamamının kalktığından emin olmak için mikroskop altında incelendi. Tripsin aktivitesini sonlandırmak için flasklara eklediğimiz tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri eklendi ve flask tabanı iyice yıkandıktan sonra hücreler 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı ve 1500 rpm $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, supernatant kısmı atıldı, kalan pellet medyumla çözdürüldü ve medyum içeren yeni T-45'lik flasklara transfer edildi ve hücrelerin bu şekilde pasajlanması ile hücrelerin sürekli çoğaltılması sağlandı.

Hücrelerin dondurulması

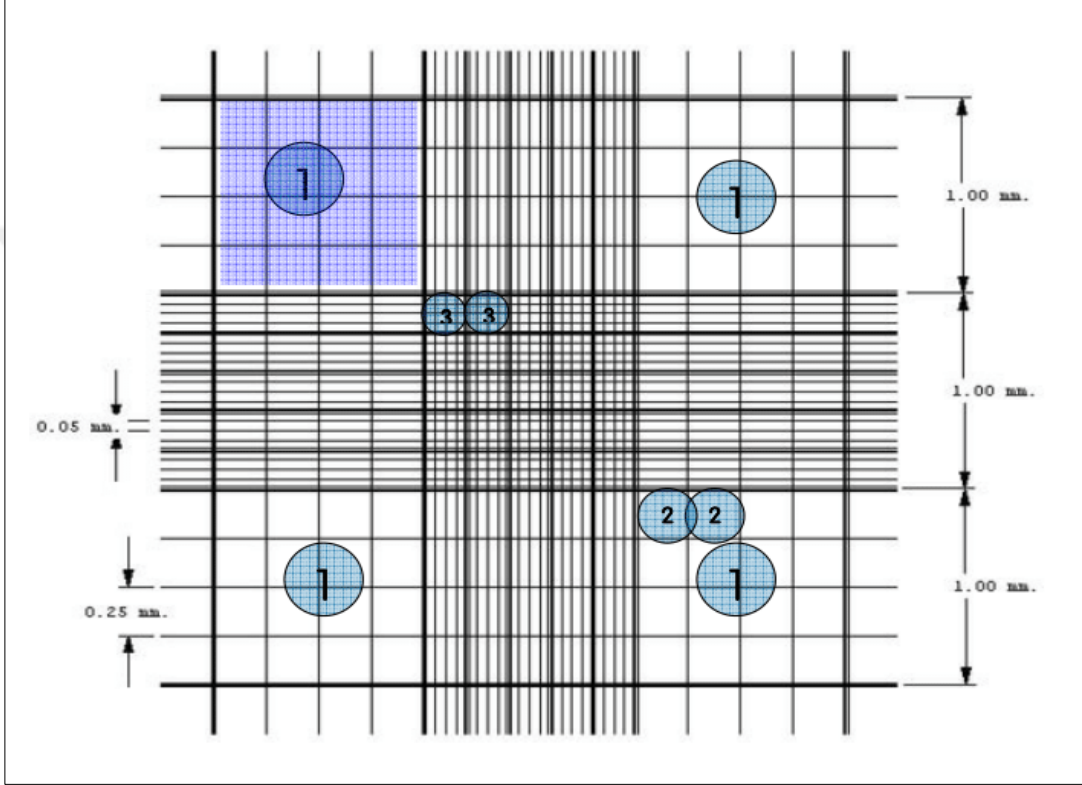
Çalışma dışında kullanılmayan hücreler depolanmak üzere %95 tam kültür medyum ve %5 DMSO (9:1 oranı) olacak şekilde dondurularak muhafaza edildi. Bunun için hücreler kademeli şekilde önce -80°C 'de bekletildi, daha sonra 196°C 'lik sıvı azot tankında ileride kullanılmak üzere saklandı.

Hücrelerin sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, Thoma lamı kullanıldı. Santrifüj edilerek toplanmış hücre pelleti taze medyum içerisinde çözdürülerek süspansiyon edildi. Sonra bu hücre süspansiyonundan 10 μl alınarak Thoma

lamina konuldu ve üzeri lamelle kapatıldı. Daha sonra invert mikroskop kullanılarak 40x büyütmede uygun karelerde yer alan canlı hücreler sayıldı ve ortalaması alındı (Şekil 3). Falkondaki hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$1ml'deki hücre sayısı = sayılan bölgelerin ortalama sayısı \times 10^4$$



Şekil 3. Thoma laminanın sayım yapılan kareleri (Toplam görüş sahası) [167].

Hücrelerin siRNA ile Transfeksiyonu

U87 mutant olmayan(wild type) GBM hücrelerinde LC3 genini baskılamak amacıyla bu genleri hedefleyen iki farklı LC3-siRNA (LC3#1 ve LC3#2 siRNA)'ları ve negatif kontrol olarak herhangi bir geni hedeflemeyen kontrol siRNA kullanıldı. siRNA'lar, Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde nükleaz-free su ile laminar hava akımlı kabinde hazırlandı. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonu için transfeksiyon ajanı olarak hiperfekt kullanıldı. Tüm deneylerimizde hücrelerin çoğaltıldığı kültür ortamına son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde siRNA'lar eklendi ve tüm deneylerimizde hücrelerin 72 saat siRNA'larla transfekte edilmesi sağlandı. Bunun için, deneyin amacına uygun şekilde hücreler kültür kapların

ekildi ve 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan 24 saat sonra hücrelerin çoğaldıkları kültür ortamına siRNA'lar eklendi ve 72 saat boyunca 37°C'de CO₂'li etüvde tranfeksiyonu sağlandı. 72 saat dolunca kültür sonlandırıldı ve deneyin amacına uygun testler yapıldı.

Hücrelerin Temozolomid (TMZ) ile muamelesi

Temozolamid (Sigma, CAS: 85622-93-1) DMSO'da çözülerek stok solüsyon hazırlandı ve hücrelerin farklı konsantrasyonlarda TMZ ile muamele edilmesi için; stok olarak hazırlanmış TMZ medyum ile dilüe edildi ve hücreler farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 500 ve 600 µM) TMZ ile 72 saat boyunca muamele edildi.

Hücre Proliferasyon/Canlılık (MTS) Analizi

Hücrelerin proliferasyon/canlılık oranını analiz etmek için MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) analizi kullanıldı. Bu analiz için, çalışmamızda kullanılan hücreler uygun sayıda (1000 hücre/100 ml) 96'lık kaplara ekildi ve 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. Bir kısım hücreler inkübasyonlarının 24.saatinde iki farklı LC3-siRNA (LC3#1, LC3#2) ve kontrol siRNA'lar ile transfekte edildi. TMZ'nin %50 ve %25 öldürme oranını (IC:50) belirlemek için bir kısım hücreler farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 500 ve 600 µM) TMZ ile 24., 48. ve 72 saat muamele edildi. Bir kısmı hücrelere ise hiçbir uygulama yapılmadı bir kısım hücreler ise DMSO ile muamele edildi. Kültür süreleri dolunca kültür sonlandırılarak hücreler MTS/PMS solüsyonu ile muamele edildi. Bunun için; MTS/PMS (phenazine methosulfate) solüsyonundan (1000:50) her kuyucuğa 20 µl eklenerek yaklaşık 2-3 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ELISA okuyucuda 450 nm'de hücrelerin canlılık oranları ölçüldü.

Western Blot Analizi

Hücrelerin lizis edilmesi ve protein izolasyonu

Western blot analizi hücrede hedefe yönelik spesifik protein seviyelerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. İki farklı LC3-siRNA (LC3#1 ve LC3#2 siRNA), TMZ ve TMZ+LC3 siRNA'ları uygulanan IDH-mutant ve IDH-mutant olmayan GBM hücrelerinde hedef proteinlerin (hücre çoğalması, migrasyonda ve invazyonda rol alan,

Siklin-D1, İntegrin β 1, p-Src, Src, PARP ve otofajide görev alan LC3ekspresyon seviyelerini belirlemek için Western blot analizi yapıldı. Bunun için, uygun sayıda hücreler önce T-25'lik flaklara ekildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde bir kısım hücreler iki farklı LC3-siRNA (LC3#1 ve LC3#2 siRNA)'ları ve negatif kontrol olarak herhangi bir geni hedeflemeyen kontrol siRNA ile, bir kısım hücreler TMZ (20 ve 40 μ M) ile ve bir kısım hücreler de TMZ (20 ve 40 μ M)+LC3-siRNA (LC3#1 ve LC3#2 siRNA)'ları ve TMZ (20 ve 40 μ M)+Kontrol siRNA ile 72 saat boyunca maruz bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültür sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Hücrelerin toplanması için; hücrelerin bulunduğu ortamdaki medya uzaklaştırıldı ve üzerine 2 ml tripsin ilave edilip, 3 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin yapışıkları flakın tabanından kalkması sağlandı. Sonrasında ortama tripsin miktarının 2 katı kadar medya eklendi ve sonrasında elde edilen hücre süspansiyonu falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 1 ml PBS eklenip süspanse edildi. Ependorf tüpe alınan süspansiyon 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve dipte kalan hücreler lizis edildi. Hücrelerin lizisi ve protein izolasyonu için; pellet miktarına bağlı olarak üzerine lizis buffer ilave edildi ve sonrasında buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Ardından hücreler seri bir şekilde 30 saniye vortekslenerek 15 dakika yine buz üzerinde inkübe edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Vorteks basamakları sonrasında hücreler 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Sonrasında, içerisinde protein bulunan süpernatant temiz ependorf tüpe alındı. Daha sonra izole edilen proteinleri konsantrasyonları hesaplandı. Protein konsantrasyonlarının hesaplanması için; yeni ependorflara izole edilen proteinlerden 2 μ l alınarak üzerine 12 μ l distile su (dH_2O) ilave edildi. Sonra, 96 kuyucuklu plakalara hazırlanan protein standartlarından ve seyreltilen protein karışımından 5'er μ l eklendi. Her standart ve protein örnekleri ikili çalışıldı. Protein örneklerinin ve standartların üzerine Reagent A + Reagent S karışımından 20 μ l ilave edildi. Ardından herbirine 175 μ l Reagent B eklendi ve 3 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra Eliza okuyucu 750 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ölçüm sonrası protein standartlarının değerleri kullanılarak bir standart eğri elde edildi. Süpernatantların ortalamaları hesaplandı ve western blot analizinde jele yüklenecek protein miktarları belirlendi.

Proteinlerin Jele yüklenmesi

750 nm dalga boyunda elde edilen absorbans sonuçlarına göre protein konsantrasyonu 40 µg olacak şekilde örneklerden alınacak miktar hesaplandı ve ependorflara hesaplanan miktarlarda protein ve 17 µl loading buffer eklendi. Son hacim 52 µl olacak şekilde dH₂O eklendi. Isıtıcıda 5 dk 99°C'de inkübe edildi. Western tankının içerisine running buffer eklendi ve uygun bölmeye jel yerleştirildi. Jeldeki kuyucuklara protein markerdan 10 µl, örneklerden 40 µl yüklendi. Güç kaynağı 50 volt'a ayarlanarak yaklaşık 2-3 saat proteinlerin jelde ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı.

Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Jelin büyüklüğüne göre membran ve filtre kağıtları kesildi. Membranın sağ üst köşesi etiketlendi. Membran önce methanol, sonra dH₂O'da bir süre bekletildi. Filtre kağıtları ve sünger transfer buffer içerisinde ıslatıldı. Yürütülen jel çıkartıldı ve sandviç modeline göre transfer aparatına yerleştirildi. Bu modele göre sırayla; sünger, filtre kağıdı, membran, jel, filtre kağıdı, sünger şeklinde yerleştirildi. Sonrasında transfer aparatı, transfer solüsyonu içeren transfer tankına yerleştirildi. Daha sonra, +4 °C'de buz aküleri ile desteklenen transfer solüsyonu içerisinde 24 mA akımda bütün gece bekletilip proteinlerin jelden polivinilidinden membran (PVDF) membrana aktarılması sağlandı. Transferin sonunda membran, 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu içeren solüsyonu ile bloklandı ve sonrasında membran 3 kez 5'er dakika periyotlarla çalkalayıcı üzerinde TBS-T solüsyonunda yıkandı. Daha sonra hedeflediğimiz proteinlerin ekspresyonunu belirlemek için (Siklin-D1 (tüm antikorların markası), İntegrin β1, p-Src, Src, PARP ve LC3) membran bütün gece membran +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde antikorla inkübe edildi. Daha sonra, Horseradish Peroxidase (HRP) ile işaretlenmiş sekonder antikor ile muamele edildi. Sonrasında yıkamalar yapıldı ve hedef protein ekspresyonlarını belirlemek için standart Enhanced chemiluminescence (ECL) metodu kullanılarak membran BioRad kemoluminesan cihazı kullanılarak görüntüleme yapıldı. Yükleme kontrolü olarak β-aktin (Proteintech, 60008-1-1g) kullanıldı. ImageJ programı kullanılarak hedef proteinlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Klonojenik Tespit

Kanserli hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma düzeylerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bunun için hücre tipine uygun medya bulunan 6'lık kaplara uygun miktarlarda U87 mutant olmayan hücrelerin ekimi yapıldı. İnkübasyonlarının 48. saatinde bir kısım hücreler iki farklı LC3-siRNA (LC3#1, LC3#2) ve kontrol siRNA'lar ile transfekte edildi. Bir kısım hücreler TMZ (20 ve 40 μ M) ile muamele edildi. Bir kısım hücreler ise TMZ (20 ve 40 μ M)+LC3 siRNA (LC3#1, LC3#2) ve TMZ (20 ve 40 μ M)+Kontrol siRNA ile muamele edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. Uygulama yapılmayan bu hücrelerde yeteri kadar klon oluşumu tespit edildiğinde (kabın tabanı tamamen dolduğunda) kültür sonlandırıldı. Hücrelerin bulunduğu ortamdan medya uzaklaştırıldı ve metanolle hazırlanmış %10'luk kristal-viyole ile kap tabanında oluşan klonların boyanması sağlandı. Daha sonra kaplar oda ısısında kurutulunca klonlar sayılarak analiz edildi.

Migrasyon tespiti (Wound healing assay)

Kanser hücrelerinin migrasyon düzeyini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. siRNA, TMZ ve TMZ+siRNA kombin uygulamasının GBM hücre hatlarının migrasyon kapasitesi üzerindeki etkilerini görmek için migrasyon (yara iyileşme) deneyi yapıldı. Bunun için hücre tipine uygun medya bulunan 6'lık kaplara uygun miktarlarda hücreler ekildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde bir kısım hücreler iki farklı LC3-siRNA (LC3#1, LC3#2) ve kontrol siRNA'lar ile transfekte edildi. Bir kısım hücreler TMZ (20 ve 40 μ M) ile muamele edildi. Bir kısım hücreler ise TMZ (20 ve 40 μ M)+LC3 siRNA (LC3#1, LC3#2) ve TMZ + Kontrol siRNA ile 72. saat boyunca muamele edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. İnkübasyonun 72. saatinde hücreler inkübatörden çıkartıldı ve laminar air flow kabinde hücrelerde steril pipet ucu kullanılarak yara oluşturuldu. Daha sonra her kuyunun görüntü koordinatları her çekim gününde aynı olacak şekilde yara oluşumunun 0., 24. ve 48. saat mesafelerinin görüntülenmesi kamera ataçmanlı mikroskop kullanılarak yapıldı ve bu hücreler tekrar inkübatöre konuldu. Yara oluşumunun tüm saat ayarında yine kaplar inkübatörden alınıp ortamdan medyası uzaklaştırıldı ve hücrelerin PBS ile yıkaması yapıldı. Yara kapanması negatif kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde takip edildi, bu hücrelerde 48. saatinde yara tamamen kapandığı için kültür

sonlandırıldı. Görüntülenme sonrası yara kapanma oranı ImageJ programı kullanılarak hesaplandı.

Asidik Veziküllerin (Otofajik Veziküllerin) Tespiti

Acridine orange, asidik veziküler oluşumları (otofajik veziküller, lizozom, endozom, otofagozom vb.) belirlemek için kullanılan floresan bir boyadır. Acridine orange, asidik veziküler yapıların etrafında birikerek sarı-turuncu görüntü oluştururken, sitoplazmayı da yeşile boyar. Çalışmamızda asidik veziküler oluşumları belirlemek için, U87 mutant olmayan hücreleri medyum içeren 6 kuyucuklu kaplara ekildi ve 37°C de inkübe edildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde bir kısım hücreler iki farklı LC3-siRNA (LC3#1, LC3#2) ve kontrol siRNA'lar ile transfekte edildi. Bir kısım hücreler TMZ (20 ve 40 µM) ile muamele edildi. Bir kısım hücreler ise TMZ (20 ve 40 µM)+LC3 siRNA (LC3#1, LC3#2) ve TMZ+Kontrol siRNA ile muamele edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. Transfeksiyonun 72. saatinde inkübasyon sonlandırıldı. Daha sonra tüm hücrelerin bulunduğu ortamdan medyum uzaklaştırıldı ve hücrelerin acridine orange ile boyanması için 30 dakika inkübasyon yapıldı. Sonra boyanmış hücreler, farklı farklı filitreler (Texas-Red ve FITC) kullanılarak floresan mikroskop görüntüleri alındı. Alınan bu görüntülerinden otofajik veziküler oluşumları sayılarak analiz edildi.

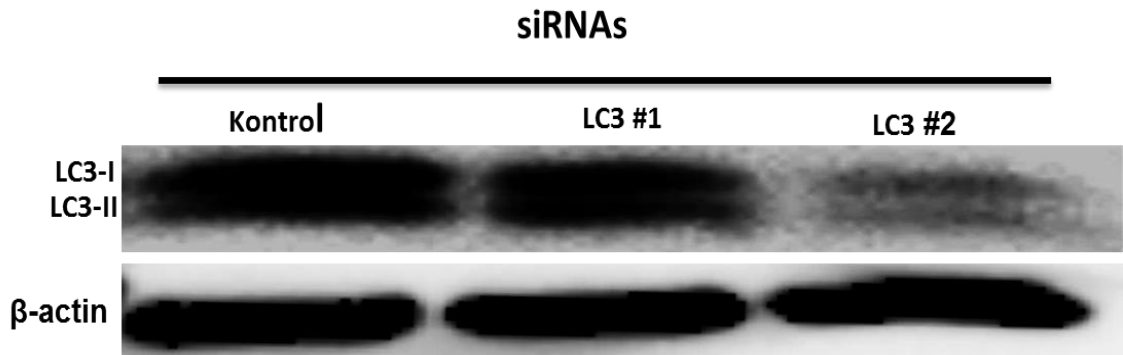
3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm deneyler en az üç kopya halinde gerçekleştirildi ve sonuçlar standart sapmalarla ortalama değerler olarak özetlendi. İstatistiksel anlamlılık *Student-t* testi kullanılarak değerlendirildi ve P değerinin 0.05'ten küçük olduğu veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler ve grafikler GraphPad Prism 8.2.1 ile oluşturuldu.

4. BULGULAR

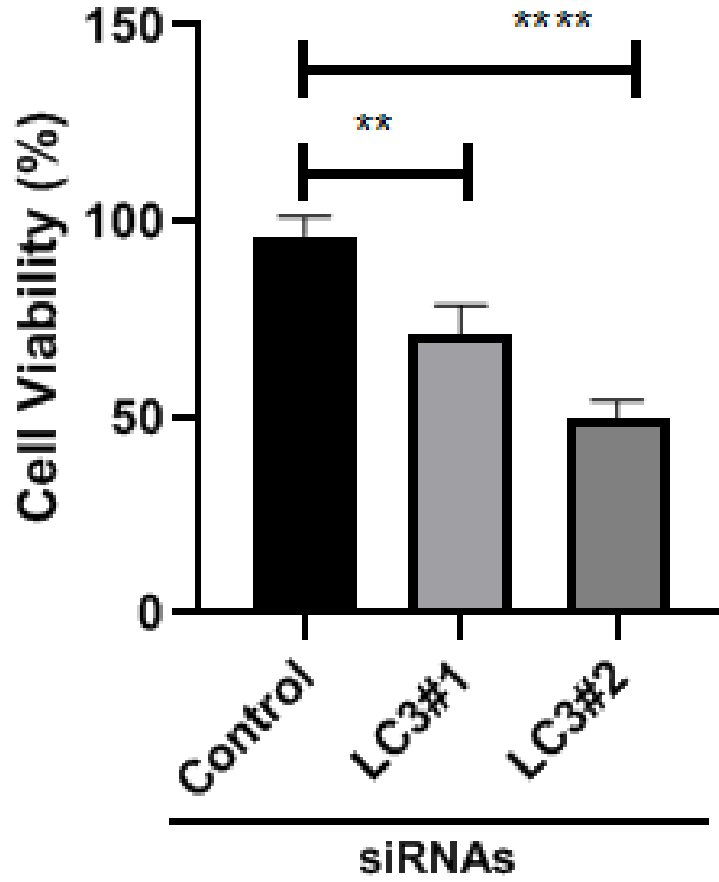
4.1. LC3-siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87 MG hücrelerinin çoğalmasına/canlılığına etkisi

Bu analize başlamadan önce LC3 genini baskılamak için seçtiğimiz iki farklı LC3-siRNA'nın LC3 hedefleyip hedeflemediğini (ekspresyonunu baskılayıp baskılamadığını) analiz etmek için LC3 siRNA'lar ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde western blot analizi ile LC3 protein ekspresyonu test edildi. Analiz sonuçlarına göre, LC3 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, kontrol siRNA ve herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen hücelere göre LC3 ekspresyonunun önemli ölçüde baskılandığı bulundu (Şekil 4). Bu sonuç bize LC3 genini baskılamak için seçtiğimiz siRNA'ların LC3 genini hedeflediğini ve LC3 ekspresyonunu baskıladığını gösterdi ve bundan sonraki deneylerimizde bu LC3-siRNA'lar kullanıldı.



Şekil 4. İki farklı siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 proteinin ekspresyon seviyesi. U-87 MG hücrelerinde LC3 genini hedef alan iki farklı LC3 siRNA LC3'ün ekspresyonunu baskıladı. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

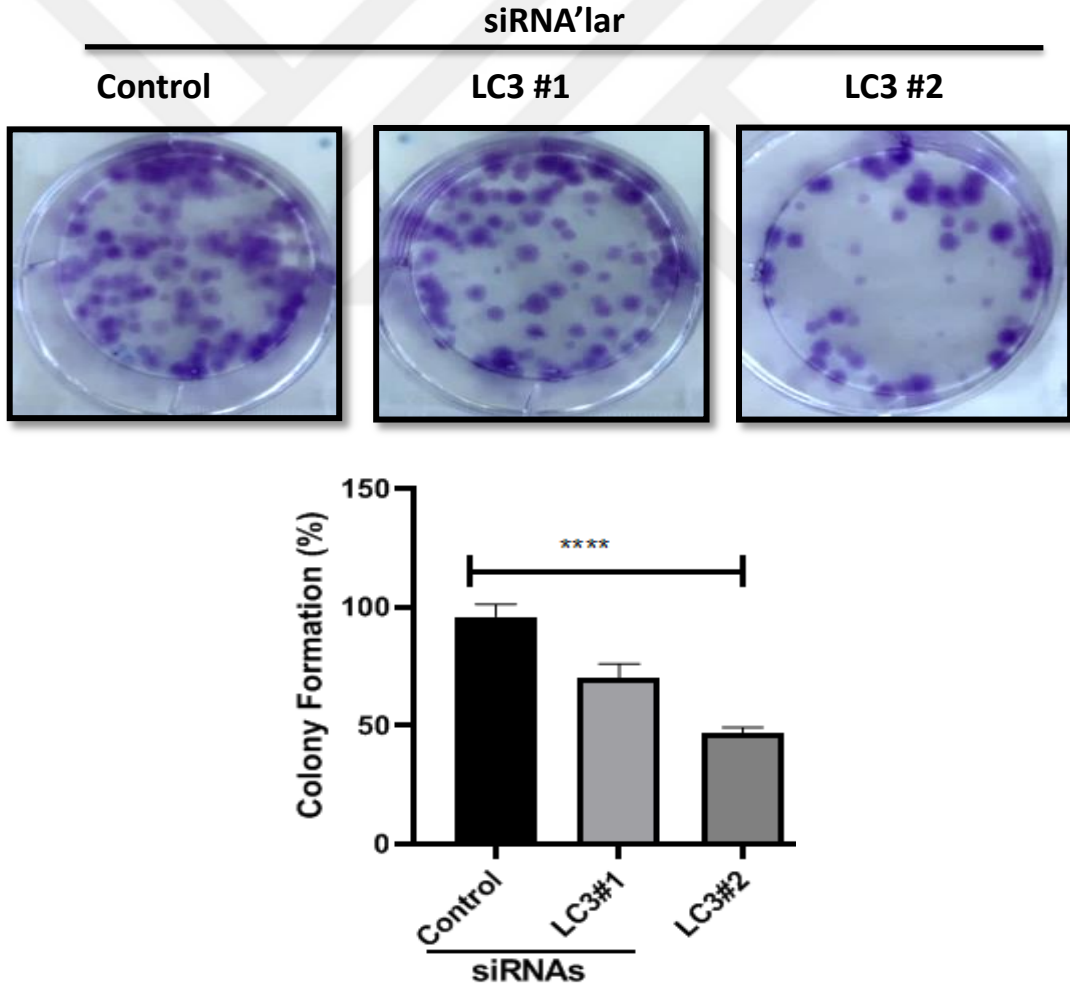
LC3 geninin hedef alan iki farklı siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, siRNA aracılı baskılanmış LC3'ün hücre canlılığına etkisini belirlemek için MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre, herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen (Nontreatment: NT) ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, iki farklı LC3-siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, dolayısıyla bu siRNA'lar aracılığıyla otofajinin baskılandığı hücrelerde, hücre canlılığının/proliferasyonunun istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 5, $p < 0.0001$).



Şekil 5. 72 saat LC3 siRNA ile transfekte edilmiş U-87MG hücrelerinde proliferasyon oranı. MTS analiz sonucuna göre herhangi bir siRNA ile transfekte edilmemiş ve kontrol siRNA ile transfekte edilmiş U-87 MG hücrelerine göre, işaret edilen siRNA'larla transfekte edilmiş hücrelerde hücre canlılığı/proliferasyonu önemli seviyede azaldı (sırasıyla; *** $p < 0.0002$; *** $p < 0.0001$).

4.2. LC3-siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87 MG GBM hücrelerinin klon oluşturma üzerine etkileri

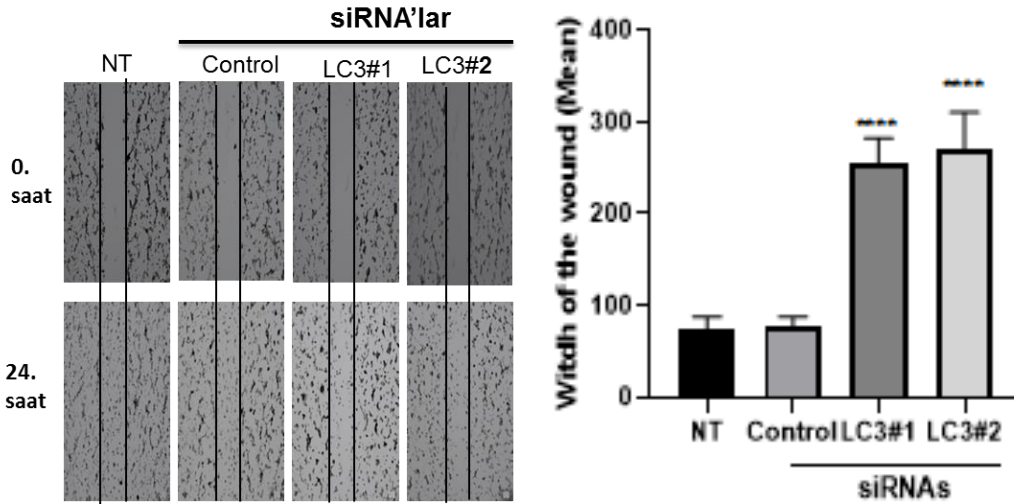
Klonojenik tespit, kanser hücrelerinin çoğalma ve klon oluşturma düzeylerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda, LC3'ün agresif U-87 MG GBM hücrelerinin klon oluşturmada nasıl bir role sahip olduğunu araştırmak amacıyla bu analiz yapıldı. Hücrelerin siRNA'larla transfeksiyonu sonrasında, iki farklı LC3-siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen (NT, Non-treatment) ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücelere göre, klon oluşumunun belirgin bir şekilde baskılandığı bulundu (Şekil 6, sırasıyla; $p < 0.0039$, $p < 0.0001$). Bu sonuçlarımız LC3'ün U-87 MG hücrelerinin klon oluşturmada önemli bir fonksiyona sahip olduğunu gösterdi.



Şekil 6. Kontrol siRNA ve iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen U-87MG hücrelerinde koloni oluşum oranı. Herhangi bir siRNA ile transfekte edilmemiş ve kontrol-siRNA ile transfekte edilen U-87 MG hücrelerinde klon oluşumu artarken, diğer işaret edilen siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde klon oluşumu önemli seviyede baskılandı (sırasıyla; ** $p < 0.0039$, **** $p < 0.0001$).

4.3. LC3-siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87MG hücrelerinin migrasyon özelliğine etkisi

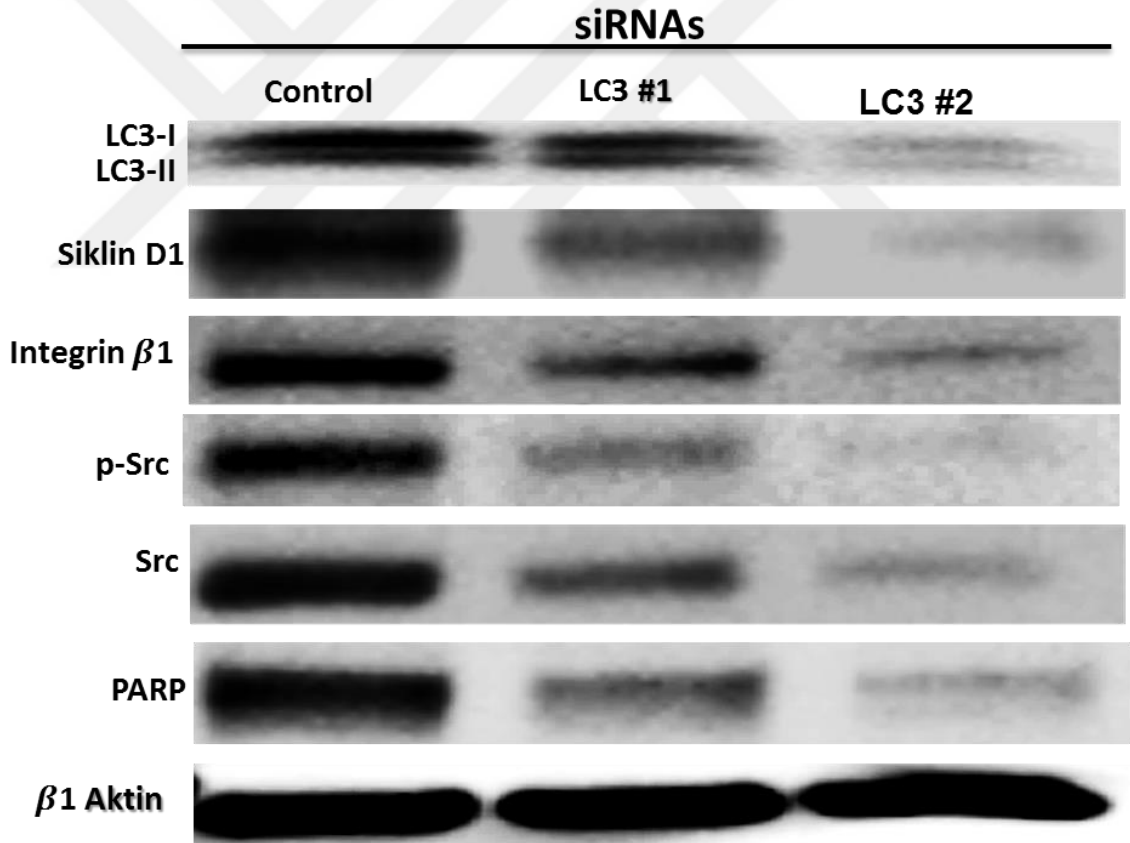
Yara oluşturma kanser hücrelerinin migrasyon oranını belirlemek için kullanılan bir tekniktir [161, 166]. LC3'ün U-87 MG hücrelerinin migrasyonunda olası bir rolünü araştırmak için hücreler kontrol-siRNA ile hem de iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edildi ve transfeksiyon sonrası hücrelerin migrasyon oranını belirlemek için yara iyileşme analizi yapıldı. Analiz sonucuna göre, iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, oluşturulan yaraya doğru göç eden hücre sayısının 24. saatinde, herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen (NT, non-treatment) ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücelere göre önemli ölçüde az olduğu dolayısıyla yaranın kapanmadığı bulundu (Şekil 7, $p < 0,001$). Elde ettiğimiz veriler, LC3'ün agresif GBM hücrelerinin migrasyonunda etkin bir role sahip olduğunu ortaya koydu.



Şekil 7. 72 saat siRNA ile transfekte edilmiş U-87MG hücrelerinde migrasyon oranı. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde yara oluşumundan 24. saat sonra oluşturulan boşluğa (yaraya) hücreler göç eden hücre sayısı yüksekken (yara kapanırken) diğer siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde oluşturulan boşluğa göç eden hücre sayısı önemli seviyede düşüktür (yara kapanmamıştır) (**** $p < 0,0001$).

4.4. LC3 gen ekspresyonunun U-87MG hücrelerinde onkogenik sinyal yollarında medyatör olarak görev yapan proteinlerin ekspresyonuna etkisi

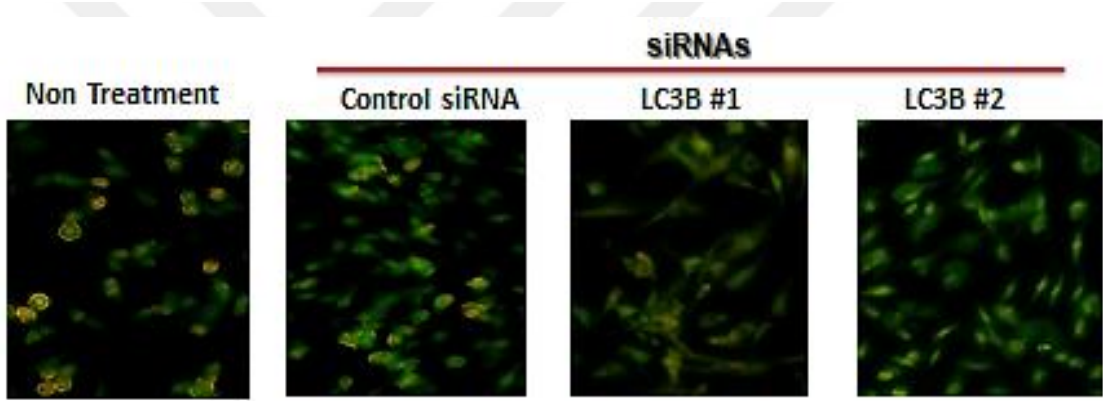
LC3'ün agresif U-87 MG GBM hücrelerinin agresiflik kazanmasında etkin rol oynayan sinyal yollarında medyatör olarak yer CyclinD1/Integrin β 1/Src ve PARP proteinlerinin ekspresyonlarında olası bir rolünün varlığını test etmek için Western blot analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen (NT, Non-treatment) ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücelere göre, iki farklı siRNA ile transfekte edilen hücrelerde CyclinD1/Integrin β 1/Src ve PARP ekspresyonlarının anlamlı oranda azaldığı bulundu (Şekil 8). Bu sonuçlarımız LC3'ün GBM hücrelerinde birçok onkogenik sinyal yolağının düzenlenmesine katkı sağladığını gösterdi.



Şekil 8. Kontrol siRNA ve iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen U-87MG hücrelerinde hücre çoğalması ve migrasyonda görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. Kontrol siRNA ve İki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde hücre çoğalması, migrasyonda görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, LC3-siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde işaret edilen proteinlerin ekspresyonları baskılandı. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

4.5. siRNA aracılı baskılanmış LC3 geninin U-87MG hücrelerinde otofajik vezikül oluşumuna etkisi

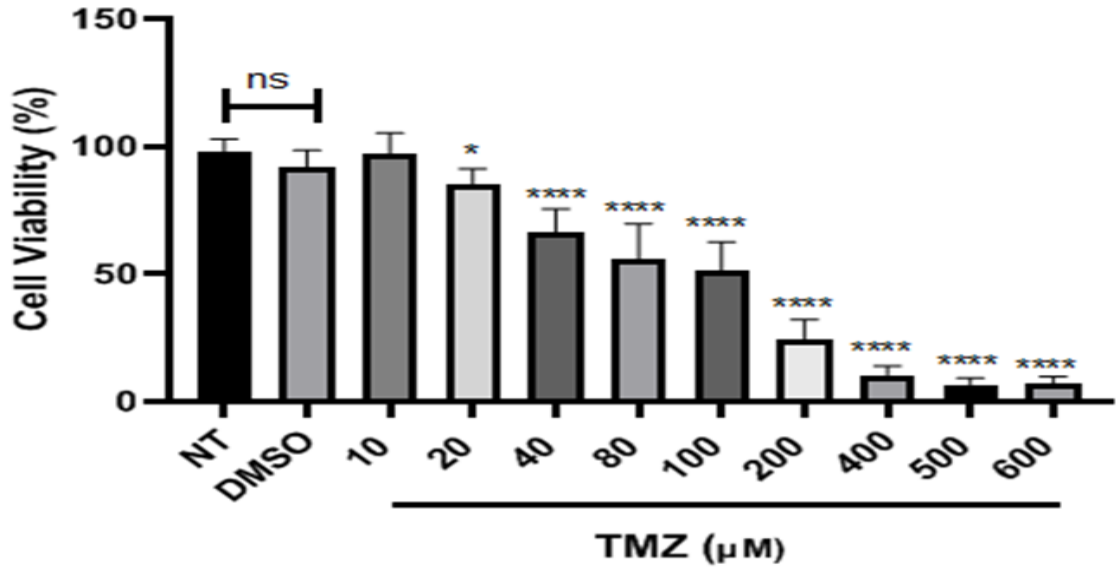
İki farklı LC3-siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde otofajinin (asidik veziküler oluşumların) baskılanıp baskılanmadığını kontrol etmek amacıyla, bu siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, transfeksiyon sonrası akridin oranjla boyama yapıldı ve floresan mikroskopta otofajik veziküller analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde yoğun bir biçimde otofajik veziküler oluşumlar tespit edilirken, iki farklı LC3-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofajik vezikülerin oluşumunda belirgin bir şekilde azalma bulundu (Şekil 9). Sonuçlarımız kullandığımız siRNA'ların hücrelerde otofajiyi baskılamak için uygun olduğunu gösterdi.



Şekil 9. Kontrol siRNA ve iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilen U-87MG hücrelerinde asidik veziküler oluşumları. Herhangi bir siRNA ile transfekte edilmemiş ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, işaret edilen diğer siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde oluşan otofajik veziküller azaldı.

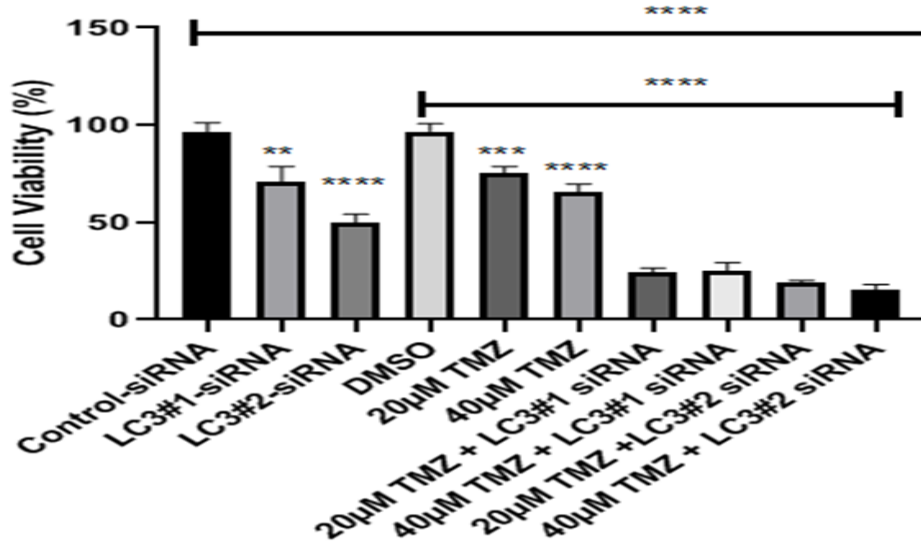
4.6. LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin canlılığına etkisi

Otofaji TMZ karşı geliştirilen dirençte etkin moleküler mekanizmalardan biri olarak gösterilmektedir [168-170]. Bu yüzden iki farklı LC3 siRNA aracılı ile otofajinin baskılandığı hücrelerde TMZ'nin etkinliğini belirlemek için LC3-siRNA'larla birlikte farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulanan hücrelerde hücre canlılık oranları analiz edildi. Öncelikle U-87 MG hücreleri farklı konsantrasyonlarda TMZ ile 72 saat muamele edildi ve sonrasında MTS analizi ile hücre canlılık oranları belirlendi. Analiz sonuçlarımıza göre, artan TMZ konsantrasyonuna bağlı olarak (Şekil 10, $p < 0,001$) hücre canlılığının azaldığı bulundu.



Şekil 10. Artan TMZ konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi. Farklı konsantrasyonlarda TMZ ile muamele edilen hücrelerde DMSO (kontrol) ile muamele edilen hücreler göre hücre canlılık oranını TMZ'in artan konsantrasyonuna bağlı olarak azaldı. (Sırasıyla, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

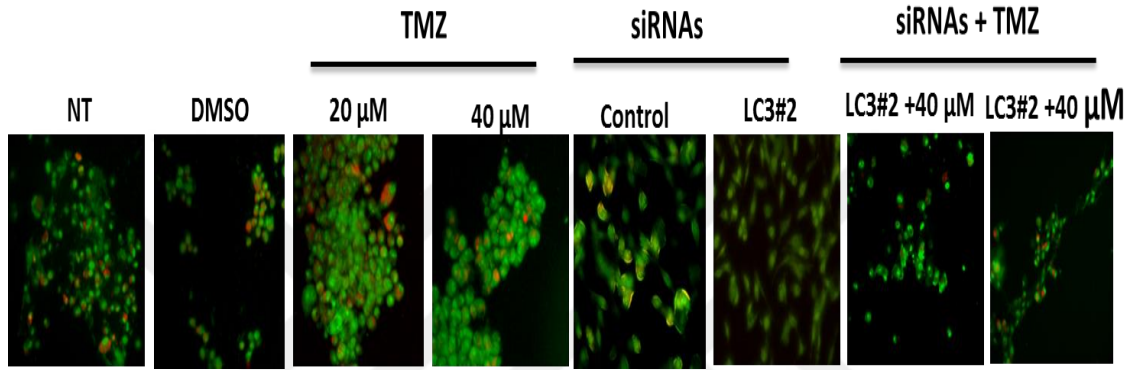
20 µM TMZ uygulanan hücrelerde hücre canlılığının yaklaşık %25, 40 µM TMZ uygulanan hücrelerde hücre canlılığının yaklaşık %40 oranında azaldığı bulundu (Şekil 10). LC3 siRNA ve TMZ'in birlikte uygulandığı hücrelerde ise hücre canlılığının %75 oranında azaldığı bulundu (Şekil 11, $p < 0.001$).



Şekil 11. TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi. Farklı konsantrasyonlarda TMZ ve siRNA'nın uygulandığı hücrelerde hücre canlılığı önemli oranda azaldı (sırasıyla, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

TMZ otofajiye karşı geliştirilen dirençte etkin moleküler mekanizmalardan biri olarak gösterildiği için tez çalışmasında TMZ, TMZ ile LC3-siRNA'nın birlikte kullanımının U87-MG hücrelerinde otofajik veziküllerin oluşumu üzerine etkisi analiz edildi.

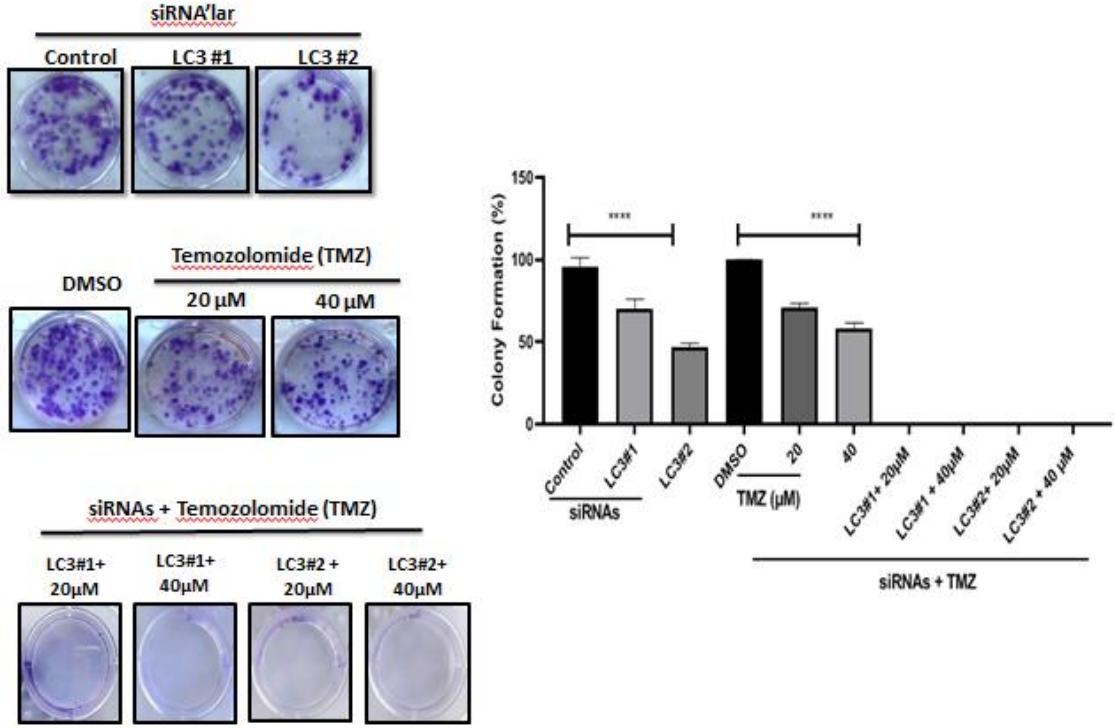
Analiz sonuçlarına göre TMZ ile muamele edilmeyen hücrelerde otofajik veziküllerin oluşumu gözlenirken, LC3 ve TMZ'in birlikte uygulandığı hücrelerde otofajik vezikül oluşumunun belirgin bir şekilde azaldığı bulundu (Şekil 12).



Şekil 12. TMZ ve siRNA kombinasyonunun otofajik vezikül oluşumuna etkisi. Farklı konsantrasyonlarda TMZ ve siRNA'nın uygulandığı hücrelerde otofajik vezikül oluşumları azaldı.

4.7. LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin klon oluşturma özelliğine etkisi

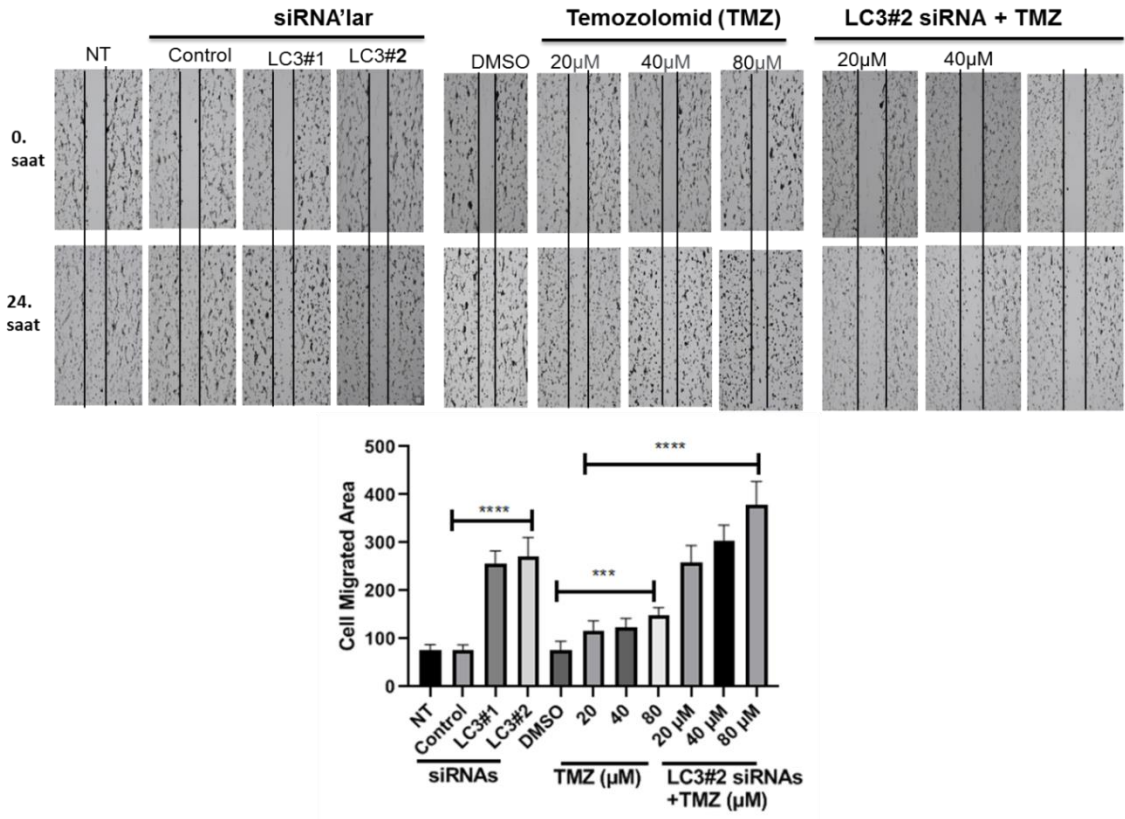
İki farklı LC3 siRNA aracılı ile otofajinin baskılandığı hücrelerde TMZ'nin etkinliğini belirlemek için LC3-siRNA'larla birlikte farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulanan hücrelerde klon oluşumu analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre TMZ ve LC3-siRNA'nın birlikte uygulandığı hücrelerde yalnız TMZ uygulanan hücelere ve hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücelere göre klon oluşumun önemli oranda baskılandığı bulundu (Şekil 13, $p < 0,001$).



Şekil 13. TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücrelerde klon oluşumuna etkisi. Farklı konsantrasyonlarda TMZ ve siRNA'nın uygulandığı hücrelerde hücrelerde klon oluşumu önemli oranda azaldı (****p<0.001).

4.8. LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin klon oluşturma özelliğine etkisi

İki farklı LC3 siRNA aracılı ile otofajinin baskılandığı hücrelerde TMZ'nin etkinliğini belirlemek için LC3-siRNA'larla birlikte farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulanan hücrelerde hücre hareketliliğine/mobilitesine etkisi analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre TMZ ve LC3-siRNA'nın birlikte uygulandığı hücrelerde, yalnız TMZ uygulanan hücelere ve hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücelere göre hücre hareketliliğinin önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 14, p<0,001).



Şekil 14. TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücrelerde klon oluşumuna etkisi. Farklı konsantrasyonlarda TMZ ve siRNA'nın uygulandığı hücrelerde hücrelerin migrasyonu önemli oranda azaldı (****p<0.001).

5. TARTIŞMA

GBM kötü prognoz ve yüksek nüks oranları ile karakterize agresif beyin tümörü olup, kötü prognozlu primer beyin tümörlerinin en ölümcül seyreden tipidir. GBM'lerin, heterojen özellik göstermeleri, yüksek proliferasyon oranları ve agresif davranışları GBM hastalarında tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu yüzden, GBM tedavisinde çok büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, halen hastaların yaşam süreleri çok düşüktür [171, 172]. GBM hastaları için uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümörün cerrahi rezeksiyonu, TMZ dayalı kemoterapi, radyoterapi veya bu seçeneklerin birbiri ile kombinasyonuna dayanmaktadır [171, 173]. Ancak hastalar konvansiyonel kemoterapi ve radyasyona zayıf şekilde yanıt verirler.

GBM tedavisinde özellikle etkin kemoteropötik olarak temozolomide (TMZ) kullanılmaktadır [105, 174]. Bununla birlikte, GBM hücreleri, TMZ'nin neden olduğu sitotoksositeye karşı dirençli hale gelir ve gelişen direnç TMZ'nin etkinliğini kısıtlar [170, 175, 176]. TMZ sitotoksitesinden korunmak için, GBM hücrelerinin otofajiyi indükleyerek TMZ'ye karşı kendilerini savundukları düşünülmektedir [170, 177]. Bu nedenle, GBM'de otofaji-hedefli tedavilerin geleneksel terapilerin etkinliğini artıracağı ileri sürülmektedir [170, 178-180].

Otofaji kanser hücrelerinde oldukça kompleks bir rol oynar. Hem onkogenik aktiviteye sahip olup, hücre canlılığını/proliferasyonunu koruyucu, invazyonu destekleyici; hem de hücre ölümüne yol açarak tümör süpressör olarak görev yapar. Ancak, yapılan çalışmalar sonucu elde edilen ve sayıca artan delillere göre otofajinin kanser hücrelerinin yaşamasına olanak sağladığını, radyoterapi ve kemoterapiye direnç

kazandıran bir mekanizma olarak faaliyette bulunduğu gösterilmiştir. Otofajinin kanser hücrelerindeki rolünden dolayı, otofajinin baskılanmasının anti-kanser terapötik etkiyi artıracığı ileri sürülmektedir [2, 181, 182].

Hamurcu Z. ve ark tarafından yapılan çalışmada agresif meme kanser hücrelerinde otofajinin meme kanser hücrelerinin çoğalmasında, canlılığında, migrasyonunda, invazyonunda rol oynadığı ve tümörün büyümesi ve progresyonuna önemli katkı sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, diğer kanserlerde olduğu gibi GBM'lerde de otofajinin tam olarak rolü anlaşılamamıştır [183-186].

GBM hastalarından alınan tümör hücreleri üzerinde yapılan genomik çalışmalar, birden fazla sinyal yolağında meydana gelen mutasyonların otofajiyi regüle etmede etkisi olduğunu göstermiştir [187] Ayrıca, GBM hücre kültürlerinde, otofaji, terapötik ajanlarla tedavi üzerine stres yanıtı olarak sıklıkla aktive edildiği gözlenmiştir [188]. Hücrel ve ksenograft deneyleri, otofajinin GBM'de önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir [179, 189]. Yine yapılan fare çalışmalarında otofajinin GBM büyümesi için gerekli olduğu gösterilmiştir [190].

Glioblastoma natürü gereği kolonizasyon ve migrasyon gösteren bir kanser türüdür. Etraf dokulara yayılımını da büyük oranda yine bu migrasyon ve koloni oluşturma özelliği üzerinden sağlamaktadır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda otofaji indüksiyonunun, GBM hücrelerinde migrasyon ve invazyonu düzenlediği gösterilmiştir [191].

Sunulan çalışma, otofaji mekanizmasının ana elemanı olan LC3'ün iki farklı siRNA aracılığıyla baskılanmasının, hücre çoğalması, canlılığını ve migrasyonunu önemli oranda inhibe ettiğini göstermiştir.

Mevcut çalışma, LC3'ün agresif U-87 MG GBM hücrelerinde klon oluşturmada etkin bir role sahip olduğunu gösterdi. Hücrelerin siRNA'larla transfeksiyonu sonrasında, iki farklı LC3-siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen (NT, Non-treatment) ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, klon oluşumunun belirgin bir şekilde baskılandığı bulundu. Bu sonuçlar LC3'ün U-87 MG hücrelerinin klon oluşturmada önemli bir fonksiyona sahip olduğunu gösterdi.

Sunulan çalışmada; yara oluşturma tekniği kullanılarak LC3'ün U-87 MG hücrelerinin migrasyonunda olası bir rolünü araştırmak için hücreler kontrol-siRNA ile hem de iki farklı LC3 siRNA'larla transfekte edilip, transfeksiyon sonrası hücrelerin migrasyon oranını belirlemek için yara iyileşme analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler, LC3'ün agresif GBM hücrelerinin migrasyonunda etkin bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Böylelikle LC3 üzerinden otofaji inhibisyonunun GBM hücrelerinde migrasyonu engellediği gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, GBM hücrelerinde LC3'ün ekspresyonunun iki farklı LC3-siRNA aracılığıyla baskılanmasının; hücre çoğalmasında, canlılığında, adezyonunda ve migrasyonunda yer alan CyclinD1/Integrin β 1/Src [161, 192] ekspresyonunu baskıladığı ve Src-fosforilasyonunun inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir.

İki farklı LC2-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofajinin baskılandığı gösterilmiştir. Asidik veziküller kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde yoğun bir biçimde otofajik veziküler oluşumlar tespit edilirken, iki farklı LC3-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofajik veziküler oluşumunda belirgin bir şekilde azalma bulunmuştur. Bu sonuçlar kullanılan siRNA'ların hücrelerde otofajiyi baskılamak için uygun olduğunu göstermiştir.

Daha önce bahsedildiği üzere TMZ GBM'in kemoterapisinde ilk sırada kullanılan alkilleyici bir ajandır [1]. Bununla birlikte TMZ, glioma hastaları için birinci basamak kemoterapi olmasına rağmen, birden fazla mekanizma tarafından sağlanan doğal ve edinilmiş direnç, tedavi başarısızlığına neden olur. Yapılan çalışmalarda TMZ'in otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [177]. Ayrıca, farklı aşamalarda otofajinin farmakolojik inhibisyonunun, TMZ ile indüklenen otofaji üzerinde farklı sonuçlara sahip olduğunu da gösterilmiştir. Tüm bu sebeplerden dolayı otofaji, TMZ ile indüklenen sitotoksitenin temel bir parçasıdır ve otofajik sürecin inhibisyonu, TMZ'nin antitümör etkisini önemli ölçüde etkiler [177].

Bu sebepten dolayı biz de yaptığımız çalışmada, iki farklı LC3-siRNA'larla birlikte farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulanan hücrelerde hücre canlılık oranlarını analiz edilerek, farklı konsantrasyonlarda TMZ ile 72 saat muamele edilen ve sonrasında MTS analizi ile hücre canlılık oranları belirlenen hücrelerde artan TMZ konsantrasyonuna bağlı olarak (Şekil 10, $p < 0,001$) hücre canlılığının azaldığı bulunmuştur.

20 µM TMZ uygulanan hücrelerde hücre canlılığının yaklaşık %25, 40 µM TMZ uygulanan hücrelerde hücre canlılığının yaklaşık %40 oranında azaldığı bulundu (Şekil 7). LC3 siRNA ve TMZ'in birlikte uygulandığı hücrelerde ise hücre canlılığının %75 oranında azaldığı bulunmuştur.

Ayrıca bu çalışmada ilk kez, iki farklı LC3 siRNA ile LC3'ün ekspresyonu baskılandığında, PARP proteinin ekspresyonunun da önemli oranda baskılandığını gösterilmiştir. Poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP), DNA tamirinde ve hücre ölümünde görev alan ve genellikle kanserlerde yüksek oranda ekspresyonu yapılan bir proteindir [193, 194]. Bu sonuçlara göre otofajinin GBM hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü önleyerek hücreleri sağ kalıma teşvik ettiğini göstermiştir.

Yine sunulan çalışmadan LC3-siRNA ve TMZ'in birlikte kullanıldığı durumlarda otofajik asidik vezikül oluşumu araştırılmış olup, TMZ ile muamele edilmeyen hücrelerde otofajik veziküllerin oluşumu gözlenirken, LC3 ve TMZ'in birlikte uygulandığı hücrelerde otofajik vezikül oluşumunun belirgin bir şekilde azaldığı bulunmuştur.

Sunulan çalışmada LC3-siRNA, Temozolomid ve LC3-siRNA ve Temizolamid uygulamasının U-87 MG hücrelerinin klon oluşturma özelliğine etkisinin olduğu görülmüş, TMZ ve LC3-siRNA'nın birlikte uygulandığı hücrelerde, yalnız TMZ uygulanan hücrelere ve hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücrelere göre hücre hareketliliğinin önemli oranda azaldığı bulunmuştur.

siRNA aracılı RNA müdahale mekanizması(RNAi), biyolojik araştırmalar için gelişmiş çok işlevli bir araçtır ve çeşitli hastalıklar (viral enfeksiyonlar, genetik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi) için umut verici bir tedavi stratejisidir [195]. Gen transfer stratejileriyle, genlerin işlevi engellenebilir, restore edilerek iyileştirilmesi sağlanabilir veya gene yeni bir fonksiyon kazandırılabilir [128]. Biz de yaptığımız çalışmada otofaji üzerinde daha önce etkisi tanımlanan ve otofaji belirteci olarak kullanılan LC3 geni, siRNA yoluyla susturarak otofajiyi, böylelikle de otofaji üzerinden tümöral davranışı etkilemeyi amaçlamıştık.

Sunulan çalışmadaki sonuçlar, LC3'ün, dolayısıyla otofajinin GBM hücrelerinin hayatta kalması, proliferasyonu, migrasyonu ve apoptoza karşı direnci gibi önemli onkogenik

biyolojik süreçleri desteklediğini ve LC3-siRNA aracılı otofajinin baskılanmasının bu mekanizmaları önemli ölçüde bloke ettiğini ve otofajinin GBM'in progresyonunda kritik bir faktör olabileceğini, GBM'lerin tedavisinde LC3'ün, dolayısıyla otofajinin potansiyel bir terapötik hedefi temsil ettiğini ve LC3-siRNA'nın teröpatik bir ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Bu çalışmada geleneksel tedaviye ek olarak, gen susturucu tedavi kullanılarak hem mevcut tedavinin etkinliğini arttırmayı hem de alternatif genetik tedavilere zemin hazırlanması amaçlanmıştır.



6. SONUÇLAR

U-87 MG GBM hücrelerinde LC3 geninin iki farklı LC3-siRNA ile susturulmasının, bu hücrelerde canlılık, migrasyon, koloni oluşturma, otofajik vezikül oluşturma etkileri üzerine etkisi olduğu bulunmuştur. Yine bu sonuçlar çalışmamızın TMZ duyarlılığını arttığını göstermiştir.

Elde edilen sonuçlara göre GBM tedavisinde LC3 geni üzerinden otofajinin hedeflenmesi bir potansiyel arz etmekte olup, ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. In vitro ortamda sağlanan bu sonuçların in vivo ortamda da çalışılarak, canlı vücudundaki etkilerinin ortaya konulması gerekmektedir.

Bu yüzden her ne kadar in vitro ortamda yapılan bu çalışmanın sonuçları müspet yönde olsa da, araştırmaların ilerleme kaydedebilmesi ve çalışılan yöntemin teröpotik hedef olarak ortaya konabilmesi için in-vivo ortam çalışmaları da mutlak surette gerekmektedir.

si-RNA'lar dolaşıma verildikleri takdirde, hedef dokuya ulaşmadan dolaşımda hızlıca yıkılmaktadır. Bu sorun in-vivo ortam çalışmalarının önünde büyük bir engel teşkil etmektedir. Teröpotik si-RNA'ların dolaşımdaki yıkımı engellenerek, hedef dokuya ulaşması gerekmektedir. Bu handikapın çözümü için alternatif yollar üzerine ileri çalışmaların yapılması gerekir.

Bunun alt yapısı da tarafımızca "Hedef dokuya ulaşımı sağlamak amaçlı nanopartiküler ajanların kullanımı" yoluyla kurgulanmıştır. Çalışmanın ileri aşamaları da buna yönelik yapılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. New England journal of medicine, 2005. **352**(10): p. 987-996.
2. Mrakovcic, M. and L.F. Fröhlich, *p53-mediated molecular control of autophagy in tumor cells*. Biomolecules, 2018. **8**(2): p. 14.
3. Badadani, M., *Autophagy mechanism, regulation, functions, and disorders*. ISRN Cell Biology, 2012. **2012**.
4. Zois, C.E. and M.I. Koukourakis, *Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies?* Autophagy, 2009. **5**(4): p. 442-450.
5. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-545.
6. de Robles, P., et al., *The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis*. Neuro-oncology, 2015. **17**(6): p. 776-783.
7. Leece, R., et al., *Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007*. Neuro-oncology, 2017. **19**(11): p. 1553-1564.
8. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary*. Acta neuropathologica, 2016. **131**(6): p. 803-820.
9. Wesseling, P. and D. Capper, *WHO 2016 classification of gliomas*. Neuropathology and applied neurobiology, 2018. **44**(2): p. 139-150.
10. Alkonyi, B., et al., *Differential imaging characteristics and dissemination potential of pilomyxoid astrocytomas versus pilocytic astrocytomas*. Neuroradiology, 2015. **57**(6): p. 625-638.
11. TUFAN, K., *Glial Tümörlerde Ayırıcı Tanı*.
12. Rashid Jooma, M.W. and I. Khan, *Diffuse low-grade glioma—Changing concepts in diagnosis and management: A review*. Asian journal of neurosurgery, 2019. **14**(2): p. 356.
13. Sathornsumetee, S., J.N. Rich, and D.A. Reardon, *Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma*. Neurologic clinics, 2007. **25**(4): p. 1111-1139.

14. Lee, C.-H., et al., *Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea*. Journal of Korean Neurosurgical Society, 2010. **48**(2): p. 145.
15. Banan, R. and C. Hartmann, *The new WHO 2016 classification of brain tumors—what neurosurgeons need to know*. Acta neurochirurgica, 2017. **159**(3): p. 403-418.
16. Kang, H., et al., *A Nationwide, Population-Based Epidemiology Study of Primary Central Nervous System Tumors in Korea, 2007-2016: A Comparison with United States Data*. Cancer Research and Treatment, 2020.
17. Porter, A.B., D.H. Lachance, and D.R. Johnson, *Socioeconomic status and glioblastoma risk: a population-based analysis*. Cancer Causes & Control, 2015. **26**(2): p. 179-185.
18. Thakkar, J.P., J.L. Villano, and B.J. McCarthy, *Age-specific cancer incidence rates increase through the oldest age groups*. The American journal of the medical sciences, 2014. **348**(1): p. 65-70.
19. Truitt, G., et al., *Partnership for defining the impact of 12 selected rare CNS tumors: a report from the CBTRUS and the NCI-CONNECT*. Journal of neuro-oncology, 2019. **144**(1): p. 53-63.
20. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016*. Neuro-oncology, 2019. **21**(Supplement_5): p. v1-v100.
21. Philips, A., et al., *Brain tumours: rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995–2015 suggests an adverse environmental or lifestyle factor*. Journal of environmental and public health, 2018. **2018**.
22. Ostrom, Q.T., et al., *Risk factors for childhood and adult primary brain tumors*. Neuro-oncology, 2019. **21**(11): p. 1357-1375.
23. Wen, P.Y., et al., *Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions*. Neuro-oncology, 2020.
24. Ostrom, Q.T., et al., *The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review*. Neuro-oncology, 2014. **16**(7): p. 896-913.
25. Inskip, P.D., et al., *Radiation-related new primary solid cancers in the Childhood Cancer Survivor Study: comparative radiation dose response and*

- modification of treatment effects.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 2016. **94**(4): p. 800-807.
26. Ostrom, Q.T., et al., *Epidemiology of intracranial gliomas*, in *Intracranial Gliomas Part I-Surgery*. 2018, Karger Publishers. p. 1-11.
 27. Ranger, A.M., et al., *Familial syndromes associated with intracranial tumours: a review.* Child's Nervous System, 2014. **30**(1): p. 47-64.
 28. Vijapura, C., et al., *Genetic syndromes associated with central nervous system tumors.* Radiographics, 2017. **37**(1): p. 258-280.
 29. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells.* nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
 30. Cahill, D. and S. Turcan. *Origin of gliomas.* in *Seminars in neurology*. 2018. Thieme Medical Publishers.
 31. Llaguno, S.R.A., et al., *Adult lineage-restricted CNS progenitors specify distinct glioblastoma subtypes.* Cancer cell, 2015. **28**(4): p. 429-440.
 32. Persson, A.I., et al., *Non-stem cell origin for oligodendroglioma.* Cancer cell, 2010. **18**(6): p. 669-682.
 33. Sugiarto, S., et al., *Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors.* Cancer cell, 2011. **20**(3): p. 328-340.
 34. Lopez-Gines, C., et al., *New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile.* Modern Pathology, 2010. **23**(6): p. 856-865.
 35. Shinojima, N., et al., *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme.* Cancer research, 2003. **63**(20): p. 6962-6970.
 36. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.* Nature, 2009. **462**(7274): p. 739-744.
 37. Zhang, C., et al., *IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma.* Neuro-oncology, 2013. **15**(9): p. 1114-1126.
 38. Koivunen, P., et al., *Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation.* Nature, 2012. **483**(7390): p. 484-488.

39. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer cell*, 2010. **17**(1): p. 98-110.
40. Chen, J.-R., et al., *Isocitrate dehydrogenase (IDH) 1/2 mutations as prognostic markers in patients with glioblastomas*. *Medicine*, 2016. **95**(9).
41. Cohen, A.L., S.L. Holmen, and H. Colman, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. *Current neurology and neuroscience reports*, 2013. **13**(5): p. 345.
42. Russo, A.L., et al., *In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016*. *Clinical Cancer Research*, 2009. **15**(2): p. 607-612.
43. van Vuurden, D.G., et al., *PARP inhibition sensitizes childhood high grade glioma, medulloblastoma and ependymoma to radiation*. *Oncotarget*, 2011. **2**(12): p. 984.
44. Karpel-Massler, G., et al., *PARP inhibition restores extrinsic apoptotic sensitivity in glioblastoma*. *PloS one*, 2014. **9**(12): p. e114583.
45. Killela, P.J., et al., *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(15): p. 6021-6026.
46. Abedalthagafi, M., et al., *The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas*. *Modern Pathology*, 2013. **26**(11): p. 1425-1432.
47. Akyerli, C.B., et al., *Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas*. *Journal of neurosurgery*, 2018. **128**(4): p. 1102-1114.
48. Lobry, C., P. Oh, and I. Aifantis, *Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think*. *Journal of Experimental Medicine*, 2011. **208**(10): p. 1931-1935.
49. Lobry, C., et al., *Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor*. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 2014. **123**(16): p. 2451-2459.
50. Chikara, S. and K.M. Reindl, *Notch signaling: a hero or villain in the war against cancer?* *Translational Lung Cancer Research*, 2013. **2**(6): p. 449.

51. Stockhausen M T, K., Poulsen H S. The function of the role of notch signaling in human gliomas, 2010. **12**(2): p. 199.
52. Zhang, Z., et al., *PTEN regulates PLK1 and controls chromosomal stability during cell division*. Cell Cycle, 2016. **15**(18): p. 2476-2485.
53. Bassi, C., et al., *Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress*. Science, 2013. **341**(6144): p. 395-399.
54. Gil, A., A. Andres-Pons, and R. Pulido, *Nuclear PTEN: a tale of many tails*. Cell death and differentiation, 2007. **14**(3): p. 395-399.
55. Lian, Z. and A. Di Cristofano, *Class reunion: PTEN joins the nuclear crew*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7394-7400.
56. Wu, X., et al., *AXL kinase as a novel target for cancer therapy*. Oncotarget, 2014. **5**(20): p. 9546.
57. Vajkoczy, P., et al., *Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(15): p. 5799-5804.
58. Keating, A.K., et al., *Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity*. Molecular cancer therapeutics, 2010. **9**(5): p. 1298-1307.
59. Network, C.G.A.R., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061.
60. Michaud, K., et al., *Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts*. Cancer research, 2010. **70**(8): p. 3228-3238.
61. He, J., J.J. Olson, and C.D. James, *Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines*. Cancer research, 1995. **55**(21): p. 4833-4836.
62. Jen, J., et al., *Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors*. Cancer research, 1994. **54**(24): p. 6353-6358.
63. Ichimura, K., et al., *Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene*. Oncogene, 1996. **13**(5): p. 1065.

64. Chow, L.M., et al., *Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain*. *Cancer cell*, 2011. **19**(3): p. 305-316.
65. Biernat, W., et al., *Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas*. *Acta neuropathologica*, 1997. **94**(4): p. 303-309.
66. Goldhoff, P., et al., *Clinical stratification of glioblastoma based on alterations in retinoblastoma tumor suppressor protein (RB1) and association with the proneural subtype*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2012. **71**(1): p. 83-89.
67. Chhabda, S., et al., *The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system: what the paediatric neuroradiologist needs to know*. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 2016. **6**(5): p. 486.
68. Louis, D.N., et al., *International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading*. *Brain pathology*, 2014. **24**(5): p. 429-435.
69. Daumas-Duport, C., et al., *Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method*. *Cancer*, 1988. **62**(10): p. 2152-2165.
70. Kleihues, I., Burger PC, Scheithauer BW. *Histological typing of tumours of the central nervous system*. World Health Organization International Histological Classification of Tumours, 1993.
71. Jaffe, E.S., *World Health Organization Classification of tumours: Pathology & genetics: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France, 2001.
72. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. *Acta neuropathologica*, 2007. **114**(2): p. 97-109.
73. Zulch, K.J., *Histological typing of tumours of the central nervous system*. International histological classification of tumours No 21., 1979: p. 19-24.
74. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2005. **64**(6): p. 479-489.
75. Louis, D.N., et al., *Announcing cIMPACT-NOW: the consortium to inform molecular and practical approaches to CNS tumor taxonomy*. 2017, Springer.

76. Yeane, G.A. and D.J. Brat, *What every neuropathologist needs to know: update on cIMPACT-NOW*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2019. **78**(4): p. 294-296.
77. Louis, D.N., et al., *cIMPACT-NOW update 1: not otherwise specified (NOS) and not elsewhere classified (NEC)*. Acta neuropathologica, 2018. **135**(3): p. 481-484.
78. Louis, D.N., et al., *cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant*. Acta neuropathologica, 2018. **135**(4): p. 639-642.
79. Brat, D.J., et al., *cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV"*. Acta neuropathologica, 2018. **136**(5): p. 805-810.
80. Ellison, D.W., et al., *cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF V600E mutation*. Acta neuropathologica, 2019. **137**(4): p. 683-687.
81. Mellai, M., et al., *Diagnostic revision of 206 adult gliomas (including 40 oligoastrocytomas) based on ATRX, IDH1/2 and 1p/19q status*. Journal of neuro-oncology, 2017. **131**(2): p. 213-222.
82. DANYELİ, A.E., *Santral Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflaması-Geçmişten Güncele*.
83. Sturm, D., S.M. Pfister, and D.T. Jones, *Pediatric gliomas: current concepts on diagnosis, biology, and clinical management*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(21): p. 2370-2377.
84. Rosenberg, J.H., et al., *Current modalities and mechanisms underlying cardioprotection by ischemic conditioning*. Journal of cardiovascular translational research, 2018. **11**(4): p. 292-307.
85. Flanigan, P.M., et al., *Improved survival with decreased wait time to surgery in glioblastoma patients presenting with seizure*. Neurosurgery, 2017. **81**(5): p. 824-833.
86. Schankin, C., et al., *Characteristics of brain tumour-associated headache. Cephalalgia*, 2007. **27**(8): p. 904-911.

87. Dağıstan, Y., E. Dağıstan, and M.S. Güney, *Sebepsiz kişilik değişiklikleri ile başlayan glioblastome multiforme: Bir olgu sunumu*. Abant Tıp Dergisi, 2012. **1**(1): p. 23-25.
88. Zankel, T.C. and C.M. Starr, *Compositions comprising receptor-associated protein (RAP) variants specific for CR-containing proteins and uses thereof*. 2018, Google Patents.
89. Molassiotis, A., et al., *Symptom experience in patients with primary brain tumours: a longitudinal exploratory study*. European Journal of Oncology Nursing, 2010. **14**(5): p. 410-416.
90. la Fougere, C., et al., *Molecular imaging of gliomas with PET: opportunities and limitations*. Neuro-oncology, 2011. **13**(8): p. 806-819.
91. Singh, H., V. Maurya, and S. Gill, *Computerised Tomography Features in Gliomas*. Medical Journal Armed Forces India, 2002. **58**(3): p. 221-225.
92. Kanoto, M., et al., *Radiological imaging features of glioblastoma with oligodendroglioma component: a comparison with conventional glioblastoma*. Acta radiologica open, 2016. **5**(11): p. 2058460116675191.
93. Jia, Z.Z., et al., *Comparison between perfusion computed tomography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in assessing glioblastoma microvasculature*. European journal of radiology, 2017. **87**: p. 120-124.
94. Shukla, G., et al., *Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review*. Chin Clin Oncol, 2017. **6**(4): p. 40.
95. Kinon, M.D., et al., *Glioblastoma multiforme presenting with an open ring pattern of enhancement on MR imaging*. Surgical Neurology International, 2017. **8**.
96. Roh, T.H., et al., *Survival benefit of lobectomy over gross-total resection without lobectomy in cases of glioblastoma in the noneloquent area: a retrospective study*. Journal of neurosurgery, 2019. **132**(3): p. 895-901.
97. Nam, J.Y. and J.F. De Groot, *Treatment of glioblastoma*. Journal of oncology practice, 2017. **13**(10): p. 629-638.
98. Fu, D., J.A. Calvo, and L.D. Samson, *Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(2): p. 104-120.

99. Wong, E.T., et al., *Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2011. **9**(4): p. 403-407.
100. Khasraw, M., et al., *Antiangiogenic therapy for high-grade glioma*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014(9).
101. Zhang, J., M.F. Stevens, and T.D. Bradshaw, *Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance*. Curr Mol Pharmacol, 2012. **5**(1): p. 102-14.
102. Newlands, E., et al., *Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856)*. British journal of cancer, 1992. **65**(2): p. 287-291.
103. Tsang, L.L., et al., *Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 1990. **26**(6): p. 429-436.
104. Rottenberg, D., et al., *In vivo measurement of regional brain tissue pH using positron emission tomography*. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 1984. **15**(S1): p. 98-102.
105. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. The lancet oncology, 2009. **10**(5): p. 459-466.
106. Brennand, J. and G.P. Margison, *Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the Escherichia coli alkyltransferase gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986. **83**(17): p. 6292-6296.
107. Drabløs, F., et al., *Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance*. DNA repair, 2004. **3**(11): p. 1389-1407.
108. Wedge, S., J. Porteous, and E. Newlands, *3-Aminobenzamide and/or O 6-benzylguanine evaluated as an adjuvant to temozolomide or BCNU treatment in cell lines of variable mismatch repair status and O 6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity*. British journal of cancer, 1996. **74**(7): p. 1030-1036.
109. Wedge, S. and E. Newlands, *O 6-Benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O 6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU*. British journal of cancer, 1996. **73**(9): p. 1049-1052.

110. Wedge, S., et al., *Potentiation of temozolomide and BCNU cytotoxicity by O 6-benzylguanine: a comparative study in vitro*. British journal of cancer, 1996. **73**(4): p. 482-490.
111. Kyrtopoulos, S.A., et al., *DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance*. Cancer detection and prevention, 1997. **21**(5): p. 391-405.
112. Margison, G.P. and M.F. Santibáñez-Koref, *O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Role in carcinogenesis and chemotherapy*. Bioessays, 2002. **24**(3): p. 255-266.
113. Mojas, N., M. Lopes, and J. Jiricny, *Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA*. Genes & development, 2007. **21**(24): p. 3342-3355.
114. Cejka, P., et al., *Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1*. The EMBO journal, 2003. **22**(9): p. 2245-2254.
115. Roos, W., M. Baumgartner, and B. Kaina, *Apoptosis triggered by DNA damage O 6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 359-367.
116. Zhukovskaya, N., et al., *DNA replication arrest and tolerance to DNA methylation damage*. Carcinogenesis, 1994. **15**(10): p. 2189-2194.
117. Stojic, L., R. Brun, and J. Jiricny, *Mismatch repair and DNA damage signalling*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 1091-1101.
118. D'Atri, S., et al., *Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis*. Molecular pharmacology, 1998. **54**(2): p. 334-341.
119. Horton, J.K. and S.H. Wilson, *Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency*. DNA repair, 2007. **6**(4): p. 530-543.
120. Zhang, J., M. FG Stevens, and T. D Bradshaw, *Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance*. Current molecular pharmacology, 2012. **5**(1): p. 102-114.
121. Drew, Y. and R. Plummer, *PARP inhibitors in cancer therapy: two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications*. Drug Resistance Updates, 2009. **12**(6): p. 153-156.

122. Plummer, E.R., *Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in cancer*. Current opinion in pharmacology, 2006. **6**(4): p. 364-368.
123. Palma, J.P., et al., *ABT-888 confers broad in vivo activity in combination with temozolomide in diverse tumors*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(23): p. 7277-7290.
124. Plummer, R., et al., *First and final report of a phase II study of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM)*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(18_suppl): p. 8013-8013.
125. Touat, M., et al., *Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights*. Annals of Oncology, 2017. **28**(7): p. 1457-1472.
126. Weller, M., et al., *How we treat glioblastoma*. ESMO Open 4: e000520. 2019.
127. Blankenstein, T., *Gene Therapy: principles and applications*. 1999: Birkhäuser.
128. Barnes, M.N., et al., *Gene therapy and ovarian cancer: a review*. Obstetrics & Gynecology, 1997. **89**(1): p. 145-155.
129. Gottesman, M.M., *Cancer gene therapy: an awkward adolescence*. Cancer gene therapy, 2003. **10**(7): p. 501-508.
130. El-Aneed, A., *Current strategies in cancer gene therapy*. European journal of pharmacology, 2004. **498**(1-3): p. 1-8.
131. Hannon, G.J., *RNA interference*. nature, 2002. **418**(6894): p. 244-251.
132. Tijsterman, M. and R.H. Plasterk, *Dicers at RISC: the mechanism of RNAi*. Cell, 2004. **117**(1): p. 1-3.
133. Cummins, J. and V. Velculescu, *Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6220-6227.
134. Morris, K. and J. Rossi, *Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy*. Gene therapy, 2006. **13**(6): p. 553-558.
135. Grimm, D. and M. Kay, *Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors*. Gene therapy, 2006. **13**(6): p. 563-575.
136. Scherr, M., et al., *Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1566-1569.
137. Rosenblum, D., et al., *Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 1-12.

138. Ozcan, G., et al., *Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics*. *Advanced drug delivery reviews*, 2015. **87**: p. 108-119.
139. Li, L., et al., *Black phosphorus field-effect transistors*. *Nature nanotechnology*, 2014. **9**(5): p. 372.
140. Ozpolat, B. and D.M. Benbrook, *Targeting autophagy in cancer management—strategies and developments*. *Cancer management and research*, 2015. **7**: p. 291.
141. Yoshii, S.R. and N. Mizushima, *Monitoring and measuring autophagy*. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(9): p. 1865.
142. Gallagher, L.E., L.E. Williamson, and E.Y. Chan, *Advances in autophagy regulatory mechanisms*. *Cells*, 2016. **5**(2): p. 24.
143. Chen, Y. and D.J. Klionsky, *The regulation of autophagy—unanswered questions*. *Journal of cell science*, 2011. **124**(2): p. 161-170.
144. Bootman, M.D., et al., *The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus?* *Cell Calcium*, 2018. **70**: p. 32-46.
145. Cerella, C., et al., *From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment*. *Biotechnology advances*, 2014. **32**(6): p. 1111-1122.
146. Chen, R., et al., *The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation*. *Journal of Cell Biology*, 2014. **206**(2): p. 173-182.
147. Ge, J., et al., *Upregulation of autophagy-related gene-5 (ATG-5) is associated with chemoresistance in human gastric cancer*. *PloS one*, 2014. **9**(10): p. e110293.
148. Pengo, N., et al., *A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B*. *Nature communications*, 2017. **8**(1): p. 1-10.
149. Sánchez-Wandelmer, J., et al., *Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation*. *Nature communications*, 2017. **8**(1): p. 1-10.
150. Fulda, S., *Autophagy in cancer therapy*. *Frontiers in oncology*, 2017. **7**: p. 128.
151. Jiang, P. and N. Mizushima, *Autophagy and human diseases*. *Cell research*, 2014. **24**(1): p. 69-79.
152. Rodolfo, C., S. Campello, and F. Cecconi, *Mitophagy in neurodegenerative diseases*. *Neurochemistry international*, 2018. **117**: p. 156-166.

153. Mizushima, N., *The exponential growth of autophagy-related research: from the humble yeast to the Nobel Prize*. Febs Letters, 2017. **591**(5): p. 681-689.
154. Zhou, M., et al., *Luteoloside induces G0/G1 arrest and pro-death autophagy through the ROS-mediated AKT/mTOR/p70S6K signalling pathway in human non-small cell lung cancer cell lines*. Biochemical and biophysical research communications, 2017. **494**(1-2): p. 263-269.
155. Tekedereli, I., et al., *Therapeutic silencing of Bcl-2 by systemically administered siRNA nanotherapeutics inhibits tumor growth by autophagy and apoptosis and enhances the efficacy of chemotherapy in orthotopic xenograft models of ER (-) and ER (+) breast cancer*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013. **2**: p. e121.
156. Akar, U., et al., *Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells*. Molecular Cancer Research, 2007. **5**(3): p. 241-249.
157. Amaravadi, R.K., et al., *Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma*. The Journal of clinical investigation, 2007. **117**(2): p. 326-336.
158. Qadir, M.A., et al., *Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization*. Breast cancer research and treatment, 2008. **112**(3): p. 389-403.
159. Valente, G., et al., *Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer*. BioMed research international, 2014. **2014**.
160. Maycotte, P. and A. Thorburn, *Targeting autophagy in breast cancer*. World journal of clinical oncology, 2014. **5**(3): p. 224.
161. Hamurcu, Z., et al., *Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/Src signaling in triple negative breast cancer cells*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2018. **144**(3): p. 415-430.
162. Bassam, N.E., *Energy plant species: their use and impact on environment and development*. 2013: Routledge.
163. Marinković, M., et al., *Autophagy modulation in cancer: Current knowledge on action and therapy*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018. **2018**.
164. Kondapuram, S.K., S. Sarvagalla, and M.S. Coumar, *Targeting autophagy with small molecules for cancer therapy*. J. Cancer Metastasis Treat, 2019. **2019**.

165. Tang, D.Y., R.A. Ellis, and P.E. Lovat, *Prognostic impact of autophagy biomarkers for cutaneous melanoma*. *Frontiers in oncology*, 2016. **6**: p. 236.
166. Hamurcu, Z., et al., *FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple-negative breast cancer cells*. *Journal of Molecular Medicine*, 2019. **97**(4): p. 491-508.
167. Freshney, R.I., *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 2015: John Wiley & Sons.
168. Pawlowska, E., et al., *An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme—role in pathogenesis and therapeutic perspective*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(3): p. 889.
169. Koukourakis, M.I., A.G. Mitrakas, and A. Giatromanolaki, *Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve*. *British journal of cancer*, 2016. **114**(5): p. 485-496.
170. Lee, C.Y., *Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment*. *OncoTargets and therapy*, 2017. **10**: p. 265.
171. Davis, M.E., *Glioblastoma: overview of disease and treatment*. *Clinical journal of oncology nursing*, 2016. **20**(5): p. S2.
172. Maruyama, T. and N.N. Noda, *Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition*. *The Journal of antibiotics*, 2018. **71**(1): p. 72-78.
173. Thakkar, J.P., et al., *Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2014. **23**(10): p. 1985-1996.
174. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
175. Happold, C., et al., *Transcriptional control of O6-methylguanine DNA methyltransferase expression and temozolomide resistance in glioblastoma*. *Journal of neurochemistry*, 2018. **144**(6): p. 780-790.
176. Jiang, P., et al., *Knockdown of long noncoding RNA H19 sensitizes human glioma cells to temozolomide therapy*. *OncoTargets and therapy*, 2016. **9**: p. 3501.

177. Kanzawa, T., et al., *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells*. Cell Death & Differentiation, 2004. **11**(4): p. 448-457.
178. Noonan, J., J. Zarrer, and B.M. Murphy, *Targeting autophagy in glioblastoma*. Critical Reviews™ in Oncogenesis, 2016. **21**(3-4).
179. Hu, Y.-L., et al., *Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma*. Cancer research, 2012. **72**(7): p. 1773-1783.
180. Belounis, A., et al., *Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma*. BMC cancer, 2016. **16**(1): p. 891.
181. Dikic, I. and Z. Elazar, *Mechanism and medical implications of mammalian autophagy*. Nature reviews Molecular cell biology, 2018. **19**(6): p. 349-364.
182. Zhang, J., et al., *N3-substituted temozolomide analogs overcome methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair precipitating apoptotic and autophagic cancer cell death*. Oncology, 2015. **88**(1): p. 28-48.
183. Krakstad, C. and M. Chekenya, *Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics*. Molecular cancer, 2010. **9**(1): p. 135.
184. Tang, T.-K., et al., *Induction of survivin inhibition, G2/M cell cycle arrest and autophagic on cell death in human malignant glioblastoma cells*. Chin J Physiol, 2015. **58**(2): p. 95-103.
185. Li, Z., et al., *Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II Suppresses the In Vitro Glioblastoma-Induced Angiogenesis by Inducing Autophagy*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017. **10**: p. 208.
186. Zhang, X., et al., *Trifluoperazine, a novel autophagy inhibitor, increases radiosensitivity in glioblastoma by impairing homologous recombination*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2017. **36**(1): p. 118.
187. Schmukler, E., Y. Kloog, and R. Pinkas-Kramarski, *Ras and autophagy in cancer development and therapy*. Oncotarget, 2014. **5**(3): p. 577.
188. Gammoh, N., et al., *Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(17): p. 6561-6565.
189. Fan, Q.-W., et al., *Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma*. Science signaling, 2010. **3**(147): p. ra81-ra81.

190. Gammoh, N., et al., *Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence*. *Autophagy*, 2016. **12**(9): p. 1431-1439.
191. Catalano, M., et al., *Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells*. *Molecular oncology*, 2015. **9**(8): p. 1612-1625.
192. Hamurcu, Z., et al., *FOXMI regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(13): p. 16619.
193. Min, A. and S.-A. Im, *PARP inhibitors as therapeutics: beyond modulation of PARylation*. *Cancers*, 2020. **12**(2): p. 394.
194. Valiakhmetova, A., et al., *Treatment of Pediatric Glioblastoma with Combination Olaparib and Temozolomide Demonstrates 2-Year Durable Response*. *The oncologist*, 2020. **25**(2): p. e198.
195. Rubanyi, G.M., *The future of human gene therapy*. *Molecular aspects of medicine*, 2001. **22**(3): p. 113-142.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Ökkeş Celil GÖKÇEK'e ait “**IDH MUTANT OLMAYAN GLİOBLASTOMA’DA LC3 GENİN INTEGRİN β 1/FAK/SRC YOLAĞI ÜZERİNDEN OTOFAJİYE VE U87 GBM HÜCRE HATTINDA HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ**” adlı çalışma jürimiz tarafından Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:...../...../2020

Başkan :.....

Üye :.....

Üye :.....

.