



GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRPM2 İYON KANALLARINI KONTROL EDEN miRNA'LARIN  
GLİOBLASTOMA MULTIFORME DOKU ÖRNEKLERİNDE GEN  
İFADESİ VE GLİOBLASTOMA KÜLTÜR HÜCRELERİNDE  
TRPM2 KANALLARININ ELEKTROFİZYOLOJİK  
KARAKTERİZASYONU**

Nurcan ŞAHİN DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ramazan BAL

Gaziantep

2014

T.C.

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TRPM2 İYON KANALLARINI KONTROL EDEN miRNA'LARIN  
GLİOBLASTOMA MULTİFORME DOKU ÖRNEKLERİNDE GEN İFADESİ  
VE GLİOBLASTOMA KÜLTÜR HÜCRELERİNDE TRPM2 KANALLARININ  
ELEKTROFİZYOLOJİK KARAKTERİZASYONU**

**Nurcan ŞAHİN DEMİR**

Tez Savunma Tarihi: 04.07.2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

Bu tez çalışmasının bir "Yüksek Lisans" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

**Prof. Dr. Cahit BAĞCI**  
**Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Ramazan BAL**  
**Tez Danışmanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi İmzası**

**Prof. Dr. Cahit BAĞCI**

**Prof. Dr. Ramazan BAL**

**Yrd. Doç. Dr. Hakim ÇELİK**

## **BEYAN**

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

05.06.2014

Nurcan ŞAHİN DEMİR

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın belirlenmesi ve çalışmamın tamamlanması adına bütün bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ramazan BAL'a teşekkürlerimi arz ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan değerli hocamız Prof. Dr. Cahit BAĞCI'ya,

Yüksek lisans çalışmalarım süresince değerli katkı, öneri ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Tuncer DEMİR'e, Doç. Dr. Beyhan CENGİZ'e, Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK'e, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI'ya ve Doç. Dr. Ediz TUTAR'a teşekkürlerimi arz ederim.

Tezin gerçekleşmesi sırasında emeği geçen arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışanlarına,

Son olarak da, tez çalışmam süresince maddi manevi yardımlarını esirgemeyen ve beni yetiştirip bugünlere gelmeme vesile olan değerli aileme, çalışmalarını boyunca benden desteğini eksik etmeyen eşime ve sabırlarından dolayı, çocuklarım Ömer Tugay ve Elif Mercan'a teşekkür ederim.

Nurcan ŞAHİN DEMİR

Haziran 2014/Gaziantep

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
RESİM LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Beyin Tümörleri	5
2.1.1 Nöroepitelyal Doku Tümörleri	6
2.1.2. Periferik Sinir Tümörleri	9
2.1.3. Glioblastoma Multiforme	10
2.1.4. Beyin Tümörlerinde Tanı Metodları	11
2.2. İyon Kanalları	12
2.2.1. Geçici Potensiyel Reseptör Ailesi (Transient Receptor Potential Family, TRP)	13
2.2.2. TRPM2 (Transient Receptor Potential Channel, Subfamily M, Member 2)	14

2.3. mikroRNA (miRNA)	16
2.3.1. Kanserde miRNA	17
2.3.2. Tümör Baskılayıcı miRNA'lar	18
2.3.3. Onkogenik miRNA'lar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi	20
3.2. miRNA ANALİZİ	20
3.2.1. Parafin Bloktan Total RNA Elde Edilmesi	20
3.2.2. miRNA Revers Transkriptaz Sentezi	21
3.2.3. Real-Time PCR ile miRNA Analizi	22
3.3. Yama-Kenetleme (Patch-Clamp) Yöntemi	23
3.3.1. Hücre üzerinde (Cell attached- On cell)	24
3.3.2. Tüm Hücre Kaydı (Whole-cell recording)	24
3.3.3. Dışı Dışarıda (Outside-out)	24
3.3.4. İçi dışarıda (Inside-out)	24
4. İSTATİSTİKSEL İŞLEMLER	27
5. BULGULAR	28
5.1. Glioblastoma Kanser Hücre Kültürlerinde TRPM2 Gen İfadesi Bulguları	28
5.2. Glioblastoma Kanser Dokusunda TRPM2 Genini Hedefleyen mir-4755-3p ve mir-423-5p nin İfadesi	29
5.3. Glioblastoma Kanser Hücre Kültürlerinde Yama-Kenetleme Bulguları	32

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

34

7.KAYNAKLAR

39

## SİMGE VE KISALTMALAR

ACA	N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid
GBM	Glioblastoma multiforme
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
KT	Kemoterapi
miRNA	mikroRNA
MPSNT	Malign periferik sinir kılıfı tümörleri
RT	Radyoterapi
RT-PCR	Real Time - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TRP	Transient receptor potential. Geçici Reseptör Potansiyeli.
WHO	World Health Organization

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1:</b> Memelilerdeki TRP Gen Süperailisinin Filogenetik Ağacı.....	14
<b>Şekil 2.2:</b> TRPM2 nin protein yapısı gözükmetedir.....	15
<b>Şekil 2.3:</b> miRNA nın biyogenezi.....	17
<b>Şekil 3.1:</b> Patch-clamp konfigürasyonları.....	23
<b>Şekil 5.1:</b> U87 glioblastoma hücre hattında TRPM2 ifade seviyesi.....	28
<b>Şekil 5.2:</b> qRT-PCR gen ifadesi analiz sonucu.....	29
<b>Şekil 5.3:</b> miR-4755-3p nin RNU 6 ile normalize edildiğinde farklı evrelerdeki glioblastoma dokularındaki ekspresyon durumunun 4. Evre glioblastoma dokularına göre kıyaslanması.....	30
<b>Şekil 5.4:</b> miR-423-5p nin RNU 6 ile normalize edildiğinde farklı evrelerdeki glioblastoma dokularındaki ekspresyon durumunun 4. Evre glioblastoma dokularına göre kıyaslanması.....	31
<b>Şekil 5.5:</b> Glioblastoma kanser hücre kültürlerinde TRPM2 iyon kanallarının elektrofizyolojik olarak karakterizasyonu.....	33

## RESİM LİSTESİ

- Resim 3.1:** Yama-kenetleme sisteminin genel görünüşü.....25
- Resim 3.2:** Mikroelektrodların üretiminde kullanılan pipet çekici (puller) .....26

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 3.1:** cDNA Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları.....21

**Tablo 3.2:** Real-Time PCR Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları  
.....22

# ÖZET

## TRPM2 İYON KANALLARINI KONTROL EDEN miRNA'LARIN GLİOBLASTOMA MULTİFORME DOKU ÖRNEKLERİNDE EKSPRESYONU VE GLİOBLASTOMA KÜLTÜR HÜCRELERİNDE TRPM2 KANALLARININ ELEKTROFİZYOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Nurcan ŞAHİN DEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Ramazan BAL

Haziran 2014, 46 sayfa

Dünya sağlık örgütü, Glioblastoma multiformeyi (GBM) şiddetlerine göre 4 evreye ayırmıştır. Bunlar evre I, evre II, evre III ve evre IV tür. Bu sıralamaya göre I. evre tümörler en az şiddetli, IV. evre tümörler ise en agresif tümörler olarak bilinmektedir. TRP iyon kanallarının çok çeşitli doku ve hücre gruplarında iyon dengelenmesi ve farklı uyartılara karşı hassas olabilme gibi çeşitli fizyolojik olaylardan sorumlu olduğu bilinmektedir. TRP iyon kanallarının çoğunluğu seçici olmayan katyon kanallarına sahip iken, bazıları  $Ca^{2+}$  iyonlarını oldukça seçici bazıları da  $Mg^{2+}$  iyonlarına karşı geçirgen özellik taşımaktadır. MikroRNA (miRNA) lar yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar hücrede proliferasyonu, hücre farklılaşması veya hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynarlar. Yapılan çalışmalarda miRNAların bazılarının tümör baskılayıcı özelliklerinin yanı sıra bazı miRNA larında onkogenik özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, farklı evrelerdeki glioblastoma hastalarından alınan arşiv materyallerinde TRPM2 genini hedefleyen miR-4755-3p ve miR-423-5p nin ifadesi seviyeleri RT-PCR tekniğiyle araştırılmıştır. Glioblastoma hücre hattı olan U87 de TRPM2 iyon kanallarının varlığı, yama-kenetleme (patch-clamp) tekniği ile gösterilmiştir. Normal beyin dokusu olmadığından 4. evredeki hastaların miR-4755-3p ve miR423-5p ifade değerleri 1 olarak kabul edilmiş ve diğer evredeki hastaların miR-4755-3p ve miR423-5p ekspresyon değerleri evre 4 e göre kıyaslanmıştır. miR-4755-3p ve miR-423-5p nin ekspresyonlarının evre 2 de azaldığı gözlenmiştir. Tüm hücre (whole-cell) akımı kısmen N-(p-amylcinnamoyl) anthranilic acid (AAC) (50 $\mu$ M) tarafından inhibe edilmiştir. ACA'ya duyarlı bu akım, TRPM2 akımı olarak tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Glioblastoma, Kanser, miRNA, Patch-Clamp, TRPM2

## ABSTRACT

### EXPRESSION OF MIKORNAS REGULATING TRPM2 ION CHANNELS IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME TISSUES AND ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TRPM2 CHANNELS IN GLIOBLASTOMA CELL LINES

Nurcan ŞAHİN DEMİR

Master of Science Thesis, Department of Physiology

Supervisor: Prof. Dr. Ramazan BAL

June 2014, 46 pages

World Health Organization (WHO) divided gliomas into four grades depending on their aggressiveness; grade I, grade II, grade III and grade IV. According to this grading, grade I is the most benign and grade IV is the most malignant tumors. It was found that TRP ion channels are responsible for several physiological phenomena such as ionic equilibrium and sensitivity to different types of stimuli in many cell groups and tissues. Many of TRP ion channels have nonselective cation channels, whereas some of them are selective for  $Ca^{2+}$  ions, some are permeable to  $Mg^{2+}$  ions. miRNAs are small RNA molecules with 18-24 nucleotides. miRNAs have important roles in cell proliferation, cell differentiation and cell death. It has been suggested that some miRNAs are acting as tumor suppressors, whereas others have oncogenic properties. The aim of the study is to analyze the expression of miR4755-3p and miR-423-5p, which target TRPM2 in paraffin tissue samples taken from different glioblastoma patients with different grades by using qRT-PCR. Presence of TRPM2 channels was demonstrated by using patch-clamp technique in glioblastoma cell line U87. The expression levels of miR-4755-3p and miR423-5p of grade IV patients were assumed as 1 because of absence of normal brain tissue. The expression levels of miR-4755-3p and miR423-5p of patients with grade I, II and III were compared with grade IV. It was found that the expression levels of miR-4755-3p and miR423-5p were decreased in grade II. Whole cell current was partially blocked by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid (ACA) (50 $\mu$ M). The ACA-sensitive current was referred to as TRPM2 current.

**Key words:** Glioblastoma, Cancer, miRNA, Patch-Clamp, and TRPM2

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütüne (WHO, World Health Organization) göre, ilk 5 yaşından sonra hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ilk üç ölüm nedenlerinden birisi kansere bağlı ölümlerdir. 2003 yılı verilerine göre, dünyada her yıl 6,4 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmakta ve 4,8 milyon kişi de kanser nedeni ile ölmektedir. İntrakranial tümörler bütünüyle bakıldığında, bütün kanserlerin yaklaşık olarak %1,5'inden ve bütün kansere bağlı ölümlerin %2'sinden sorumludur. Kansere bağlı ölümlerde dördüncü sıradadır. Primer beyin tümörü insidansı, 70 yaş civarında 100.000'de 20 iken, 15 yaş altı çocuklarda 100.000'de 2'den azdır. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %20'sini beyin tümörleri oluşturur. Glioblastoma multiforme, erişkinlerde görülen en sık primer beyin tümörü olup, bilinen en hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir (1).

Glioblastoma multiforme (GBM) her yaşta görülebilen, en sık primer beyin tümörüdür. Erkeklerde daha sık görülür. E/K oranı 1,6'dır. Her yaşta görülebilirler. Tanı sonrası ortalama sağkalım bir yıldan azdır. En uygun tedavi koşullarında bu süre iki yıla uzayabilmektedir. Tedavi uygulamalarındaki gelişmelere rağmen, GBM tedavi sonuçlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu nedenle, malign gliomalarda RT ile kombine edildiğinde faydalı olabilecek diğer tedavi stratejilerini geliştirmek için prelinik ve klinik çalışmalar artarak devam etmektedir. Günümüzde GBM'li olgularda standart tedavi; cerrahi + radyoterapi (RT) ± kemoterapi (KT)'dir. GBM'li olgularda ikibinli yılların başından itibaren temozolamid kemoteropatik ajan olarak standart tedavideki yerini almıştır. Bu gelişmelere rağmen KT'nin primer hastalığın adjuvan tedavisinde veya nüksten sonra kullanımı sınırlı bir rolü vardır. Sağkalım süresini uzatmak için farklı tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Yüksek doz RT, adjuvan KT, ağır partikül tedavisi, RT ile birlikte radyoduyarlaştırıcı kullanımı, intertisyel brakiterapi, radyocerrahi, sterotaktik fraksiyone RT, yoğunluk ayarlı RT (IMRT) geliştirilmeye çalışılan tedavi şekillerinden bazılarıdır (2).

Geçici potansiyel reseptör gen ailesinin (TRP) varlığı, 1969 yılında ilk olarak sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster*) gözlemlenmiştir (3-5) ve 1989 yılında da başka bir

grup araştırmacı tarafından TRP genleri olarak isimlendirilmiştir (4-6). TRP protein ailesinin, hücre zarında iyon kanalı olarak görev yaptıkları gösterilmiştir (4, 6-7). *Drosophila* TRP proteininin  $Ca^{2+}$  geçirgen kanal olarak tanımlanması (8-10) ve memelilerde homologunun keşfi (11-12), TRP kanallarındaki  $Ca^{2+}$  sinyali üzerine olan araştırmaların artmasına neden olmuştur (11, 13-14). TRP gen ailesinin üyeleri mayalarda, omurgasız ve omurgalı canlılarda bulunduğu gösterilmiştir (15). TRP ailesi aminoasitlerindeki benzerliklerine göre yedi gruba ayrılmıştır (15). Bunlar; TRPC (kanonik yada klasik), TRPV (vanilloid reseptör), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPA (Ankirin zengin protein) ve TRPN (NOMPC). TRP iyon kanallarının, çok çeşitli doku ve hücre gruplarında iyon dengelenmesi ve farklı uyartılara karşı hassas olabilme gibi çeşitli fizyolojik olaylardan sorumlu olduğu gösterilmiştir (5). TRP iyon kanallarının çoğunluğu seçici olmayan katyon kanallarına sahip iken bazıları  $Ca^{2+}$  iyonlarına bazıları da  $Mg^{2+}$  iyonlarına karşı geçirgen özellik taşımaktadır. Bu kanallar aynı zamanda çeşitli katyonların hücreler arası katyon ( $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  gibi) iletiminde kapıcı gibi görev alırlar. Hücre içi  $Ca^{2+}$  salınım kanalları gibi işlevlerinden dolayı onların hücre sel organeller (Lizozom ve Endozom) üzerinde önemli bir düzenleyici role sahip olduğu tespit edilmiştir (5).

Küçük RNA olarak adlandırılan miRNA (microRNA), kodlanmayan RNA (noncodingRNAs) grubuna aittir ve yaklaşık bir miRNA 18-25 nükleotit uzunluğundadır (16). miRNA'ların insan genomunun %1-2'sinden oluştuğu ve protein kodlayan genlerin yaklaşık %50'sinin işlevini kontrol ettiği tahmin edilmektedir (17). Son yapılan çalışmalarda miRNA'ların normal olmayan ifadesi, kanser ile ilişkilendirilmiş çeşitli yolaklarla ilişkili olduğu bulunmuştur (18-19). miRNA'lar, onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak ifade edilebilirler (19).

Bu çalışmada, glioblastoma kanserinin etyopatogenezinde TRPM2'nin rolü olabileceği düşüncesiyle farklı evrelerdeki gliolastoma hastalarından alınan arşiv materyallerinde TRPM2 genini hedefleyen miR-4755-3p ve miR-423-5p nin ifadesi seviyeleri qRT-PCR tekniğiyle araştırılmıştır. Ayrıca Glioblastoma hücre kültüründe TRPM2 kanallarının patch-clamp yöntemiyle aktivitesi incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Beyin Tümörleri

Günümüzün ölüm nedenleri arasında kanser, ikinci sırada yer almaktadır. Kanserin tanısı ve tedavisine olanak sağlamak amacıyla kanser araştırmacıları kanserin biyolojik kökeni, kansere eğilimi artıran genetik değişiklikler ve kanser oluşumuna katılan genler ve sinyal ileti yollarını aydınlatma alanlarında büyük gelişmeler kat etmektedir. Son yıllarda kanser belirteçlerinin ortaya çıkmasını sağlayan en önemli gelişmeler; kanser kök hücrelerinin keşfedilmesi, epigenetik faktörler, kodlanmayan büyük ve küçük RNAlar, miRNA gibi parametreler yer almaktadır.

Kanserle ilgili birçok sinyal ileti sisteminde rol oynayan miRNAlar, kanser hücrelerinin ve kanser kök hücrelerinin kendi-kendini yenileme ve farklılaşmasını da düzenlemektedir. Normal ve transforme olmuş kök hücrelerin kendi-kendilerini yenileme mekanizmaları, benzer sinyal ileti sistemleri ile, fakat farklı şekilde düzenlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, normal kök hücreler ile kanser kök hücreleri arasında bir çok benzerlik bulunduğu saptanmıştır.

Kanseri başlatan hücreler olarak da adlandırılan kanser kök hücreleri, kanserin başlaması, ilerlemesi ve klasik tedavi şekillerine direnç göstermesinden sorumludurlar. Multi-potent dokuya özgü, yetişkin kök hücrelerde ve öncü hücrelerde ortaya çıkan genetik ve epigenetik ve miRNA ekspresyonundaki değişikliklerin, kanser kök hücrelerinde tümör oluşumuna öncülük ettiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmektedir.

WHO, 2000 yılında sinir sistemi tümörlerini anaplazi evresine göre sınıflandırmıştır.

## **2.1.1. Nöroepitelyal Doku Tümörleri**

### **1. Astrositik tümörler**

- a. Diffüz astrositoma
  - 1. Fibriler astrositoma
  - 2. Protoplazmik astrositoma
  - 3. Gemiositik astrositoma
- b. Anaplastik astrositoma
- c. Glioblastoma multiforme
  - 1. Dev hücreli glioblastoma
  - 2. Gliosarkom
- d. Pleomorfik ksantroastrositom
- e. Subependimal dev hücreli astrositom

### **2. Oligodendroglial tümörler**

- a. Oligodendrogliom
- b. Anaplastik oligodendrogliom

### **3. Mixed gliomalar**

- a. Oligoastrositom
- b. Anaplastik oligoastrositom

### **4. Ependimal tümörler**

- a. Ependimoma
  - 1. Sellüler

2. Papiller

3. Clear cell

4. Tanisitik

b. Anaplastik ependimoma

c. Miksopapiller ependimoma

d. Subependimoma

### **5. Koroid plexus tümörleri**

a. Koroid pleksus papillomu

b. Koroid pleksus karsinomu

### **6. Nöronal ve karışık nöroglial tümörler**

a. Gangliositom

b. Serebellumun displastik gangliositomu

c. Desmoplastik infantil astrositom

d. Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör

e. Gangliogliom

f. Anaplastik gangliogliom

g. Santral nörositom

h. Serebellar liponörositom

i. Filum terminalenin paragangliomu

### **7. Nöroblastik tümörler**

a. Olfaktor nöroblastom (estesionöroblastom)

- b. Olfaktor nöroepitelyom
- c. Adrenal gland ve sempatik sinir sistemi nöroblastomu

## **8. Pineal parenkimal tümörler**

- a. Pineasitom
- b. Pineablastom
- c. Orta evrede diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör

## **9. Embriyonel tümörler**

- a. Medullaepitelyom
- b. Ependimoblastom
- c. Medullablastom
  - 1. Desmoblastik medullablastom
  - 2. Large cell medulloblastom
  - 3. Medullomyoblastom
  - 4. Melanositik medulloblastom
- d. Supratentoryel primitif nöroektodermal tümörler
  - 1. Nöroblastom
  - 2. Ganglionöroblastom
- e. Atipik teratoid/rabdoid tümör

## **10. Orjini belirsiz glial tümörler**

- a. Astroblastom
- b. Gliomatosis serebri

c. 3. ventrikül koroid gliomu

## **2.1.2. Periferik Sinir Tümörleri**

### **1. Schwannoma**

- a. Sellüler
- b. Pleksiform
- c. Melanositik

### **2. Nörofibrom**

- a. Pleksiform

### **3. Perinörom**

- a. İntranöral perinörom
- b. Yumuşak doku perinöromu

### **4. Malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPSNT)**

- a. Epiteloid
- b. Diverjant mezenkimal ve / veya epiteloid farklılaşma gösteren MPSNT
- c. Melanotik
- d. Melanotik psammomatöz

Bu sınıflandırmaya göre astrositik tümörler; pilositik astrositom (evre I), diffüz astrositom (evre II), anaplastik astrositom (evre III) ve glioblastoma multiforme (evre IV) olarak evrelendirilmektedir (20) Bu tümörlerin görülme yaşı ve sıklığı, farklılık göstermektedir. Son iki dekatta primer beyin tümörlerinin görülme oranının arttığı gösterilmiştir (21).

### 2.1.3. Glioblastoma Multiforme

Yetişkinlerde saptanan en yaygın beyin tümörü Glioblastoma Multiformedir. GBM, tüm beyin tümörlerinin %20-25'ini oluşturur. WHO, GBM'i nekroz ve vasküler proliferasyon özelliklerine göre evre I-II-III-IV olarak sınıflandırmaktadır.

GBM, günümüzde yaygın olarak rastlanan ve mortalitesi oldukça yüksek olan bir beyin tümörü tipidir. Erişkinlerde en sık rastlanan ve en malign beyin tümörü olmakla beraber hızlı ilerlemesinin yanı sıra çevre dokulara çabuk ve yoğun yayılması nedeni ile de tedavisi oldukça zordur. Cerrahi olarak tümörün tamamının çıkarılması da genellikle mümkün olmamaktadır. Aynı tümör dokusunda ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının değişmesinden dolayı “multiform” olarak isimlendirilmektedir. Tüm kanserlerde olduğu gibi GBM dokusuna ait tümör hücrelerinde de yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, anjiyogenez, kontrolsüz bölünme, doku invazyonu ve apoptoza direnç görülmektedir.

GBM, diğer malign tümörlerde olduğu gibi, kontrolsüz gelişme, dokuya invazyon yapabilme, apoptozisin azalması ve anjogenesis gibi malign fenotipik özelliklere sahiptir (22).

Glioblastomlar, moleküler temelde birincil ve ikincil olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. GBM'lerin %90'ı birincil GBM, %10'u ise ikincil GBM olarak tanımlanır. Birincil GBM'ler glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler. Primer GBM'lerin öncesinde düşük evreli gliomlardan ikincil olarak gelişir. Bu nedenle birincil GBM'ler 60'lı daha fazla görülmektedir (23).

GBM nin en yaygın belirtileri; baş ağrısı, bulantı, kusma, epileptik nöbetler, nöromotor fonksiyon kaybı ve mental değişikliklerdir. GBM'nin neden olduğu semptom ve belirtilerin çoğu hızlı büyümekte olan tümöre, çevresinde yaptığı ödeme, obstrüksiyona ve artmış kafa içi basınca bağlıdır. Tümör lokalizasyonuna bağlı olarak fokal bulgular da oluşabilir (24). GBM tedavisi güçtür, yüksek morbidite ve mortalite riskine sahiptir.

Günümüzde GBM'li olgularda standart tedavi; cerrahi + radyoterapi (RT) ± kemoterapi (KT)'dir (25). GBM'li olgularda 2000 li yılların başından itibaren temozolamid

kemoteropatik ajan olarak standart tedavideki yerini almıştır. Bu gelişmelere rağmen KT'nin primer hastalığın adjuvan tedavisinde veya nüksten sonra kullanımı sınırlı bir rolü vardır (26-27). Sağkalım süresini uzatmak için farklı tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Yüksek doz RT, adjuvan KT, radyoterapide alternatif fraksiyonasyon rejimleri, ağır partikül tedavisi, RT ile birlikte radyoduyarlaştırıcı kullanımı, intertisyel brakiterapi, radyocerrahi, yoğunluk ayarlı RT (IMRT) geliştirilmeye çalışılan tedavi şekillerinden bazılarıdır (2, 28-29).

#### **2.1.4. Beyin Tümörlerinde Tanı Metodları**

Beyin tümörlü hastaların ilk muayenesi, ayrıntılı bir hikaye almayı ve fizik muayeneyi kapsamalıdır. Aile hikayesi önemlidir. Beyin tümörleri ile ilişkili olan herediter hastalıklar, kimyasal maddelere maruz kalınmış olması, enfeksiyon hikayesi etyolojinin belirlenmesinde yardımcı olabilir (30-31). Nörolojik muayenede davranış biçimi, duygusal yapı, entellektüel düşünce gibi mental durumun saptanması; yürüme, denge gibi koordinasyon durumunun tespiti; ağrı, dokunma, vibrasyon gibi duyuşsal algılamaların anlaşılması; kas gücü, kas tonusu, pasif hareketlere karşı kasların direnci gibi motor yanıtı ve kranyal sinirlerin sağlıklı çalışıp çalışmadığının belirlenmesi amaçlanır. Yapılması gereken bir diğer rutin test ise, artan intrakranyal basıncın önemli bir göstergesi olan, papil ödem varlığını göstermek için göz dibi muayenesidir (30-31). Görme alanı muayenesi ise optik sinir, optik kiazma, optik traktusu etkileyen veya oksipital lobda lokalize tümörlerde yararlı olur (32).

Glial tümörlerinde BT, tanı koyma, lokal tedavileri planlarken tümör boyutunu ölçme, tedavi altındaki hastalarda tümöre bağlı değişen parametrelerin değerlendirilmesi ile, tedavinin etkinliğini belirleme ve tedavi sonrası takiplerde, tedaviye yanıtı ölçmede yaygın olarak kullanılan temel yöntemdir. GBM genellikle BT'de "hipodens" lezyonlardır, ancak "izodens" de olabilirler. Kontrast madde enjeksiyonunu takiben BT'de kontrast tutan bölgeler, tümör dokusunu yansıtır. Kontrast madde tutulumu, bir tümörün çevresinin tanımlanması için gereklidir. Tümör boyutunu tanımlamada pek çok klinisyen, BT'de kontrast madde tutmuş alanları kullanmıştır. BT'de kontrast tutulumu, neovaskülarite

varlığı ile ilişkilidir. BT’de tümöral doku içinde yer alan düşük dansiteli alanlar, kanlanmanın zayıf olduğu alanları belirler. Bu bölgeler aynı zamanda nekrozu da temsil eder. BT’de görülen tümör çevresindeki düşük dansiteli alanlar ise, tümöre bağlı gelişen ödem gösterir. BT, tanı ve cerrahi rezeksiyon sonrası tedavilere temel oluşturacak rezidüel tümörün boyutunu belirlemek amacıyla da kullanılmaktadır.

Son 20 yıldır, MRİ ve BT, intrakraniyal ve spinal lezyonların tanısında standart kullanıma girmiş tekniklerdir. BT; beyinin anatomik tanımlamasını yaparak, kontrastın yoğunlaştığı hacimle ilişkili olarak, bir bölgede gelişen tümöral yapıyı gösterir. BT tümörün lokalizasyonu, yayılımı, evresi, tek veya çok odaklı olması, tek ya da çift taraflı yerleşimi, ekilim yapmış olması gibi gelişme şekli ile birlikte; ödem, santral hipodens alanları varlığıyla nekrozu, kalsifikasyonu gibi ayrıntıları hakkında da bilgi verir. Fiziksel temeli anatomik yapıdaki elektromanyetik etkileşim yeteneğine dayanan MRI ise; normal anatomik yapıyı ve beyin parankimindeki değişiklikleri daha detaylı gösterir. Günümüzde BT ve MRI ile tümör büyüklüğü ölçümleri yapılabildiğinden, tedaviye cevabı ölçmekte öncelikle kullanılan teknikler olarak kabul edilmişlerdir (32). MRG’de glioblastomalar heterojen kitleler şeklinde görünürler. Bu heterojen görünüm nekroz ve/veya kist oluşumuna bağlıdır.

## **2.2. İyon Kanalları**

İyon kanalları hücre zarında gözenek oluşturan, görevleri geçici zar potansiyeli oluşturmak, aksiyon potansiyelini şekillendirme ve diğer elektriksel sinyalleri iletmek olan zar proteinleridir. Ayrıca hücre hacmini kontrol etmek amacıyla, salgı ve epitel hücrelerinde iyonların hücre zarı boyunca akışını düzenleyici rolleri vardır. Tüm hücrelerin hücre zarında iyon kanalları bulunur. İyon kanalları, iyonofor proteinlerin iki geleneksel grubundan biri kabul edilir. İkinci grup iyon taşıyıcı proteinler ise, sodyum-potasyum pompası, sodyum-kalsiyum değiştiricisi ve sodyum-glukoz nakil proteinleri olarak sayılabilir.

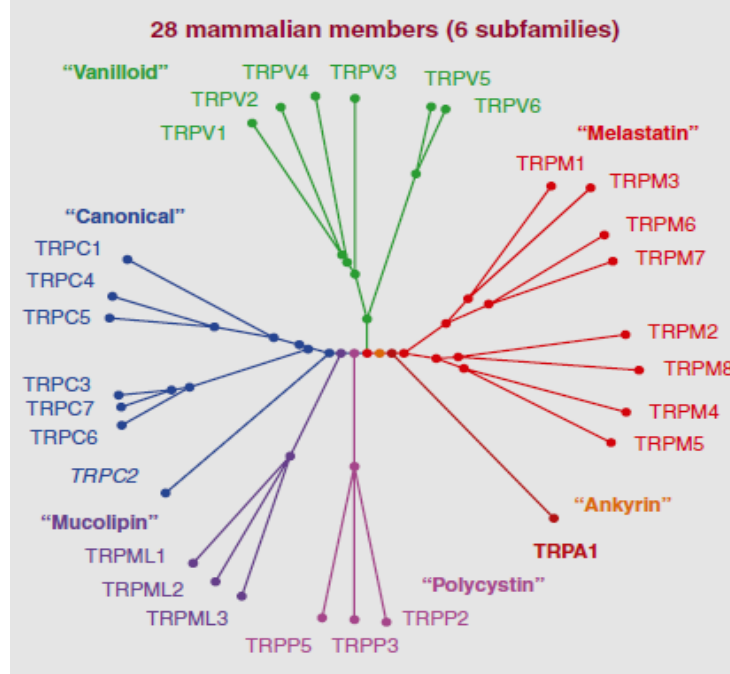
### 2.2.1 Geçici Potensiyel Reseptör Ailesi (Transient Receptor Potential Family, TRP)

Geçici potensiyel reseptör genlerinin varlığı 1969 yılında ilk defa sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster*) gözlemlenmiştir (3, 5). 1989 yılında Montel ve Rubin tarafından TRP genleri olarak adlandırılmıştır (5-6). Bu genlerin kodladığı proteinlerin hücre zarında iyon kanalı olarak görev yaptıkları saptanmıştır (5, 7). *Drosophila* TRP proteininin  $Ca^{2+}$  geçirgen kanal olarak tanımlanması ve memelilerde homologunun keşfi, TRP kanallarındaki  $Ca^{2+}$  sinyali üzerine olan araştırmaların artmasına neden olmuştur.

TRP aile üyelerinin maya hücrelerinde, omurgasız ve omurgalılarda bulunduğu saptanmıştır (15). TRP ailesi aminoasit benzerliklerine göre altı gruba bölünmüştür (15): TRPC (kanonik yada klasik), TRPV (vanilloid reseptör), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPA (Ankirin zengin protein) ve TRPN (NOMPC). TRPN sadece balık ve omurgasızlarda bulunmuştur (Şekil 2.1) (15). TRP iyon kanalları çok çeşitli doku ve hücre gruplarında iyon dengelenmesi ve farklı sinyallere karşı hassas olabilmeye gibi çeşitli fizyolojik olaylardan sorumlu olduğu anlaşılmıştır (15). TRP iyon kanallarının çoğunluğu seçici olmayan katyon kanallarına sahip iken, bazıları  $Ca^{2+}$  iyonlarına oldukça seçici bazıları da  $Mg^{2+}$  iyonlarına karşı geçirgenlik özelliği taşımaktadır. Bu kanallar aynı zamanda çeşitli katyonların hücreler arası katyon ( $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  gibi) iletiminde kapıcı gibi görev alırlar. Hücre içi  $Ca^{2+}$  salınım kanalları gibi işlevlerinden dolayı bunların hücresel organeller (Lizozom ve Endozom) üzerinde önemli bir düzenleyici role sahip olduğu tespit edilmiştir (15, 33). Çeşitli TRP genlerinde meydana gelebilecek mutasyonlar nörodejeneratif hastalıklar, iskelet displazisi (dysplasia), böbrek bozuklukları ve ağrı gibi patolojik durumların ortaya çıkmasında rol oynamaktadırlar. Günümüzde devam eden bilimsel çalışmalar yukarıda saydığımız patolojik rahatsızlıklara yeni tedavi yöntemleri bulmada yardımcı olacaktır (15).

TRP kanallarının çevresel uyarılardaki değişiklikleri ayırtedici olarak belirleyen biyolojik sensörler oldukları düşünülmektedir. TRP kanalları sıcak/soğuk, doğal kimyasal bileşikler (mentol, kafur, acı biber), mekanik uyarın, lipid tabakanın içeriğindeki değişiklikler gibi birçok uyarın ile açılmaktadır. TRP kanalları kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesi, renal  $Ca^{2+}$  /  $Mg^{2+}$  kontrolü, keskin tad ve kokulu bileşiklerin (hardal,

sarımsak gibi) mekanik değişikliklerin, ağrının, ısının, tadın, kokunun, sesin, feromonların, ışığın algılanması gibi önemli birçok süreçte işlev görmektedir (34-35).

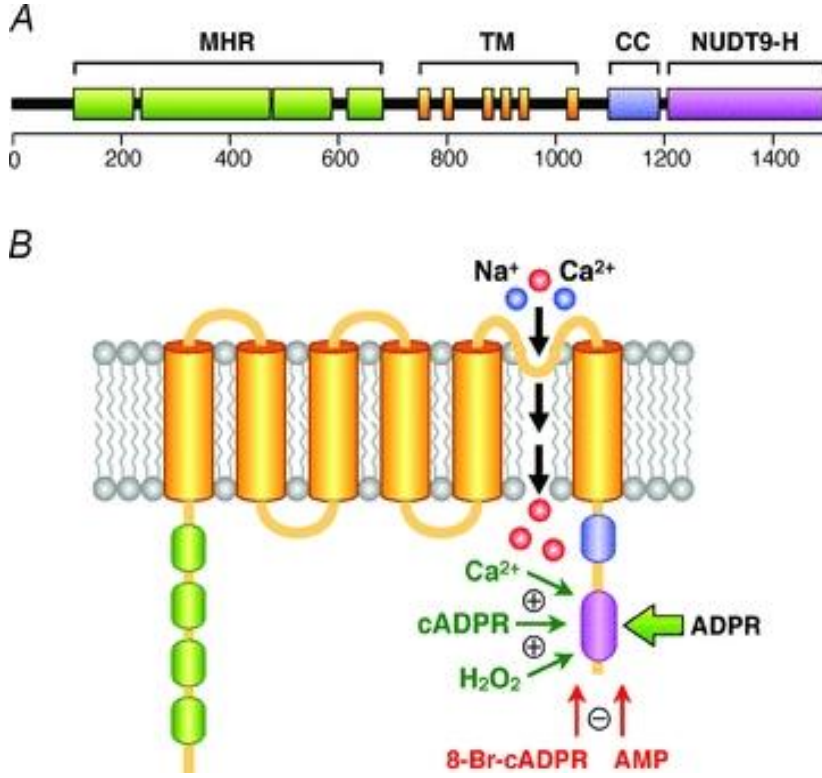


**Şekil 2.1:** Memelilerdeki TRP Gen Süperailisinin Filogenetik Ağacı. 6 aileden ve 28 üyeden meydana gelmektedir. TRPC (kanonik yada klasik), TRPV (vanilloid reseptör), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPA (Ankirin) (36).

### 2.2.2. TRPM2 (Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 2)

TRPM2 proteini, TRPM2 geni tarafından kodlanmaktadır. Beyinde gen ifadesi olmaktadır. Beyinde gen ifadesi olması dolayısıyla manik-depresif hastalarıyla ilişkilendirilmektedir (37). TRPM2 nin fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda insülin salınımıyla bağışıklık hücrelerinin TNF alfa etkileriyle ilişkilendirilmektedir (38-39). Bunların yanı sıra bir çok inflamasyonla, metabolik hastalıkla, obeziteyle beyindeki toksik amiloid beta proteinleriyle ve Alzheimer hastalığıyla da ilişkilendirilmiştir (40-41).

TRPM2'ler kalsiyum iyonlarının hücre zarından geçişi konusunda seçici değildir. TRPM8 kanallarında, mentol ve soğuğa karşı hassasiyet gözlenirken, TRPM2 de soğuğa karşı herhangi bir hassasiyetten söz etmek mümkün değildir. TRPM2 lerin bir çok alternatif çeşitleri tanımlanmış olmasına rağmen tüm parça olan proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (42-44).



Şekil 2.2: TRPM2 nin protein yapısı [45].

İnsan TRPM2 proteini yaklaşık olarak 170 kDa ve 1503 aminoasitten oluşmaktadır. (farelerde ise 1507 aminoasiddir). TRPM2 proteininin N terminali ucunda dört tane birbirinin benzeri olan, fonksiyonu bilinmeyen ve kalsiyumu bağlama yeteneği olan kalmodulin, 6 adet de transmembrane segmentten oluşmaktadır. TRPM 2 kanalları S5 ve S6 domainleri arasında bulunan kısımlarda lokalize olmaktadır (Şekil 2.2) (45).

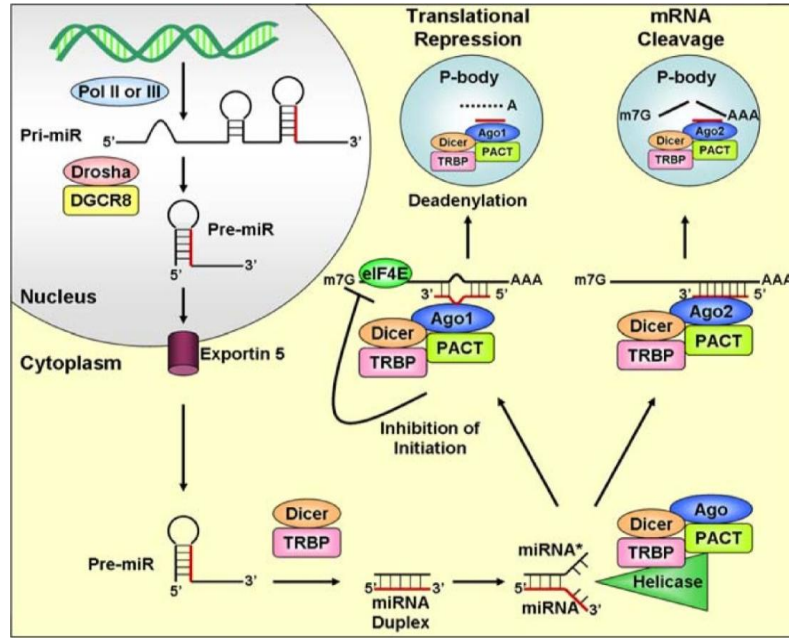
TRPM2 nin C terminal ucunda ise TRP kutusu coil coil (sarmal –sarmal) domainler ve C terminal ucu Adenozin difosfatribose (ADPR), pürofosfotaz (NUDT9) domaninlerinden oluşmaktadır (45). TRPM2 nin C ve N terminal uçları sitoplazmaya bakmaktadır. Sitolitik ADPR TRPM2 nin NUDT9 H bölgesine bağlanarak, kalsiyum ve sodyumun hücre içerisine geçişini sağlarlar (45).

### 2.3. mikroRNA (miRNA)

mikroRNA (miRNA) lar yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (46). miRNA'lar hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması veya hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynarlar. Yapılan çalışmalarda miRNAların bazılarının tümör baskılayıcı özelliklerinin yanı sıra bazı miRNA'ların da onkogenik özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (47-49). Kanserin başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar, hedefledikleri genin karakterine göre, tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler. İlk olarak miRNA'lar 1993 yılında keşfedilmiş olup, miRNA tanımı 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (50). miRNAlar ağırlıklı olarak yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans* gen içeriği bakımından tanınmıştır, *lin-4* olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini raporlamışlar (51). *Let-7*'nin insanlar da dahil olmak üzere tüm türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup, bu durum *let-7* nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu düşündürmüştür. Daha sonraki yıllarda *let-4* ve *let-7*'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (52).

miRNA'lar öncelikli olarak miRNA genlerinden primer miRNA (primiRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci olarak primiRNA'lar prekürsör miRNA(pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Son adım olarak olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (53). miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (Şekil 2.3) .

Pre-miRNA Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA'ları oluşturur (54). Dicer tarafından kesilen pre-miRNA'nın miRNA RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5'ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik, kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, mRNA'nın parçalanmasına veya protein sentezlenmesinin baskılanmasına neden olurlar (55).



Şekil 2.3: miRNA'nın biyogenezini. (53)

### 2.3.1. Kanserde miRNA

Tanımlanmış bazı miRNA'ların kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu ile ilgili yapılan ilk çalışmada hastalarda miR-15a ve miR-16-1 düzeyleri azalmış veya herhangi bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir (56). Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarının yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesinin delesyona uğramadığı da ayrıca gösterilmiştir. miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre, onkogenik

veya tümör süpresör özellik kazanabilir. Normal dokularda, miRNA'ların bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları; bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar, "tümör baskılayıcı miRNA'lar (TB-mir) olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi olarak, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar, bir tümör süpresörün baskılanmasını sağlarlar. miRNA'lar, onkogen ve tümör süpresör mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir. Bu yüzden, belirli bir miRNA'nın gerçek fonksiyonu ya TB-mir'in veya onko-mir'in hücrel içeriğine bağlıdır (57).

### **2.3.2. Tümör Baskılayıcı miRNA'lar**

miRNA'ların kanserleşme sürecine etkisi yapılan bir çok çalışmayla ortaya konulmuştur (58-61). Yapılan araştırmada miR-15a ve miR16-1 ekspresyon seviyelerinin KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan *Bcl-2*'nin üretimi ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir (62). Bu iki miRNA'nın düşük seviyelerinin (tümör süpresör fonksiyon kaybı) yüksek seviyede *Bcl-2* proteini ile ilişkili olduğu dolayısıyla anormal hücre büyümesini gerçekleştirdiği, yüksek seviyelerinin (normal tümör süpresör aktivite) ise apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. miR200 ve mir34 tümör baskılayıcı miRNA olup miR 200 ailesinin beş adet üyesi bulunmaktadır. miR200 ağırlıklı olarak epitelden mezankime geçişte rol alarak, kanser kök hücrelerini baskılamaktadır (63). Akciğer tümör dokularında yapılan araştırmalarda; *let-7*'nin, onkogen olan RAS'ın aktivitesini kontrol ettiği gösterilmiştir (64-65). GBM'nin yaklaşık %60-70 de p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlar tespit edilmiştir (66). GBM'de, p53 ün izoformu olan p63, p73 ve miR34 ün kritik rol oynadığı gösterilmiştir (67).

### **2.3.3. Onkogenik miRNA'lar**

Tümör süpresör miRNA'ların tersine, onkogenik miRNA'lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi arttırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler.

Geçtiğimiz son 10 yılda bir çok kanserde ve GBM’de miRNAların rolü büyük önem kazanmaktadır. miRNA ve kanserle ilgili çok sayıda çalışma yapılmakta ve yayınlanmaktadır. Kanserde bazı miRNA ların ekspresyonu artarken bazı miRNA ların azalmış bazılarının ise ekspresyonunda düzensizlikler ortaya konulmuştur (67). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miR-155’in B hücreli lenfoma, meme, pankreas, akciğer ve Hodgkin’s lenfoma gibi kanserlerde ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir (68-69). miRNA ların hangi genleri hedeflediği veya hangi genlerin hangi miRNA lar tarafından hedeflendiğini göstermek için bir çok bilgisayar yazılımı ortaya konulmuştur. (Örneğin: [www.microrna.org](http://www.microrna.org), [www.mirdb.org](http://www.mirdb.org), [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org), [www.ncrna.org](http://www.ncrna.org) ve benzeri bir çok online yazılım bulunmaktadır. Bir miRNA bir çok geni hedefleyebileceği gibi bir miRNA da bir çok geni hedefleyebilmektedir.

## **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi**

Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 07.01.2014 tarihli 07.01.2014/28 karar numarası ile onay alınan bu çalışmada Gaziantep Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji bölümü arşivinden evre 1-2-3-4 Glioblastoma karsinom nedeni ile cerrahi uygulanmış hasta dokuları seçildi. Olgulara ait H&E boyalı tümamlar gözden geçirildi. Histolojik evre ve histolojik tiplendirme parametreleri açısından tekrar değerlendirildi ve gruplara ayrıldı.

### **3.2. miRNA ANALİZİ**

#### **3.2.1.Parafin Bloktan Total RNA Elde Edilmesi**

Parafin bloklardan total RNA izolasyonu, miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak yapılmıştır. Üretici firmanın tavsiyesine göre protokol izlenmiştir.

Aynı hastaya ait tümörlü parafin bloklar seçildi. Parafin bloklardan 3,5 µm kalınlığında 10-12 kesit 1,5 ml lik ependorf tüpüne alındı. Tüplere 200 µm ksilen eklenerek 10sn vortekslendikten sonra kısa süre santrifüj edildi. 56 °C' de 3 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğutuldu. 200 µm PKD buffer eklendikten sonra vortekslenerek 1dk 10000 rpm de santrifüj edildi. 10 µm proteinaz K eklenerek karıştırıldı. Önce 56 °C' de 15 dakika sonra 80 °C' de 15 dakika inkübe edilerek proteinler yok edildi. 3 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 15 dakika 13500 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant 2ml tüpe alınıp pellet atıldı. Süpernatanta 10 µm DNase booster buffer eklenerek kısa süre santrifüj edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. 400 µm RBC buffer eklendi. 1250 µm %100 etil alkol eklenerek pipetle karıştırıldı. Karışımdan 700 µm alınarak RNA filtreli (RNeasy MinElute spin) tüpe aktarıldı. 15 sn 10000 rpm de santrifüj edildi. Filtre yeni tüpe alınarak tekrar 700 µm eklenerek karışım bitene kadar bu adımlar tekrar edildi. RNeasy MinElute spin filtreye 500 µm RPE buffer eklenerek 2 dk 10000 rpm de santrifüj edildi. RNeasy MinElute spin filtre yeni bir tüpe alınarak 5 dk yüksek hızda santrifüj edildi.

RNeasy MinElute spin filtre yeni bir tüpe alınarak 25 µm RNase free water eklenerek 1dk yüksek hızda santrifüj edildi. Total RNA filtreden tüpe aktarılmış oldu. RNA örnekleri - 80° C’de saklanmıştır.

### 3.2.2 miRNA Revers Transkriptaz Sentezi

Elde edilen total RNA’dan miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak cDNA elde etme işlemi tamamlanmıştır. Protokol üretici firmanın tavsiyesine göre takip edilmiştir. Bütün aşamalar buz üzerinde yapılmıştır.

Kalıp RNA çözdürüldü. 10x miScript Nucleics Mix , 5x miScript HiSpec tamponu, su ve primerler oda sıcaklığında çözdürülüp homojenize edildi ve spin yapıldı.

Tablo 3.1’de cDNA reaksiyonu için karışım miktarları gösterilmiştir.

**Tablo 3.1:** cDNA Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları

<b>Eklene Madde</b>	<b>µl</b>
5x miScript HiSpec Buffer	4
10x Nucleics Mix	2
RNase-free water	7
miScript RT Mix	2
Total RNA (10-2000ng/ µl)	5

Kalıp RNA, RT master karışımı içeren her tüpe eklenir. Yavaşça karıştırılır, kısa bir şekilde santrifüj edilir ve hızlı bir şekilde kaldırılır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra tüpler 37 °C’de 60 dk, ve 95 °C’de 5 dk olmak üzere cihaza konulur. Reaksiyon sonunda örnekler hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak -20 °C’de çalışılmaya başlanıncaya kadar saklanır.

### 3.2.3. Real-Time PCR ile miRNA Analizi

miRNA revers transkriptaz sentezi gerçekleştirildikten sonra örneklerde miRNA ekspresyon analizi Corbett Research (Model: RG-600, Avustralya) RT-PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları tablo 3.2. de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Analiz sonucunda cihazın her örnek için verdiği Ct değerleri kullanılarak normal ve tümörlü dokulardaki değişimleri hesaplanmıştır.

**Tablo 3.2:** Real-Time PCR Reaksiyonunda kullanılan maddelerin içerikleri ve miktarları

Eklenen Madde	$\mu\text{l}$
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix,	12,5
10X Universal Primer	2,5
!0X miScript Primer Assay	2,5
Rnaz içermeyen su	5
Kalıp cDNA	2,5

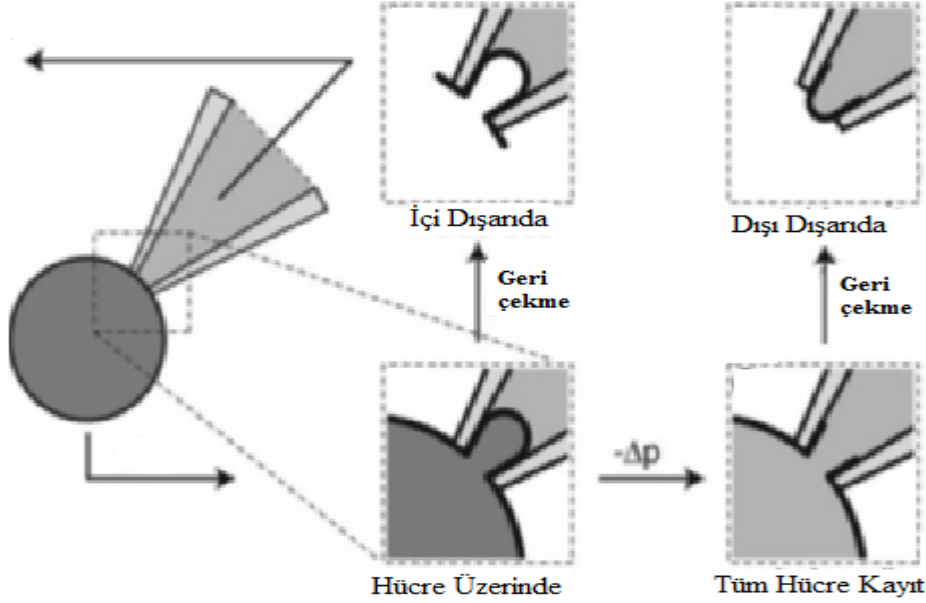
### 3.3. Yama-Kenetleme (Patch-Clamp) Yöntemi

Patch-clamp, hücre membranı kanallarından geçen iyon akımlarını incelemek için yaygın bir şekilde kullanılan modern bir elektrofizyolojik tekniktir (70-71) (Şekil 3.1) (Resim 3.1).

Patch-clamp yöntemi, özel olarak hazırlanmış mikroelettrot ağzının hücre zarı parçasına (patch, yama) sıkıca yapıştırılarak (clamp, kenetleme) membran potansiyellerinin sabit bir değere tespit edilmesi ile kanallardan geçen akımların kayıt ve analiz edilmesidir. Kaynak yaptırılan bölgede gigaohm düzeyinde elektriksel direnç oluşmaktadır (72-73).

Çalışmanın amacına göre, araştırılması istenilen kimyasala veya nörotransmitter maddenin çeşidine bağlı olarak 4 çeşit patch-clamp konfigürasyonu vardır. Bunlar;

- Hücre üzerinde (Cell attached-On cell)
- Tüm hücre kaydı (Whole-Cell recording)
- Dışı dışarıda (Outside-Out)
- İçi dışarıda (Inside-Out) uygulamalarıdır.



Şekil 3.1: Patch-clamp konfigürasyonları (74).

### **3.3.1. Hücre Üzerinde (Cell Attached- On Cell)**

Pipetin (uç kalınlığı 1µm) kayıt alınacak hücre ile teması sağlanır. Pipete az miktarda negatif bir vakum uygulanarak, gigaohm düzeyinde bir direnç oluşturulur. Pipet ucundaki hücre membranı, membranın diğer kısımlarından izole edilmiştir fakat hücre içi ortamdaki (ikincil haberciler, nörotransmitterler vb.) etkilenir. Bu uygulama, ikincil haberciler ve voltaj değişiklikleri inceleneceği zaman tercih edilir (70, 75).

### **3.3.2. Tüm Hücre Kaydı (Whole-Cell Recording)**

Pipetin hücre ile teması sağlandıktan (gigaseal) sonra, güçlü bir vakumlama uygulanarak, hücre membranı yırtılır. Pipet elektrodu, doğrudan hücre sitoplazmasındaki voltaj değişimlerini ölçer. Pipet ucu ile membranın yırtılması sonucunda pipet içerisindeki solüsyon hücre sitoplazmasına, hücre sitoplazmasında pipet içerisine geçer ve denge durumuna gelirler. Bu tip uygulamalar, membranda bulunan tüm  $Ca^{2+}$  kanallarının ve hücre içi ikincil habercilerin etkilerinin araştırılmasında kullanılır. Ayrıca hücre içerisine aktivatör veya inaktivatör maddeler kolaylıkla verilerek hücre zarı cevapları kontrol edilir (70, 75).

Bu tez çalışmasında tüm hücre kayıt konfigürasyonu kullanılmıştır.

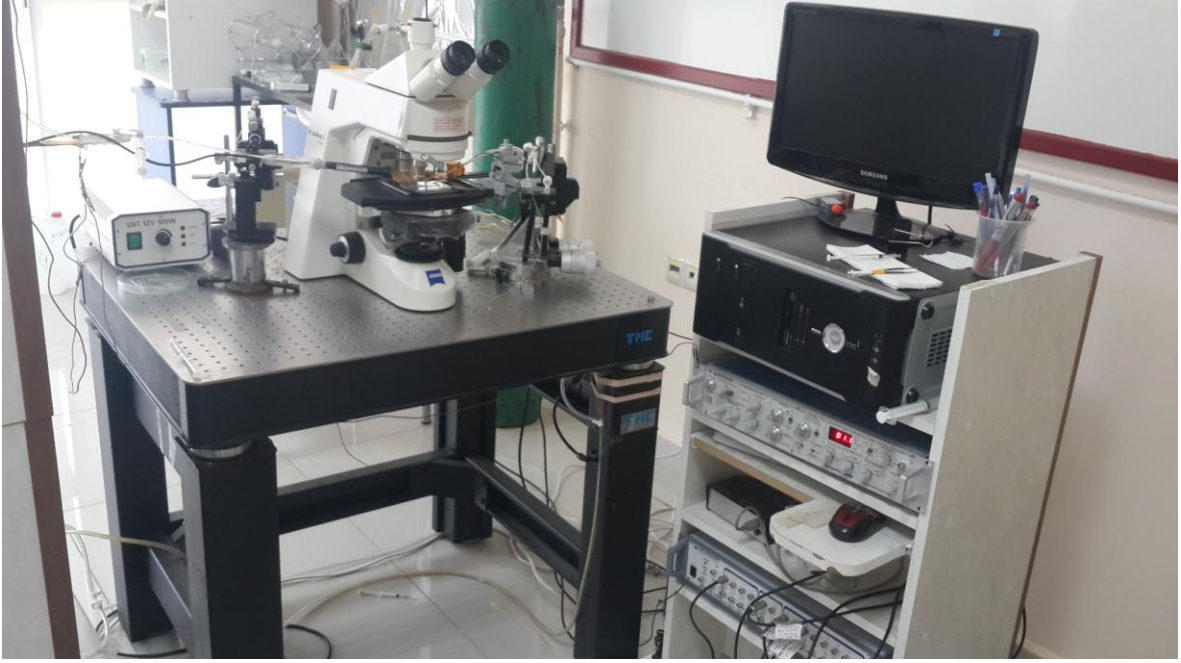
### **3.3.3. Dışı Dışarıda (Outside-Out)**

Hücre, tüm hücre kaydı döneminde iken, hücre membranının dışarı koparılması ile kayıt alınması durumudur. Çember hücre dışı solüsyon içerirken, pipet içerisi hücre içi solüsyonla doldurulur. Nörotransmitter maddelerin araştırılmasında ve tek kanal akımlarının kaydı sırasında genellikle bu yöntem kullanılır (70, 75-76).

### **3.3.4. İçi Dışarıda (Inside-Out)**

Hücre üzerinde konfigürasyonunda iken, manipülatörün ani titreşim göstermesiyle elde edilir. Pipet ucundaki membran parçasının sitoplazmaya bakan yüzü dışarıda kalır. İçi

dışarıda yöntemi  $Ca^{2+}$  gibi intrasellüler faktörler tarafından aktive edilen kanallar ile tek kanal kayıt çalışmalarında kullanılır (70, 76-77).



**Resim 3.1:** Yama-kenetleme sisteminin genel görünüşü.

**Mikroelektrod Üretimi ve Deney Düzeneği (Resim 3.2);** Borosilikat cam borulardan (dış çapı: 1 mm ve iç çapı: 0.58 mm) (World Precision Instruments, Sarasota, FL. USA) mikroelektrodlar üretildi (Brown-Flaming P-97 Sutter Puller). Kayıtlarda kullanılan pipetlerin uç dirençleri 4-8 M $\Omega$  (pipet solüsyonu doldurulduktan sonra) arasında idi. Kesitlerdeki hücreler suya girebilen 630x büyütmeye sahip differansiyel interferans kontrast objektifli upright mikroskop (Axioscope FS, Zeiss) ile görüntülendi. Voltaj sabitleme (voltage clamp) ile iyon akımlarının ölçümü, patch-clamp amplifikatörü (200B Amplifier Axon instruments) kullanılarak yapıldı. Elektrofizyolojik veriler, analog/dijital dönüştürücü ile bilgisayara aktarıldı (Digidata (76) 0, Axon Instruments, ABD). Uyarı oluşturulması ve veri toplanması (data acquisition) için pClamp yazılımı (Axon Instruments) kullanıldı. Akım kayıtlarının örnekleme hızı 25 10 kHz frekansla yapıldı ve bunlar 5-10 kHz'de filtre edildi.



**Resim 3.2:** Mikroelektrodların üretiminde kullanılan pipet çekici (puller).

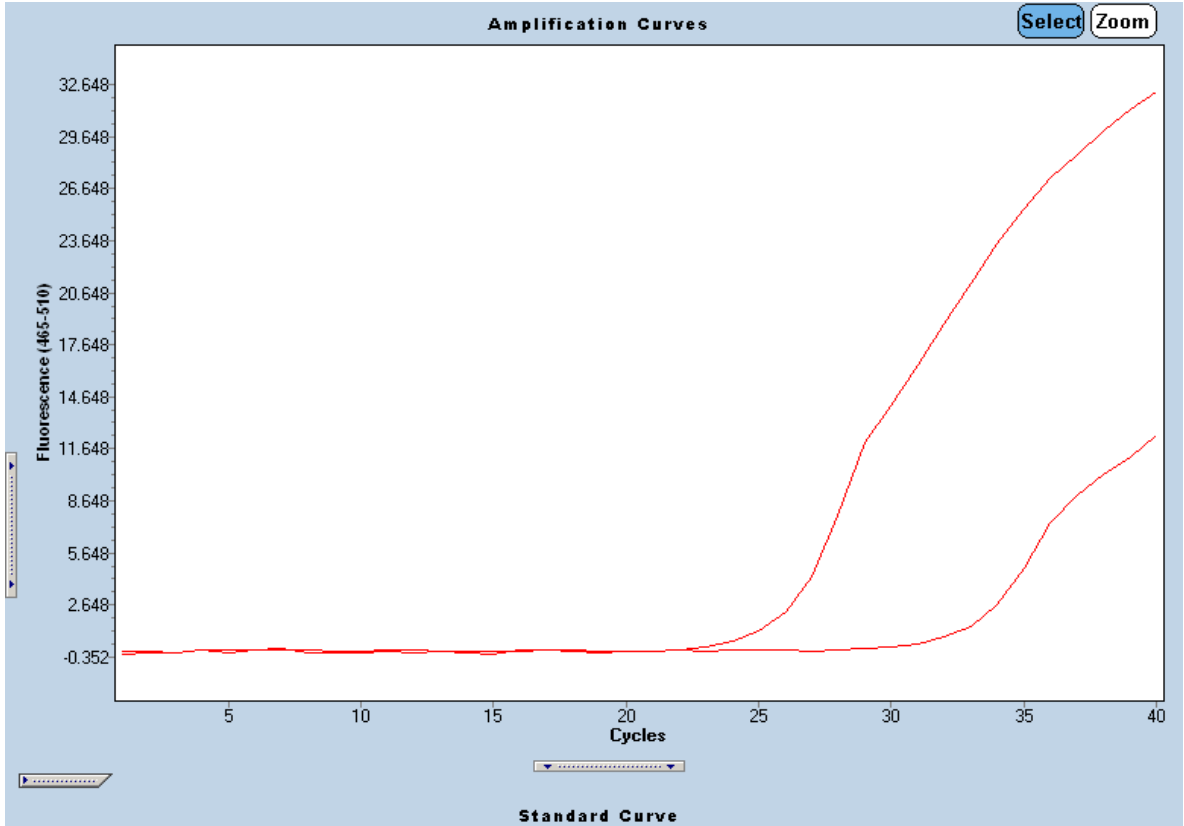
## 4. İSTATİSTİKSEL İŞLEMLER

miRNA ve mRNA miktar değişimi değerlendirilmesinde Mann-Whitney U Test analizinin yanısıra <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> web sitesindeki “RT<sup>2</sup> profiler” PCR array Data Analsis version 3.5 kullanılmıştır.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Glioblastoma Kanser Hücre Kültürlerinde TRPM2 Gen İfadesi Bulguları

Glioblastoma kanser dokusunda TRPM2 genini hedefleyen miR-4755-3p ve miR-423-5p nin ifadesi çalışılmadan önce, söz konusu TRPM2 geni ve dolayısıyla ilgili iyon kanal proteinlerinin ifade edilip edilmediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, glioblastoma kanser dokusunu kullanmak teknik olarak mümkün olmadığı için, glioblastoma kanser hücre kültürü kullanıldı.



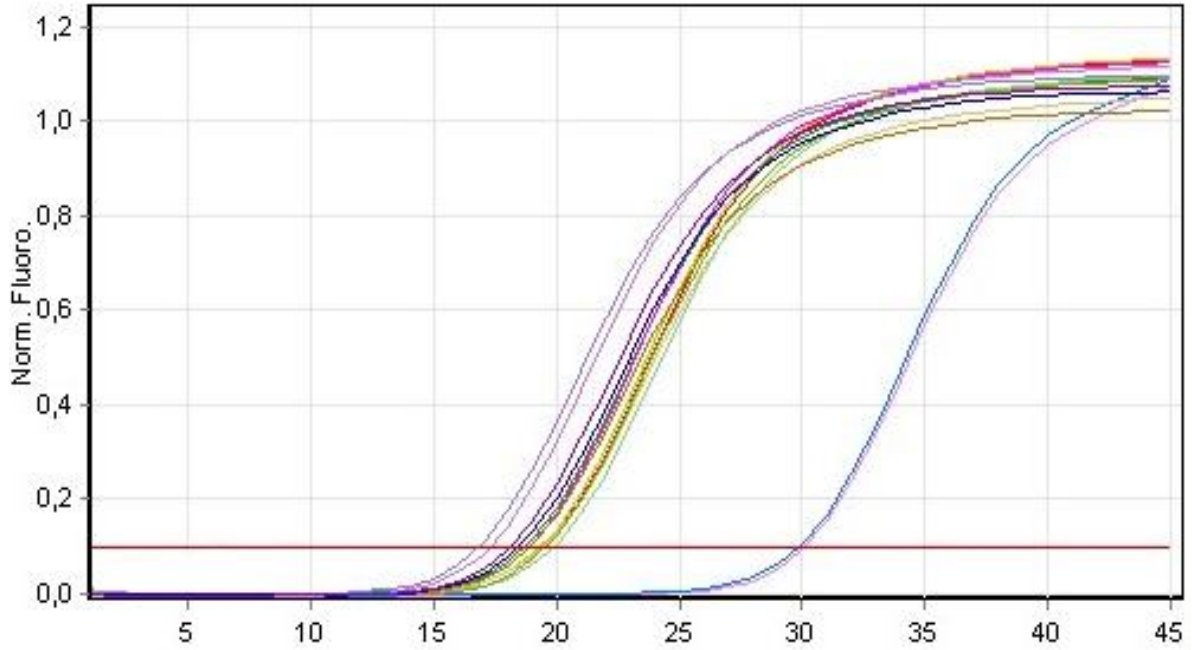
Şekil 5.1: U87 glioblastoma hücre hattında TRPM2 ifade seviyesi.

Glioblastoma hücre hattı U87’de, TRPM2 geninin ifade edilip edilmediğini anlamak için U87 hücre hattından total RNA izolasyonu yapıldı ve qRT-PCR ile TRPM2 geninin ifade düzeyine bakıldı. Aynı örnekte kontrol amaçlı GABDH house keeping geni kullanıldı.

TRPM2 gen ifade düzeyi GABDH gen ifade düzeyine göre kıyaslandı. Şekil 5.1’de de görüldüğü gibi TRPM2 nin real-time PCR’da verdiği ifade grafik olarak gözükmemektedir. U87 hücre hattında TRPM2 nin seviyesinin çok çok az olduğu gözlenmektedir. TRPM2 ile ilgili gen ifadesi sinyali ancak 35. PCR döngüsünde elde edilmiştir. Bu da TRPM2 ifadesinin çok az olduğunu göstermektedir (Şekil 5.1).

## 5.2. Glioblastoma Kanseri Dokusunda TRPM2 Genini Hedefleyen miR-4755-3p ve miR-423-5p nin İfadesi

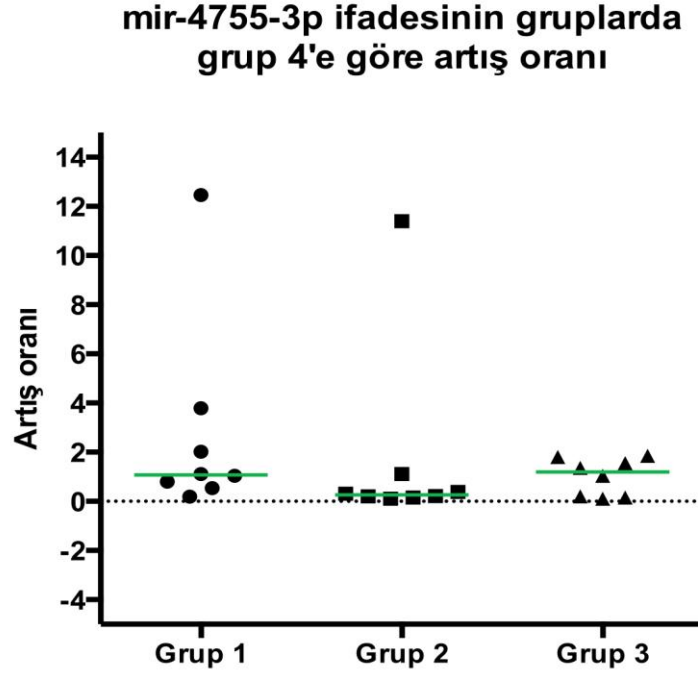
Bu çalışmada farklı evrelerdeki glioblastoma hastalarından alınan arşiv materyallerinde TRPM2 genini hedefleyen miR-4755-3p ve miR-423-5p nin ifade seviyeleri qRT-PCR tekniğiyle araştırılmıştır. miR-4755-3p ve miR-423-5p nin normalizasyonu RNU 6 ile yapıldı. Şekil 5.3. qRT-PCR gen ifadesi analiz sonucu gösterilmiştir.



Şekil 5.2: qRT-PCR gen ifadesi analiz sonucu.

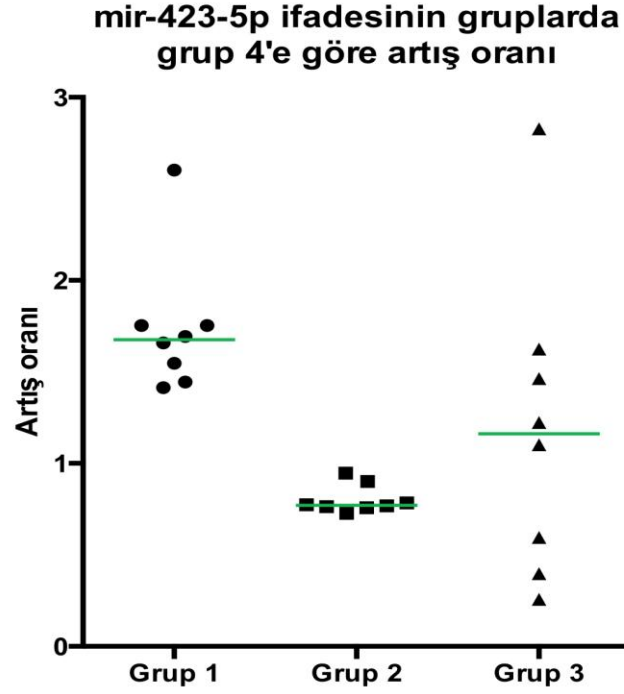
Ancak normal doku olarak kullanılacak herhangi bir materyal olmadığından, farklı evrelerdeki glioblastoma dokularında miR-4755-3p ve miR-423-5p nin ekspresyonları

kendi içerisinde değerlendirildi. Grup 1, 2, 3, 4 diye ifade edilen evre 1, 2, 3, 4 glioblastoma kanser hasta gruplarıdır.



**Şekil 5.3:** miR-4755-3p nin RNU 6 ile normalize edildiğinde farklı evrelerdeki glioblastoma dokularındaki ekspresyon durumunun 4. Evre glioblastoma dokularına göre kıyaslanması.

miR-4755-3p için ifade düzeyine bakıldı, 4 evre glioblastoma hastalarındaki miR-4755-3p değerleri 1 kabul edildi ve diğer evrelerde olan hastalardaki miR-4755-3p nin ifade seviyeleri kıyaslandı. Şekil 5.6 da da görüleceği gibi miR-4755-3p nin evre 1 ve evre 3 glioblastoma hastalarında da artışı veya azalışı söz konusu gözükmemektedir. Evre 2 de azalma gözlenmiştir.



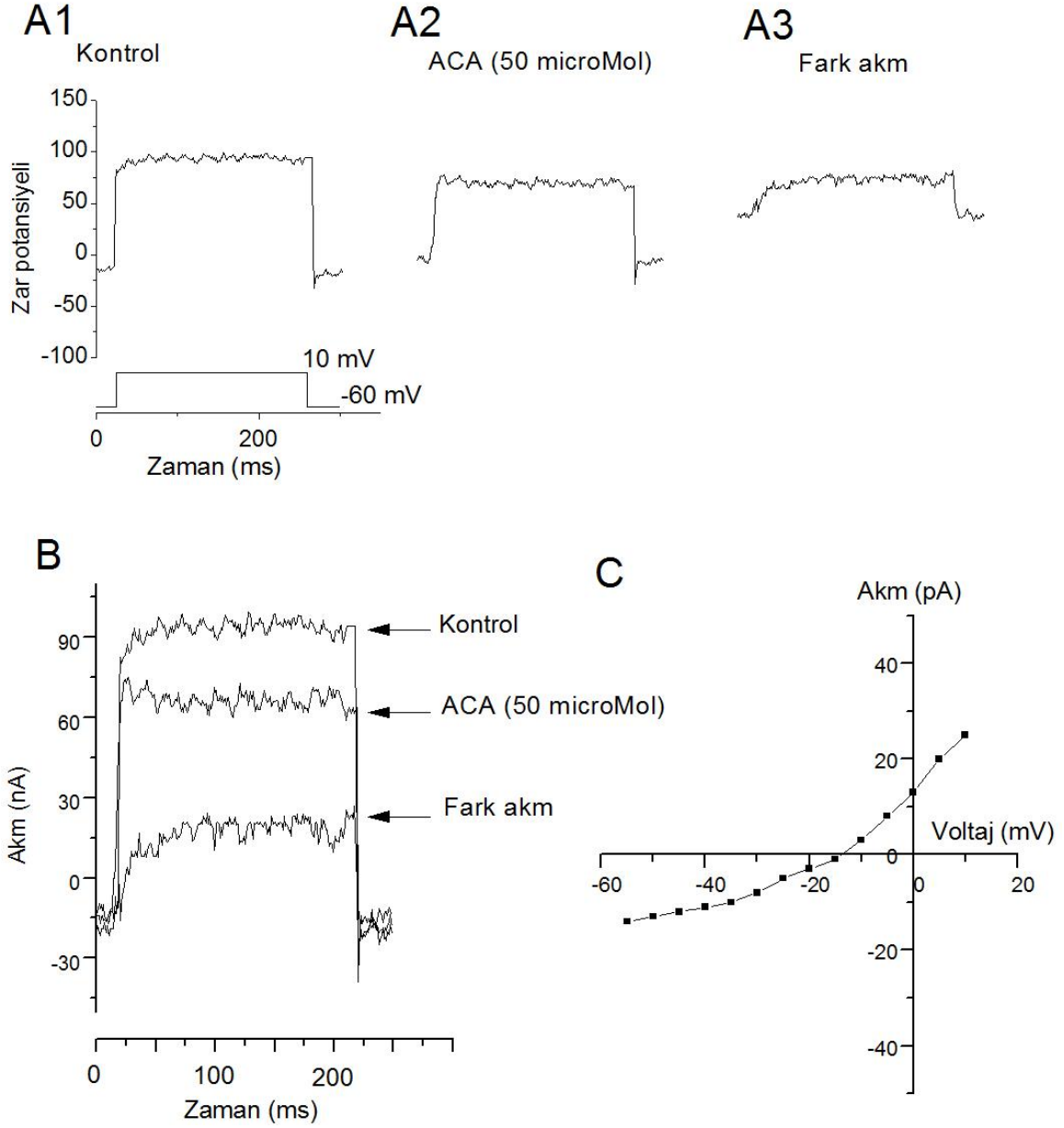
**Şekil 5.4:** miR-423-5p nin RNU 6 ile normalize edildiğinde farklı evrelerdeki glioblastoma dokularındaki ekspresyon durumunun 4. Evre glioblastoma dokularına göre kıyaslanması.

miR-423-5p için de yukarıda açıkladığımız gibi ifade düzeyine bakıldı, 4. evre glioblastoma hastalarındaki miR-423-5p değerleri 1 kabul edildi ve diğer evrelerdeki hastalardaki miR-423-5p nin ifade seviyeleri kıyaslandı. Şekil 5.4 de de görüleceği gibi miR-423-5p evre 1 de yaklaşık 1.5 katlık artarken evre 2 de yaklaşık 2 katlık azalma gözlenirken miR-4755-5p evre 3 de ciddi oranda bir değişme gözlenmemiştir. Evre 3 hastalarda miR-423-5p nin dağılımının homojen olmadığı gözlenmektedir.

### 5.3. Glioblastoma Kanser Hücre Kültürlerinde Yama-Kenetleme Bulguları

Glioblastoma kanser hücre kültürlerinde yama-kenetleme bulgularını incelemek amacıyla, glioblastoma kanser hücre hattı U87 kullanıldı. Kover sliplerine yapıştırılan hücreler, kover sliplerine yapışmış halde yama-kenetleme yapmak amacıyla yama-kenetleme kayıt odacığına alındı. Kayıt odacığı yapay serebrospinal solüsyonu (aCSF) ile dolduruldu. Normal aCSF solüsyonu, 138 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES ve 10 mM glukoz içerdi. aCSF'nin pH'ı 7.4'ye ayarlandı. Daha sonra yapay stoplazmik solüsyon içeren mikropipet ile tüm hücre (whole-cell) konfigürasyonunda yama-kenetleme yapıldı. Yapay stoplazmik solüsyon (mikropipet solüsyonu), 108 mM K-glukonat, 9 mM HEPES, 9 mM EGTA, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM fosfokreatinin, 4 mM ATP ve 0.3 mM GTP içerdi. pH'ı 7.4'e ayarlandı.

Kontrol şartlarında yapılan yama-kenetleme kayıtlarında hücrelerden, hücrenin büyüklüğüyle orantılı olarak, değişen miktarlarda akımlar kaydedildi. Bu akımın bir kısmı spesifik TRPM2 iyon kanal blokörü olan N-(p-amylicinnamoyl) anthranilic acid (ACA) tarafından bloke edildiği belirlendi (Şekil 5.5. A1). ACA tarafından bloke edilen akım, yaklaşık olarak -15 mV zar potansiyeli değerlerden daha negatif değerlerde hücre dışından hücre içerisine doğru akarken, -15 mV'tan daha pozitif değerlerde hücre içerisinden hücre dışına doğru aktığı belirlendi. Bu durum, akım voltaj ilişkisinde gözükmetedir (Şekil 5.5. C). Ayrıca ACA tarafından bloke edilen akımın (Şekil 5.5. A2) genliği, hücre zarı voltajı depolarize edildikçe azaldığı ve yaklaşık olarak -15 mV değerinde sıfır olduğu, daha depolarize değerlerde ise daha da büyüdüğü gözlemlendi (Şekil 5.5. C).



**Şekil 5.5: Glioblastoma kanser hücre kültürlerinde TRPM2 iyon kanallarının elektrofizyolojik olarak karakterizasyonu. A1.** Hücre alta verilen voltaj protokolü ile voltaj kenetlemeye tabi tutulmuştur. Yani hücre zarı -60 mV tutma (holding) potansiyelden +10 mV'a kadar basamak potansiyeli uygulanmıştır. Bu basamak potansiyeline yanıt olarak oluşan zar akımı kaydedilmiştir. **A2:** ACA varlığında aynı voltaj protokolü uygulanmıştır. **A3:** ACA varlığında elde edilen akım, kontrol şartlarında elde edilen akımdan çıkartılarak ACA tarafından bloke edilen akım elde edilmiştir. **B:** Kontrol, ACA varlığında elde edilen akım ve bu iki akımın farkı üstüste bindirilerek gösterilmiştir. **C:** ACA ile bloklanan akımın voltaj ilişkisi.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

WHO, şiddetlerine göre GBM’i 4 evreye ayırmıştır. Bunlar evre I, evre II, evre III ve evre IV tür. Bu sıralamaya göre I. evre tümörler en az şiddetli, IV. evre tümörler ise en agresif tümörler olarak bilinmektedir. Ayrıca I ve II. evre tümörlere düşük evreli tümör, III ve IV ise yüksek evreli tümör adı verilir. Tümörün evrelendirilmesi, tümörün hücre bazındaki özelliklerine göre yapılır.

Bu tümör yaklaşık 100.000’de 5 kişide görülür. GBM bütün primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak %20-30’unu oluşturmaktadır. Genellikle 40-60 yaş arasında ve erkeklerde kadınlara oranla biraz daha fazla görülmektedir. Çocukluk çağındaki tümörlerin %10’dan azı glioblastomadır. Bu tümör her iki beyin yarım küresini de tutabilir.

GBM, genellikle ilk oluştuğu yerin 1-2 cm civarındaki çevre dokulara yayılır, ancak hemen hemen hiç bir zaman vücuttaki başka organlara yayılmaz. Bazıları yavaş büyüme eğilimindedir ancak daha sıklıkla çok hızlı büyüyen ve yayılan glioblastoma türü yaygın olarak görülür. Hızlı büyüyen türü 3-6 ay içinde bulgu verebilir.

Glioblastomada en sık görülen bulgular baş ağrısı, hafıza kaybı, havale ve davranış değişiklikleridir. Bu bulgular, tümörün hızla büyümesi sonucunda artan basınç nedeniyle ortaya çıkar. Tümör büyüdükçe, bası yaptığı yerin özelliğine göre bazı beden işlevlerinde kayıplar ortaya çıkabilir.

Glioblastoma hücre hatlarında TRPM2 iyon kanallarının varlığı, tümör gelişimindeki rolü hiç çalışılmamıştır. Sadece TRPC5 (78) ve TRPV2 iyon kanalı (79) çalışılmıştır. Mevcut çalışmada TRPM2 geninin glioblastoma kanser hücre kültüründe ifade edildiğinin belirlenmiş olması, bu iyon kanalının en azından gen düzeyinde ifade edildiğini göstermektedir. Ayrıca glioblastoma kanser hücre kültür hücrelerinde tüm hücre akım kayıtlarının ACA’ya duyarlı olması, ACA’nın spesifik TRPM2 kanal blokürü olması nedeniyle (80) bu hücrelerde TRPM2 iyon kanallarının bulunduğu işaret etmektedir. Dolayısıyla TRPM2 iyon kanalının varlığı, PCR ile gen ekspirasyonu ve patch clamp

tekniki ile TRPM2 iyon kanalından geçen TRPM2 iyon akımının kaydedilmesi ile ilk defa mevcut çalışmamızda gösterilmiştir.

miRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak, protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. miRNA'lar, kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. miRNA, RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur. (46). miRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bilinmektedir. Kanser miRNA ilişkisi ilk olarak KLL hastalarında yapılan moleküler çalışmalarla ortaya çıkmıştır. KLL hastalarının yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesi delesyona uğramaktadır. Detaylı delesyon analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca mir-15-a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra KLL hastalarının %68'inde bu miRNAların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı ortaya konmuştur (56). Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir.

Kanser karmaşık bir genetik hastalıktır ve kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde yapısal ve ifade seviyesi olarak birçok normal olmayan durum barındırmaktadır. Bu noktada miRNA'lar en çok çalışılan kodlanmayan RNA'lardandır (81) mikroRNA'lar, kanserin ilerleyişi ve kanserin tedaviye yanıt verşi hakkında bilgi verebileceği ve biyobelirteç olabileceği noktasında çalışmalar sürdürülmektedir (81). Yapılan tarama programlarında yeni biyobelirteçlerin keşfi de önemlidir. Bu bağlamda yapılan bir çok kanser türünde miRNA'lar çeşitli yöntemlerle araştırılmaktadır (82). Ayrıca mikroRNA'lar sadece biyobelirteç değil kanser tedavisi noktasında da düşünülmektedir (83). Bu noktada birçok miRNA'nın onkogen gibi veya tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü aydınlatılmıştır (82). Ayrıca bu miRNA'ların hangi yolaklarda görev yaptığı ve hangi noktada kanseri etkilediği de çalışılmaktadır (82).

2003 yılında Michael ve arkadaşları, ilk olarak insanlardaki katı tümörlerde (kolonik ve rektal adenom karsinomlar) normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA'ları rapor etmişlerdir (84).

Glioblastoma hücre hatlarında yapılan bir çalışmada Akt geninin fosforlanması miRNA-181c nin rol aldığı gösterilmiştir (85).

miRNA'ların glioblastoma hastalarında sıklıkla düzensizliğinden bahsedilmektedir (86). Bu bağlamda glioblastomalı hastalardan alınan serum örneklerinde dolaşımda olan miRNA ların ekspresyonlarına microarray ile bakılmış miR-576-5p, miR-340 ve miR-626 yüksek oranda ifade edildiği bunların yanı sıra miR-320, let-7g-5p ve miR-7-5P nin ise az oranda ifade edildiği gösterilmiştir (86). Bu çalışmaların sonucunda glioblastomalı hastaların teşhisinde ve tedavisinde kullanılmak üzere yeni biyomarkerlar bulunması amaçlanmıştır (86). Bu kapsamda TRPM2 iyon kanalını hedefleyen miRNA'lar daha önce çalışılmamıştır.

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör süpresör özellik kazanabilir. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması, onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olurken bazı miRNA'ların (onkogenik) ekspresyonunun artması kanser gelişimini arttırdığı görülmektedir (87).

Bu çalışmada, glioblastomalı hastaların arşiv materyallerinden alınan örneklerde TRPM2 genini hedefleyen miRNAlardan miR-4755-3p ve miR423-5p nin ifadesinin belirlenmesinin yanısıra glioblastom hücre hattı olan U87 de patch-clamp metoduyla hücre membranı kanallarından iyon akımlarını incelenmiştir.

Farklı evrelerdeki (evre 1, 2, 3, 4) glioblastomalı hastalarda çalışılan miR-4755-3p ve miR423-5p nin ekspresyonları RNU 6 ile normalize edilmiştir. Yapılan çalışmada, kontrol grubu olarak normal beyin dokusu etik nedenlerden dolayı kullanılamamıştır. Bu nedenle miR-4755-3p ve miR423-5p ekspresyonları, kendi içinde hesaplanmaya çalışılmıştır. 4. Evredeki hastaların miR-4755-3p ve miR423-5p ekspresyon değerleri 1 olarak kabul edilmiş ve diğer evredeki hastaların miR-4755-3p ve miR423-5p ekspresyon değerleri evre 4 göre kıyaslanmıştır.

Bu sonuçlara göre; miR-4755-3p ekspresyonunun azalışına bağlı olarak TRPM2'nin evre-2 glioblastomalı hastalarda artabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca miR-423-5p'nin ekspresyonunda artış, TRPM2'nin ekspresyonunda azalmaya neden olabileceğini düşünüyoruz. Tüm sonuçlara göre glioblastoma erken evresinde TRPM2 kanallarının aktif

rol alabileceği düşünölmektedir. Yapılacak ileri moleküler ve genetik çalışmalarla bunların gösterilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Erzurum'un Olur ilçesinde doğdum. İlk ve Ortaokul eğitimimi Antalya'da tamamladıktan sonra, Lise eğitimimi Kayseri'de tamamladım. 1999 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne girdim. 2003 yılında Eczacı olarak eğitimimi tamamladım. Evli ve 2 çocuk annesiyim.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K. Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Sci.* 2014;105(4):363-9.
2. Buatti JM, Marcus RB, Mendenhall WM, Friedman WA, Bova FJ. Accelerated hyperfractionated radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;34(4):785-92.
3. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 1969;224(5216):285-7.
4. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, et al. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron.* 2011;70(3):482-94.
5. Ariano P, Dalmazzo S, Owsianik G, Nilius B, Lovisolo D. TRPC channels are involved in calcium-dependent migration and proliferation in immortalized GnRH neurons. *Cell Calcium.* 2011;49(6):387-94.
6. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 1989;2(4):1313-23.
7. Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron.* 1992;8(4):643-51.
8. Bloomquist BT, Shortridge RD, Schneuwly S, Perdew M, Montell C, Steller H, et al. Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, norpA, and its role in phototransduction. *Cell.* 1988;54(5):723-33.
9. Hardie RC, Minke B. Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca<sup>2+</sup> and trp. *Cell Calcium.* 1995;18(4):256-74.
10. Pollock JA, Assaf A, Peretz A, Nichols CD, Mojet MH, Hardie RC, et al. TRP, a protein essential for inositide-mediated Ca<sup>2+</sup> influx is localized adjacent to the calcium stores in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):3747-60.
11. Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett.* 1995;373(3):193-8.
12. Selli C, Erac Y, Kosova B, Tosun M. Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol.* 2009;51(2-3):96-100.

13. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, et al. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell*. 1996;85(5):661-71.
14. Shieh BH, Zhu MY. Regulation of the TRP Ca<sup>2+</sup> channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. 1996;16(5):991-8.
15. Boesmans W, Owsianik G, Tack J, Voets T, Vanden Berghe P. TRP channels in neurogastroenterology: opportunities for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol*. 2011;162(1):18-37.
16. Liu C, Rennie WA, Mallick B, Kanoria S, Long D, Wolenc A, et al. MicroRNA binding sites in *C. elegans* 3' UTRs. *RNA Biol*. 2014;11(6).
17. Ciesla M, Dulak J, Jozkowicz A. MicroRNAs and epigenetic mechanisms of rhabdomyosarcoma development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014.
18. Besse A, Sana J, Fadrus P, Slaby O. MicroRNAs involved in chemo- and radioresistance of high-grade gliomas. *Tumour Biol*. 2013;34(4):1969-78.
19. Germano I, Swiss V, Casaccia P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology*. 2010;58(6):903-10.
20. Arslantas A, Artan S, Oner U, Muslumanoglu H, Durmaz R, Cosan E, et al. The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev*. 2004;27(1):58-64.
21. Blumenthal DT, Schulman SF. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother*. 2005;5(5):683-90.
22. Sathornsumetee S. Therapeutic strategies to target multiple kinases in glioblastoma. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;11(8):700-11.
23. Arslantas A, Artan S, Oner U, Muslumanoglu MH, Ozdemir M, Durmaz R, et al. Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(1):39-46.
24. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer*. 2010;9:135.
25. Ozawa T, Faddegon BA, Hu LJ, Bollen AW, Lamborn KR, Deen DF. Response of intracerebral human glioblastoma xenografts to multifraction radiation exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66(1):263-70.
26. Mason WP, Cairncross JG. Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma--impact of a recent trial. *Nat Clin Pract Neurol*. 2005;1(2):88-95.

27. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
28. Chauveinc L, Sola-Martinez MT, Martin-Duverneuil M, Mazon JJ, Faillot T, Cornu P, et al. Intra arterial chemotherapy with ACNU and radiotherapy in inoperable malignant gliomas. *J Neurooncol*. 1996;27(2):141-7.
29. Kohshi K, Kinoshita Y, Terashima H, Konda N, Yokota A, Soejima T. Radiotherapy after hyperbaric oxygenation for malignant gliomas: a pilot study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(11):676-8.
30. Sulong S, Yusoff AA, Zainuddin N, Abdullah JM, Pannatil JG, Jaafar H, et al. What We Know about the Molecular Genetics of Central Nervous System (CNS) Tumours in Malaysia. *Malays J Med Sci*. 2004;11(1):37-43.
31. Seegenschmiedt MH, Karlsson UL, Black P, Brady LW. Thermoradiotherapy for brain tumors. Three cases of recurrent malignant astrocytoma and review of clinical experience. *Am J Clin Oncol*. 1995;18(6):510-8.
32. Brat DJ, Scheithauer BW, Medina-Flores R, Rosenblum MK, Burger PC. Infiltrative astrocytomas with granular cell features (granular cell astrocytomas): a study of histopathologic features, grading, and outcome. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(6):750-7.
33. Steinberg X, Lespay-Rebolledo C, Brauchi S. A structural view of ligand-dependent activation in thermoTRP channels. *Front Physiol*. 2014;5:171.
34. Minke B. TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium*. 2006;40(3):261-75.
35. Minke B, Parnas M. Insights on TRP channels from in vivo studies in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:649-84.
36. Bourque CW, Guilak F, Liedtke W. A TRP that makes us feel hyper. *J Physiol*. 2012;590(Pt 8):1779-80.
37. McQuillin A, Bass NJ, Kalsi G, Lawrence J, Puri V, Choudhury K, et al. Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3. *Mol Psychiatry*. 2006;11(2):134-42.
38. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, et al. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J*. 2006;25(9):1804-15.
39. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*. 2005;18(1):61-9.

40. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun.* 2013;4:1611.
41. Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol.* 2006;209(1):31-41.
42. Csanady L, Torocsik B. Four Ca<sup>2+</sup> ions activate TRPM2 channels by binding in deep crevices near the pore but intracellularly of the gate. *J Gen Physiol.* 2009;133(2):189-203.
43. Hiroi H, Momoeda M, Watanabe T, Ito M, Ikeda K, Tsutsumi R, et al. Expression and regulation of transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;365(2):146-52.
44. Romero JR, Germer S, Castonguay AJ, Barton NS, Martin M, Zee RY. Gene variation of the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) and type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Clin Chim Acta.* 2010;411(19-20):1437-40.
45. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol.* 2011;589(Pt 7):1515-25.
46. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(3-4):369-78.
47. Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R, Ariza CB, de Oliveira CE, Watanabe MA. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. *Dis Markers.* 2014;2014:513158.
48. Bouyssou JM, Manier S, Huynh D, Issa S, Roccaro AM, Ghobrial IM. Regulation of microRNAs in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1845(2):255-65.
49. Vimalraj S, Miranda PJ, Ramyakrishna B, Selvamurugan N. Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs. *Dis Markers.* 2013;35(5):369-87.
50. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science.* 2001;294(5543):797-9.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
52. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
53. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-69.

54. Dumeaux V, Lund E, Borresen-Dale AL. Comparison of globin RNA processing methods for genome-wide transcriptome analysis from whole blood. *Biomark Med.* 2008;2(1):11-21.
55. Gregory BD, Deighan P, Hochschild A. An artificial activator that contacts a normally occluded surface of the RNA polymerase holoenzyme. *J Mol Biol.* 2005;353(3):497-506.
56. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
57. Wilusz JE, Sharp PA. A Circuitous Route to Noncoding RNA. *Science.* 2013;340(6131):440-1.
58. Kumar P, Hornum M, Nielsen LJ, Enderlin G, Andersen NK, Len C, et al. High-Affinity RNA Targeting by Oligonucleotides Displaying Aromatic Stacking and Amino Groups in the Major Groove. Comparison of Triazoles and Phenyl Substituents. *J Org Chem.* 2014;79(7):2854-63.
59. Dvinge H, Git A, Graf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature.* 2013;497(7449):378-82.
60. Zhang ZY, Convertini P, Shen ML, Xu X, Lemoine F, de la Grange P, et al. Valproic Acid Causes Proteasomal Degradation of DICER and Influences miRNA Expression. *Plos One.* 2013;8(12).
61. Chen Y, Min LF, Zhang XZ, Hu SW, Wang BH, Liu W, et al. Decreased miRNA-148a is associated with lymph node metastasis and poor clinical outcomes and functions as a suppressor of tumor metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2013;30(4):1832-40.
62. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *P Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15524-9.
63. Pieraccioli M, Imbastari F, Antonov A, Melino G, Raschella G. Activation of miR200 by c-Myb depends on ZEB1 expression and miR200 promoter methylation. *Cell Cycle.* 2013;12(14):2309-20.
64. Oh JS, Kim JJ, Byun JY, Kim IA. Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(1):5-8.
65. Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2012;72(21):5576-87.

66. Deng Q, Becker L, Ma X, Zhong X, Young K, Ramos K, et al. The dichotomy of p53 regulation by noncoding RNAs. *J Mol Cell Biol*. 2014.
67. England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol*. 2013;34(4):2063-74.
68. Vigneault F, Ter-Ovanesyan D, Alon S, Eminaga S, D CC, Seidman JG, et al. High-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Curr Protoc Hum Genet*. 2012;Chapter 11:Unit 11 2 1-0.
69. Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Myers JA, Eisenberg I, Gonzalez RT, et al. Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet Muscle*. 2011;1:27.
70. Nilius B. Pflugers Archiv and the advent of modern electrophysiology. From the first action potential to patch clamp. *Pflugers Arch*. 2003;447(3):267-71.
71. Arsiero M, Luscher HR, Giugliano M. Real-time closed-loop electrophysiology: towards new frontiers in in vitro investigations in the neurosciences. *Arch Ital Biol*. 2007;145(3-4):193-209.
72. Sigworth FJ. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J Physiol*. 1980;307:97-129.
73. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85-100.
74. Pihl J, Sinclair J, Sahlin E, Karlsson M, Petterson F, Olofsson J, et al. Microfluidic gradient-generating device for pharmacological profiling. *Anal Chem*. 2005;77(13):3897-903.
75. Baret JC, Beck Y, Billas-Massobrio I, Moras D, Griffiths AD. Quantitative cell-based reporter gene assays using droplet-based microfluidics. *Chem Biol*. 2010;17(5):528-36.
76. Teisseyre A. The "patch-clamp" technique and its application in investigations of the properties of human T lymphocyte potassium channels. *Cell Mol Biol Lett*. 2001;6(1):93-105.
77. Naziroglu M, Luckhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res*. 2008;33(7):1256-62.
78. Richter JM, Schaefer M, Hill K. Riluzole activates TRPC5 channels independently of PLC activity. *Br J Pharmacol*. 2014;171(1):158-70.

79. Nabissi M, Morelli MB, Santoni M, Santoni G. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis*. 2013;34(1):48-57.
80. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):264-73.
81. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66.
82. Wagner S, Willenbrock S, Nolte I, Murua Escobar H. Comparison of non-coding RNAs in human and canine cancer. *Front Genet*. 2013;4:46.
83. Christodoulatos GS, Dalamaga M. Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis? *World J Clin Oncol*. 2014;5(2):71-81.
84. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003;1(12):882-91.
85. Wang F, Xiao W, Sun J, Han D, Zhu Y. MiRNA-181c inhibits EGFR-signaling-dependent MMP9 activation via suppressing Akt phosphorylation in glioblastoma. *Tumour Biol*. 2014.
86. Dong L, Li Y, Han C, Wang X, She L, Zhang H. miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Int J Oncol*. 2014.
87. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS*. 2007;115(10):1090-106.