

**T.C**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI MEDULLOBLASTOMLARINDA**  
**MOLEKÜLER ALT SINIFLANDIRMA**

**Naz KANIT**

**ORCID: 0000-0003-3318-7695**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR**

**AĞUSTOS 2021**

**TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2017970137**

**T.C**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI MEDULLOBLASTOMLARINDA**  
**MOLEKÜLER ALT SINIFLANDIRMA**

**Naz KANIT**  
**ORCID: 0000-0003-3318-7695**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**MOLEKÜLER TIP**

**DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdener ÖZER**

**ORCID: 0000-0001-5743-5222**

**Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü “Bilimsel Araştırma Proje Destekleri Programı” kapsamında, 2020.KB.SAG026 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**İZMİR**

## ETİK BEYAN

T.C

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

### ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “**Çocukluk Çağı Medulloblastomlarında Moleküler Alt Sınıflandırma**” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Naz KANIT

26.07.2021

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, beni geliştiren, bana karşı her zaman sabırlı olan, birlikte çalışmaktan çok büyük mutluluk duyduğum çok değerli danışman hocam **Prof. Dr. Erdener ÖZER**'e;

Tüm doktora sürecimde elimden tutup bana yol gösteren, destek olan, bana çok şey öğreten, başta Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanımız **Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ** ve **Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL** olmak üzere anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine;

Tez çalışmalarımın laboratuvar aşamalarında bana tüm olanaklarını sağlayıp büyük sabırla destek olan **Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığına ve teknisyen Ayşe ÇAYAN'a** ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Zeynep YÜCE ve ekibine**;

İlk günden son güne yanımda olup bana bu dört yıllık süreçte her anlamda destek olan canım arkadaşım **Nazlı Ecem DAL BEKAR**, her zaman sıcacık gülüşüyle ve iyi niyetiyle yanımda olan biricik **Yağmur YAVAŞ** ve iyimserliğiyle hep yanımda olan **Ufkay KARABAY** başta olmak üzere, her zaman yanımda olacağını bildiğim tüm Moleküler Tıp öğrencilerine;

Bu sürecin bana kattığı belki de en güzel şeylerden biri olan, en zor günlerimde hep bana destek olan, ömürlük dostum **Ayşe Nur SARI KAYGISIZ'a**;

Yalnızca çalışma arkadaşım olmanın çok ötesinde, çok kısa sürede benim için yeri değişmez olan, iyi kalpli, çok sevgili dostlarım **Özge UYSAL YOCA**, **Hande EFE** ve **Pelin YALÇIN'a**;

Gördüğüm en iyi niyetli ve yardımsever öğrenci işleri grubu olan DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri'nin tüm personelin;

Her zaman, her koşulda yanımda olduğunu bildiğim, canımdan çok sevdiğim annem ve babam **Lütfiye-Hakan KANIT** ve biricik kardeşim **Bora KANIT'a**, bu süreçte bana gösterdikleri sonsuz anlayış, destek ve fedakarlıkları için çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| İÇİNDEKİLER.....                                              | i   |
| TABLolar DİZİNİ.....                                          | iv  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                          | vi  |
| KISALTMALAR.....                                              | vii |
| ÖZET .....                                                    | ix  |
| ABSTRACT .....                                                | xi  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                        | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                        | 3   |
| 2.1. Medulloblastom.....                                      | 3   |
| 2.1.1. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler .....               | 3   |
| 2.1.2. Histolojik Alt Sınıflandırma .....                     | 3   |
| 2.1.3. Moleküler Alt Sınıflandırma .....                      | 4   |
| 2.1.3.1. WNT-Aktive Grup .....                                | 5   |
| 2.1.3.2. SHH-Aktive Grup .....                                | 7   |
| 2.1.3.3.WNT/SHH-Aktive Olmayan Gruplar .....                  | 9   |
| 2.1.4. Dünya Sağlık Örgütü 2016 Sınıflandırması .....         | 9   |
| 2.1.5. Medulloblastomlarda Risk Stratifikasyonu .....         | 10  |
| 2.2. Medulloblastomlarda Epigenetik Düzenlemeler.....         | 11  |
| 2.2.1. DNA Metilasyonu .....                                  | 12  |
| 2.2.2. Histon Modifikasyonları .....                          | 14  |
| 2.2.3. ATP-Bağımlı Kromatin Yeniden Düzenlenmesi .....        | 16  |
| 2.2.4. Kodlamayan (noncoding) RNA'lar Aracılı Düzenleme ..... | 16  |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.4.1. miRNA Aracılı Düzenleme.....                                            | 17 |
| 2.2.4.2. lncRNA'lar Aracılı Düzenleme.....                                       | 17 |
| 2.3. Bu Çalışmada Araştırılan Genlerin Önemi.....                                | 18 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                          | 19 |
| 3.1. Araştırmanın Tipi.....                                                      | 19 |
| 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....                                            | 19 |
| 3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....                      | 20 |
| 3.4. Çalışma Materyali.....                                                      | 20 |
| 3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....                                              | 20 |
| 3.6. Veri Toplama Araçları.....                                                  | 21 |
| 3.6.1. Çalışmada Kullanılan Arşiv Materyalleri, Sarf Malzemeler ve Cihazlar..... | 21 |
| 3.6.2. Histolojik Revizyon.....                                                  | 24 |
| 3.6.3. İmmünohistokimyasal (İHK) Boyamalar.....                                  | 24 |
| 3.6.4. Pirosekanslama (PS) Çalışmaları.....                                      | 26 |
| 3.6.4.1. DNA İzolasyonu.....                                                     | 27 |
| 3.6.4.2. DNA Konsantrasyon ve Saflık Tayini.....                                 | 28 |
| 3.6.4.3. Genomik DNA'nın Bisülfid Çevrimi.....                                   | 28 |
| 3.6.4.4. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) Yöntemi.....                           | 31 |
| 3.6.4.5. Pirosekanslama.....                                                     | 32 |
| 3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....                                            | 35 |
| 3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları.....                                            | 39 |
| 3.9. Etik Kurul Onayı.....                                                       | 39 |
| 4. BULGULAR.....                                                                 | 40 |
| 4.1. Arşiv Verilerinin Derlenmesi ve Histolojik Revizyon.....                    | 40 |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. İmmünohistokimya ile Moleküler Alt Sınıflandırma ..... | 42 |
| 4.3. Pirosekanslama ile DNA Metilasyon Analizi .....        | 45 |
| 4.3.1. DNA Konsantrasyon ve Safılıkları .....               | 45 |
| 4.3.2. Pirosekanslama Sonuçları.....                        | 46 |
| 4.3.2.1. <i>SPINT2</i> Sonuçları.....                       | 46 |
| 4.3.2.2. <i>KLF4</i> Sonuçları .....                        | 47 |
| 4.3.2.3. <i>ZIC2</i> Sonuçları .....                        | 48 |
| 4.3.2.4. <i>PTCH1</i> Sonuçları.....                        | 50 |
| 4.3.2.5. <i>EZH2</i> Sonuçları.....                         | 51 |
| 4.3.2.6. <i>RASSF1A</i> Sonuçları .....                     | 52 |
| 4.3.2.7. <i>CDKN2A</i> Sonuçları.....                       | 53 |
| 4.3.2.8. <i>SFRP1</i> Sonuçları .....                       | 53 |
| 4.3.2.9. <i>HIC1</i> Sonuçları.....                         | 53 |
| 4.4. İstatistiksel Analiz.....                              | 54 |
| 5. TARTIŞMA.....                                            | 56 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                   | 62 |
| KAYNAKLAR.....                                              | 62 |
| EKLER.....                                                  | 70 |
| EK-1: TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYINLAR.....                        | 70 |
| EK-2: ETİK KURUL ONAYI.....                                 | 77 |
| KATKI .....                                                 | 79 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                               | 80 |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Medulloblastomların moleküler alt sınıflandırması .....                                                    | 5  |
| <b>Tablo 2.</b> SHH-aktive medulloblastomların alt grupları.....                                                           | 8  |
| <b>Tablo 3.</b> Medulloblastomlarda moleküler alt gruplar Dünya Sağlık Örgütü SSS<br>Tümörleri Sınıflandırması (2016)..... | 10 |
| <b>Tablo 4.</b> Medulloblastomlarda risk stratifikasyonu .....                                                             | 11 |
| <b>Tablo 5.</b> Araştırma Planı .....                                                                                      | 19 |
| <b>Tablo 6.</b> Çalışmada kullanılan sarf malzemeler .....                                                                 | 21 |
| <b>Tablo 7.</b> PCR ve pirosekanslama analizlerinde kullanılan primerler .....                                             | 23 |
| <b>Tablo 8.</b> Kullanılan cihazların listesi .....                                                                        | 23 |
| <b>Tablo 9.</b> Bisülfıt çevrim reaksiyonu.....                                                                            | 29 |
| <b>Tablo 10.</b> Bisülfıt çevrimi için uygulanan program.....                                                              | 29 |
| <b>Tablo 11.</b> PCR içeriğı.....                                                                                          | 31 |
| <b>Tablo 12.</b> PCR reaksiyonu.....                                                                                       | 32 |
| <b>Tablo 13.</b> Pirosekanslama için hazırlanan sefaroze boncuk çözeltisi.....                                             | 33 |
| <b>Tablo 14.</b> Pirosekanslama için hazırlanan “annealing mix” .....                                                      | 33 |
| <b>Tablo 15.</b> Çalışma vakalarının demografik, histolojik, klinik verileri ve moleküler<br>alt grupları .....            | 40 |
| <b>Tablo 16.</b> Çalışma vakalarının moleküler alt gruplara göre klinik, histolojik ve<br>onkolojik özellikleri.....       | 44 |
| <b>Tablo 17.</b> Çalışmada izole edilen DNA’ların konsantrasyonları (ng/uL) .....                                          | 45 |
| <b>Tablo 18.</b> <i>SPINT2</i> geninde analiz edilen üç CpG bölgesindeki metilasyon oranları. 46                           |    |
| <b>Tablo 19.</b> <i>KLF4</i> geninde analiz edilen beş CpG bölgesindeki metilasyon oranları .. 48                          |    |
| <b>Tablo 20.</b> <i>ZIC2</i> geninde analiz edilen dört CpG bölgesindeki metilasyon oranları .. 49                         |    |
| <b>Tablo 21.</b> <i>PTCH1</i> geninde analiz edilen üç CpG bölgesindeki metilasyon oranları . 50                           |    |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 22.</b> <i>EZH2</i> geninde analiz edilen altı CpG bölgesindeki metilasyon oranları ..                                                                                                               | 51 |
| <b>Tablo 23.</b> <i>RASSF1A</i> geninde analiz edilen altı CpG bölgesinde metilasyon oranları .....                                                                                                           | 52 |
| <b>Tablo 24.</b> <i>RASSF1A</i> hipermetilasyon seviyelerine göre kuartillere ayrılan olguların morfolojik ve klinik parametrelerle ilişkisi .....                                                            | 54 |
| <b>Tablo 25.</b> <i>KLF4</i> , <i>SPINT2</i> , <i>ZIC2</i> ve <i>PTCH1</i> genlerindeki hipermetilasyon seviyeleri ile moleküler alt grup, histolojik sınıflandırma ve klinik veriler arasındaki ilişki ..... | 55 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Medulloblastomlarda histolojik varyantlar .....               | 4  |
| Şekil 2. Kanonik Wnt (beta katenin) yolağı.....                        | 6  |
| Şekil 3. Sonic Hedgehog yolağı. ....                                   | 8  |
| Şekil 4. DNA'nın anormal metilasyonu ve demetilasyonu. ....            | 14 |
| Şekil 5. Çalışmanın akış şeması .....                                  | 35 |
| Şekil 6. İmmünohistokimyasal değerlendirme algoritması .....           | 36 |
| Şekil 7. Kontrol grupları için beklenen örnek pirogramlar.....         | 38 |
| Şekil 8. Medulloblastomlarda mikroskopik özellikler .....              | 42 |
| Şekil 9. MB'larda beta-katenin, YAP1 ve GAB1 immünohistokimyası.....   | 43 |
| Şekil 10. SHH-aktive <i>TP53</i> -mutant medulloblastom.....           | 44 |
| Şekil 11. <i>SPINT2</i> hipermetilasyon analizi pirogram örneği .....  | 46 |
| Şekil 12. <i>KLF4</i> hipermetilasyon analizi pirogram örneği .....    | 47 |
| Şekil 13. <i>ZIC2</i> hipermetilasyon analizi pirogram örneği.....     | 49 |
| Şekil 14. <i>PTCH1</i> hipermetilasyon analizi pirogram örneği.....    | 50 |
| Şekil 15. <i>EZH2</i> hipermetilasyon analizi pirogram örneği .....    | 51 |
| Şekil 16. <i>RASSF1A</i> hipermetilasyon analizi pirogram örneği ..... | 52 |

## KISALTMALAR

|                |                                              |
|----------------|----------------------------------------------|
| <b>AMP</b>     | : Amplifikasyon                              |
| <b>APC</b>     | : Axin ve Adenomatöz Koli                    |
| <b>BET</b>     | : Bromodomain ve Ekstraterminal Motif İçeren |
| <b>BRD</b>     | : Bromodomain                                |
| <b>CK1</b>     | : Kasein Kinaz 1                             |
| <b>D/N</b>     | : Desmoplastik/Nodüler                       |
| <b>DEÜ</b>     | : Dokuz Eylül Üniversitesi                   |
| <b>DEÜTF</b>   | : Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi     |
| <b>DNA</b>     | : Deoksiribonükleik Asit                     |
| <b>Dnmt</b>    | : DNA Metil Transferaz                       |
| <b>DSÖ</b>     | : Dünya Sağlık Örgütü                        |
| <b>FF</b>      | : Taze Donmuş                                |
| <b>FFPG</b>    | : Formalin Fikse Parafine Gömülü             |
| <b>FISH</b>    | : Floresan in situ Hibridizasyon             |
| <b>GLI</b>     | : Glioma İlişkili Onkogen                    |
| <b>GSK3</b>    | : Glikojen Sentaz Kinaz 3                    |
| <b>HAT</b>     | : Histon Asetiltransferaz                    |
| <b>HDAC</b>    | : Histon Deasetilaz                          |
| <b>HDM</b>     | : Histon Demetilaz                           |
| <b>H&amp;E</b> | : Hematoksilen-Eozin                         |
| <b>HMT</b>     | : Histon Metiltransferaz                     |

**İHK** : İmmunohistokimya

**LC/A** : Büyük Hücreli/Anaplastik

**LDL** : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

**LRP** : LDL Reseptörü İlişkili Protein

**MB** : Medulloblastom

**MBEN** : Yaygın Nodüleriteli Medullablastom

**Met** : Metastaz

**mRNA** : Haberci RNA

**Mut** : Mutasyon

**ncRNA** : Kodlamayan RNA

**PCR** : Polimeraz Zincir Tepkimesi

**PRC2** : Polycomb Repressor Kompleksi

**PS** : Pirosekanslama

**PTCH** : Patched

**RNA** : Ribonükleik Asit

**SHH** : Sonic Hedgehog

**WNT** : Wingless

# ÇOCUKLUK ÇAĞI MEDULLOBLASTOMLARINDA MOLEKÜLER ALT SINIFLANDIRMA

Doktora Tezi

Naz KANIT

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

## ÖZET

Medulloblastom özellikle çocuklarda olmakla beraber her yaşta görülebilen, santral sinir sisteminin en sık rastlanılan embriyonal tümörleri arasında yer alır. Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre Derece IV olarak kabul edilir ve genellikle prognozu oldukça kötüdür. Medulloblastomlar WNT-aktif, SHH-aktif, Grup 3 ve Grup 4 olmak üzere dört temel alt gruba ayrılmaktadır. Alt gruplar arasındaki epigenetik değişikliklerin önemi son yıllarda vurgulanmış olup özellikle anormal promotor hipermetilasyonlarının hastalığın kliniği ile ilişkisi önem kazanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, çocukluk çağı medulloblastom hastalarında moleküler alt sınıflandırmanın yapılması ve analiz edilen metilasyonel değişikliklerin yapılan sınıflandırma ile ilişkisinin ortaya koyulmasıdır.

Bu amaçla, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji arşivlerinden çıkarılan 47 pediatrik medulloblastom olgusuna ait formalin fikse parafine gömülü doku ve hastalara ait demografik ve klinik veriler kullanıldı. Tüm olgular için histolojik tanıların konfirmasyonu yapıldı. İmmünohistokimya yöntemi kullanılarak nükleer beta-katenin lokalizasyonu gösteren tümörler WNT-aktif; sitoplazmik beta-katenin lokalizasyonu, GAB1 ve YAP1 ekspresyonu gösteren tümörler ise SHH-aktif medulloblastomlar olarak sınıflandırıldı. SHH-aktif medulloblastomlarda, p53 ekspresyon seviyelerine göre TP53 mutant olmayan ve TP53 mutant alt grupları tanımlandı. Beta-katenin ekspresyonu görülmeyen tümörler WNT/SHH-aktif olmayan (Grup 3 ve 4) medulloblastomlar olarak adlandırıldı.

Dokulardan izole edilen DNA'lar kullanılarak bisülfid çevrimi sonrası CDKN2A, RASSF1A, HIC1, ZIC2, SPINT2, SFRP1, KLF4, PTCH1 ve EZH2 genlerinin metilasyon durumları pirosekanslama yöntemi ile incelendi. DNA metilasyon analizleri sonucunda KLF4, PTCH1 ve ZIC2 genlerindeki hipermetilasyonların SHH-aktif medulloblastomlarla ilişkili olduğu bulundu. SPINT2 geninin hipermetilasyonu ve RASSF1A geninin yüksek dereceli hipermetilasyonlarının metastaz ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu belirlendi. CDKN2A, HIC1 ve SFRP1 genlerindeki metilasyon çalışmaları güvenli sonuçlar vermediğinden hastalıkla ilişkilendirilemedi. Hiçbir örnekte EZH2 geninin hipermetilasyonuna rastlanılmadı.

Araştırmamız, medulloblastomlardaki epigenetik değişikliklerin klinik seyrin öngörölmesinde önemli bir araç olabileceğini ve özellikle *KLF4*, *PTCH1*, *ZIC2*, *SPINT2* ve *RASSF1A* genlerinin bu hastalıktaki potansiyel onkolojik önemini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** epigenetik, immünohistokimya, medullablastom, pirosekanslama, SHH, WNT

**Tez Sayfa Adedi:** 98

**Danışman:** Prof. Dr. Erdener ÖZER

# MOLECULAR SUBCLASSIFICATION OF PEDIATRIC MEDULLABLASTOMAS

PhD Thesis

Naz KANIT

DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH  
SCIENCES

Department of Molecular Medicine

## ABSTRACT

Medulloblastoma is one of the most common embryonal tumors of the central nervous system, which can be seen at any age, especially in children. It is considered Grade IV according to the World Health Organization classification and generally has a very poor prognosis. Medulloblastomas are divided into four basic subgroups: WNT-activated, SHH-activated, Group 3 and Group 4. The importance of epigenetic changes between subgroups has been emphasized in recent years, and the relationship between abnormal promoter hypermethylations and the clinic of the disease has become a significant research topic.

The aim of this study is to investigate the significance of molecular subclassification in pediatric medulloblastoma cases and to analyze the methylation status of the selected genes for their prognostic significance.

For this purpose, formalin fixed paraffin embedded tissues of 47 pediatric medulloblastoma cases were obtained from the archives of Dokuz Eylül University Hospital Patology Department, alongside demographic and clinical data of the patients. A revision of past histological diagnoses was performed for all tissues. Using immunohistochemistry, tumors showing nuclear beta-catenin localization were classified as WNT-activated; tumors showing cytoplasmic beta-catenin positivity, GAB1 and YAP1 expression were classified as SHH-activated medulloblastomas. In SHH-activated medulloblastomas, TP53 wildtype and TP53 mutant subgroups were identified according to p53 immunopositivity. Tumors without beta-catenin expression were defined as non-WNT/SHH-activated (Groups 3 and 4) medulloblastomas.

The methylation status of *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *SFRP1*, *KLF4*, *PTCH1* and *EZH2* genes were examined by pyrosequencing method after bisulfite conversion using DNA isolated from tissues. As a result of DNA methylation analysis, hypermethylations in *KLF4*, *PTCH1* and *ZIC2* genes were associated with SHH-activated medulloblastomas. Hypermethylation of the *SPINT2* gene and high-grade hypermethylation of the *RASSF1A* gene were found to have a statistically significant relationship with the presence of metastasis. Methylation studies in *CDKN2A*, *HIC1* and *SFRP1* genes could not be associated with the disease since they

did not provide optimal results. Hypermethylation of the *EZH2* gene was not detected in any of the samples.

We conclude that detection of methylation status in medulloblastomas may be an important tool in predicting the clinical course and the potential importance of methylation changes of *KLF4*, *PTCH1*, *ZIC2*, *SPINT2* and *RASSF1A* genes in this disease.

**Key Words:** epigenetics, immunohistochemistry, medullablastoma, pyrosequencing, SHH, WNT

**Page Number:** 98

**Advisor:** Prof. Dr. Erdener ÖZER

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Medulloblastom (MB), en sık görülen çocukluk çağı santral sinir sistemi (SSS) tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Derece IV olarak değerlendirilmektedir (1). Heterojenitesi yüksek olan bu kanser tipinde yapılan çalışmalar sonucunda tümörün dört temel alt grubu WNT-aktif, SHH-aktif, Grup 3 ve Grup 4 MB'lar olarak tanımlanmıştır (2). WNT-aktif grup ve SHH-aktif grup MB'lar, isimlerini aldıkları WNT ve SHH yollarının anormal aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Ancak Grup 3 ve Grup 4 MB'ların moleküler alt yapısı henüz tanımlanabilmiş değildir ve bu sebeple bu iki grup MB'ye WNT/SHH-olmayan MB'lar da denilmektedir (1,2).

MB'larda yapılan güncel çalışmalar, MB alt gruplandırmasında özellikle gruplar arasındaki epigenetik değişikliklerin önemini vurgulamakta olup çok daha fazla sayıda MB alt grubunun varlığına işaret etmektedir (3). Alt gruplar arası prognoz seviyeleri oldukça farklı olduğundan, özellikle klinik senaryoları öngörebilecek moleküler belirteçlerin tanımlanması MB hastalarına doğru tanı ve tedavinin yapılabilmesi açısından oldukça önemlidir. Hastalığın klinik seyrini öngörebilen ve kişiye özel tedavi olanakları sağlayan belirteçlerin tanımlanabilmesi için MB'ların moleküler temellerinin daha iyi anlaşılması büyük önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı çocukluk çağı MB olgusunda moleküler alt sınıflandırmanın yapılması, temel epigenetik değişikliklerin incelenmesi ve belirlenen moleküler alt grupların ve epigenetik değişikliklerin tedavi ve prognoz açısından risk stratifikasyonun yapılmasıdır.

Çalışmanın ilk hedefi, çalışmaya dahil edilecek olguların belirlenmesi, bu olgularda histolojik tanıların revize edilmesi ve klinik dosyalarındaki yaş, cinsiyet gibi demografik bilgilerin, hastalığın prognozuna dair (nüks, sağkalım) sonuçların ve beyin omurilik sıvısında tümör hücresi varlığının kaydının tutulması olmuştur.

İkinci hedef, bu dokularda beta katenin, YAP1, GAB1, p53 proteinlerinin ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak incelenerek; dokuların WNT-aktif, SHH-aktif ve WNT/SHH olmayan MB'lar olmak üzere üç moleküler alt gruba ayrılması şeklindedir.

Çalışmanın üçüncü hedefi, MB’da sık rastlanan *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *EZH2*, *SFRP1*, *KLF4* ve *PTCH1* promotor hipermetilasyonlarının pirosekanslama yöntemi ile incelenmesidir.

Çalışmanın son hedefi ise moleküler alt gruplar, histolojik alt gruplar ve elde edilen epigenetik değişiklikler ile prognoz arasındaki ilişkinin ortaya konmasıdır.

Araştırmanın hipotezi aşağıdaki şekilde belirlenmiştir: Çalışmada incelenen *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *EZH2*, *SFRP1*, *KLF4* ve *PTCH1* promotor hipermetilasyonlarının;

- 1) Farklı MB histolojileri,
- 2) MB moleküler alt grupları,
- 3) Klinik veriler (nüks, eks, metastaz) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi vardır ve bu epigenetik düzenlemeler klinik yaklaşımlarda potansiyel prognostik ve prediktif biyobelirteçlerdir.

## 2. GENEL BİLGİLER

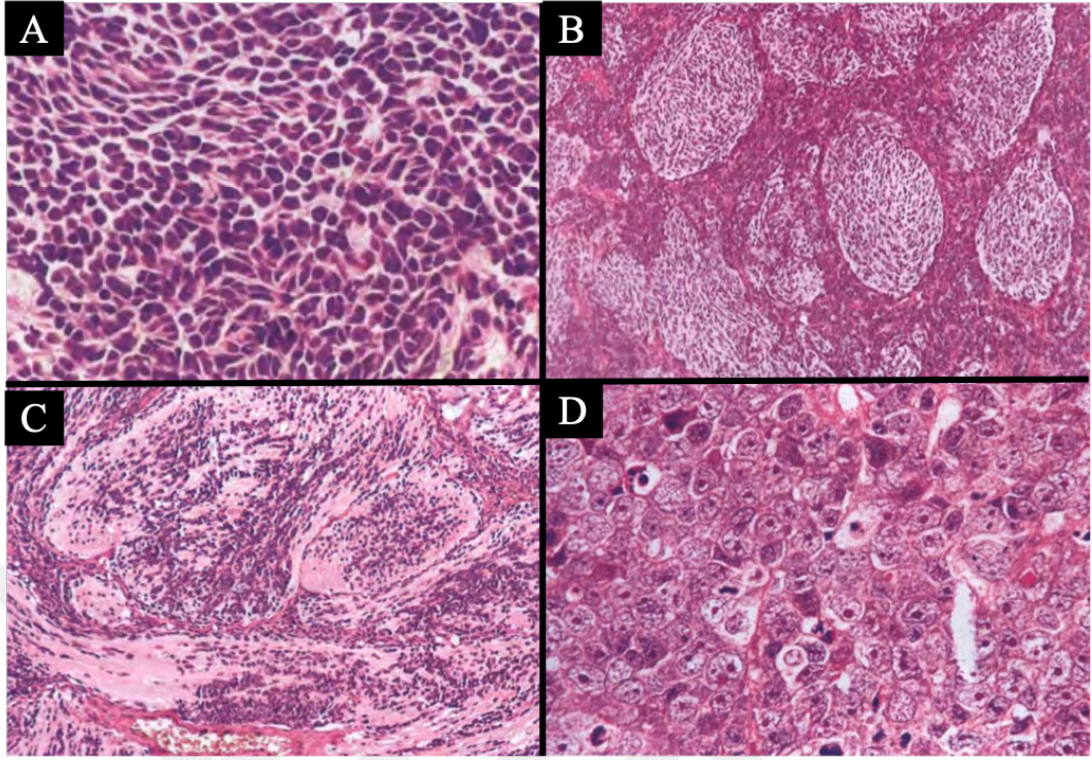
### 2.1. Medulloblastom

#### 2.1.1. *Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler*

İlk olarak Harvey Cushing ve Percival Bailey tarafından 1925 yılında tanımlanan ve günümüzdeki adı verilen MB, serebellumda görülen ve hızlı büyüyen embriyonel bir merkezi sinir sistemi tümörüdür (4,5). Tüm primer beyin tümörlerinin %2'lik bir kısmını ve çocukluk çağı beyin tümörlerinin %18-20'sini oluşturur. Çocuklarda en sık görülen beyin kanseri tipidir ve çok hızlı büyüyen bir seyir gösterir. Çocuklarda daha sıklıkla görülmekle beraber, nadiren yetişkinlerde de ortaya çıkmaktadır. Standart tedavisi cerrahi rezeksiyonu takiben kemoterapi veya radyasyon terapisi olarak yapılmaktadır (4).

#### 2.1.2. *Histolojik Alt Sınıflandırma*

MB'larda temel olarak dört farklı histoloji görülmektedir ve histolojik tiplerin hastalığın seyrine etkisi DSÖ 2016 sınıflandırmasında ortaya koyulmuştur (1). Klasik histoloji küçük, yuvarlak nükleuslu ve solid alanlar yapan diferansiye olmamış hücrelerden oluşan bir yapıdadır (Şekil 1.A). Az-orta seviyede nükleer pleomorfizm ve yüksek mitotik aktivite gözlemlenir. Klasik MB'larda tümör içi desmoplazi azdır ve tüm MB'ların %72'sinde görülür. Desmoplastik/Nodüler (D/N) histoloji özellikle Gorlin Sendromu'nda görülen ve benzer şekilde SHH-aktive MB'larda görülen bir histolojik varyanttır. Nodüler ve retikülince fakir bölgeler ve bunların arasında yer alan solid tabakalar yapmış, retikülin-pozitif kolejen lifleri içeren az diferansiye hücreler ile karakterize edilmektedir (Şekil 1.B). Yaygın Nodüleriteli MB'lar (MBEN) D/N tiplere oldukça benzer klinik özellikler göstermektedir ve histolojik olarak nodüler yapılarını yaygın ve aşırı sayıda görülmesiyle karakterize edilir (Şekil 1.C). Bu histolojik varyant tüm MB'ların %3'ünden azında görülür ve genellikle iyi prognoza işaret etmektedir. Büyük Hücreli/Anaplastik (LC/A) MB ise veziküler nükleuslu, nükleoller belirgin olan büyük neoplastik hücreler ile karakterizedir (Şekil 1.D). Tüm MB'ların %10'unda görülen LC/A histolojisi, yüksek mitotik ve apoptotik aktivite içerir ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. (6)



**Şekil 1.** Medulloblastomlarda histolojik varyantlar. **A)** Klasik **B)** Desmoplastik/Nodüler **C)** Yaygın Nodüleriteli **D)** Büyük Hücreli/Anaplastik (6)

### **2.1.3. Moleküler Alt Sınıflandırma**

MB klinik ve biyolojik açıdan oldukça heterojen bir hastalıktır ve bu heterojenite hücrelerin farklı genetik, moleküler ya da histolojik özelliklerinden kaynaklanabilmektedir. Bu hücrelerin morfolojileri, gen ekspresyonları, taşıdığı genetik anomaliler, hücresel farklılaşma ve proliferasyon kapasiteleri, terapiye verdiği yanıtlar ve metastaz potansiyelleri gibi özellikleri birbirinden farklı olabilmektedir (4). Özellikle transkriptom analizlerinin geliştirilmesiyle medulloblastomun farklı alt grupları olduğunu belirten ve bu alt grupları tanımlayan çok önemli yayınlar yapılmıştır (7–10). 2010 yılında Boston’da yapılan bir konsensüs toplantısında bu çalışmalardan yola çıkılarak medulloblastomların dört alt grubu tanımlanmış, her bir alt gruba dair bilinen moleküler belirteçler derlenmiştir (2). MB’lar WNT-aktif, SHH-aktif, Grup 3 ve Grup 4 MB’lar olmak üzere sınıflandırılmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Medulloblastomların moleküler alt sınıflandırması (2,4,11)

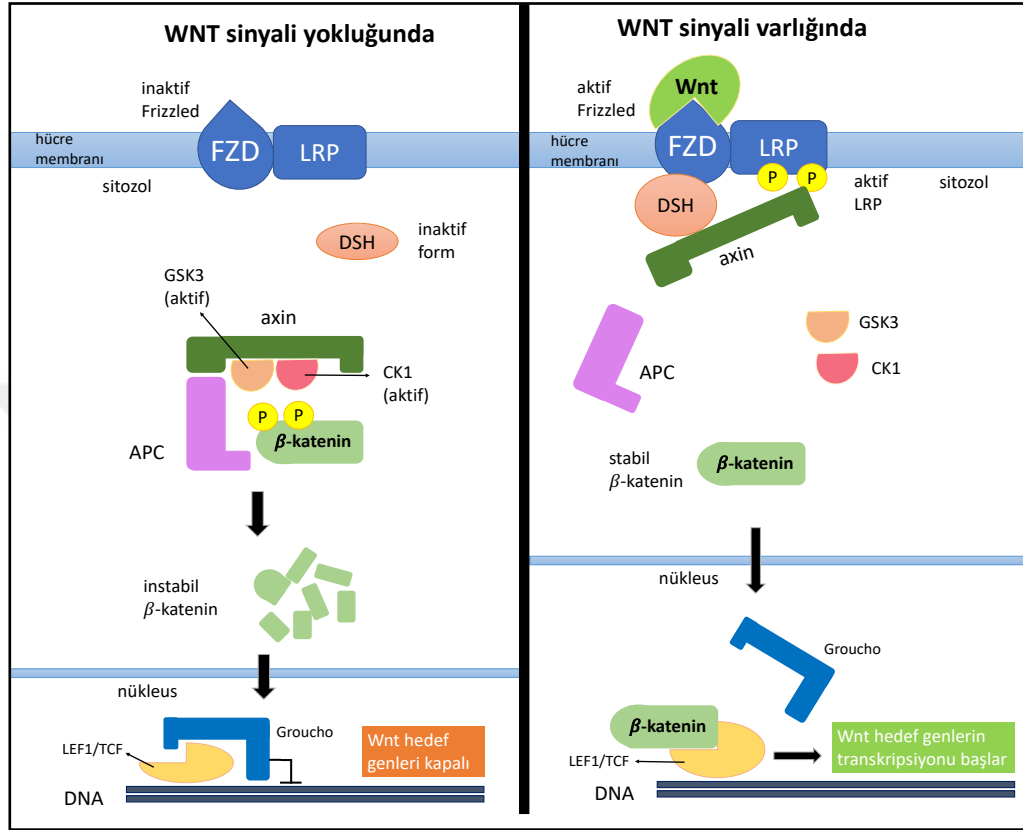
| Moleküler Alt Grup            |             | WNT-aktive                               | SHH-aktive                              | WNT/SHH olmayan                  |                                                 |
|-------------------------------|-------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
|                               |             |                                          |                                         | Grup 3                           | Grup 4                                          |
| <b>Görülme Yüzdesi</b>        |             | %10                                      | %30                                     | %25                              | %35                                             |
| <b>Kadın:Erkek oranı</b>      |             | 1:1                                      | 1:1                                     | 1:2                              | 1:3                                             |
| <b>Yaş grubu</b>              |             | Çocuklar ve yetişkinler                  | Bebekler ve yetişkinler                 | Bebekler ve küçük çocuklar       | Tüm yaşlarda çocuklar                           |
| <b>Prognoz düzeyi</b>         |             | İyi                                      | Orta                                    | Kötü                             | Orta                                            |
| <b>Sağkalım yüzdesi</b>       |             | >%90                                     | %75                                     | %50                              | %75                                             |
| <b>Metastaz yüzdesi</b>       |             | %5-10                                    | %15-20                                  | %40-45                           | %35-40                                          |
| <b>Moleküler belirteçleri</b> | <b>İHK</b>  | YAP1, Beta katenin nükleer lokalizasyonu | YAP1, GAB1, Filamin A                   | -                                | -                                               |
|                               | <b>FISH</b> | Monozomi 6. <i>MYC</i> amp.              | <i>MYCN</i> , <i>GLI2</i> amp.          | İzokromozom 17q. <i>MYC</i> amp. | İzokromozom 17q. <i>CDK6</i> , <i>MYCN</i> amp. |
|                               | <b>Mut.</b> | <i>CTNNB1</i>                            | <i>PTCH1</i> , <i>SMO</i> , <i>SUFU</i> | -                                | -                                               |

(İHK: immünohistokimya, FISH: Floresan in situ Hibridizasyon, Mut: Mutasyon analizleri, amp: amplifikasyon)

#### 2.1.3.1. WNT-Aktive Grup

WNT-aktive MB'lar, adını aldığı Wnt (wingless) yolağının aktivasyonu ile ilişkilidir ve bu grup tümörler, MB alt grupları arasında en çok araştırılmış ve dolayısıyla mekanizması en çok aydınlatılmış olan tümörlerdir. Bu alt gruptaki hastalar çoğunlukla çocuklardır; ancak bu alt gruba ait tümörler her yaşta görülebilmektedir. Uzun süreli prognozu diğer alt gruplara kıyasla oldukça iyi olan WNT grubuna dahil hastalarda hayatta kalma oranları %90'ın üzerindedir (2,11). Bu grup kanonik (beta katenin bağımlı) Wnt yolağının aktivasyonu sonucu ortaya çıkar (Şekil 2). Beta kateninin nükleusta birikimi en önemli belirteçtir (4). Wnt sinyali yokluğunda sistem beta katenini aksin, APC, GSK3 ve CK1 proteinlerinden oluşan degradasyon kompleksi ile fosforilleyerek yıkar. Wnt sinyali varlığında ise FZD

reseptörüne bağlanan Wnt, beta katenin yıkım kompleksinin dağılmasına sebep olur. Yıkımdan kaçan beta katenin nükleusa geçerek Wnt yolağının hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır. (11,12)



**Şekil 2.** Kanonik Wnt (beta katenin) yolağı.

Wnt yolağı, beta katenin molekülünün proteolizinin regülasyonunu gerçekleştiren bir yolaktır. Beta katenin, Wnt sinyali olmadığı durumlarda bir yıkım kompleksi tarafından sitoplazmada yıkılmaktadır. Bu yıkım kompleksi kasein kinaz 1 (CK1), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), axin ve adenomatöz polipozis coli (APC) proteinleri tarafından çalışmaktadır. CK1 ve GSK3, beta katenini ubiquitinasyon ve degradasyon için fosfor grupları ile işaretlerken, APC ve aksin proteinleri kompleksi bir arada tutar. Yıkılan beta katenin nükleusa geçemez ve Wnt yolağı genlerinin transkripsiyonu LEF1/TCF ve Groucho proteinleri tarafından inhibe edilmiş olur. Wnt sinyali varlığında ise Wnt proteini yedi geçişli bir transmembran proteini olan FZD proteinine bağlanır, Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) Reseptörü İlişkili Protein (LRP) aracılığıyla “Dishevelled” (DSH) proteini bu bölgeye çağırılır. Dishevelled, LRP’nin GSK3 ve CK1 tarafından fosforillenmesini sağlar. Fosforillenen LRP’ye axin

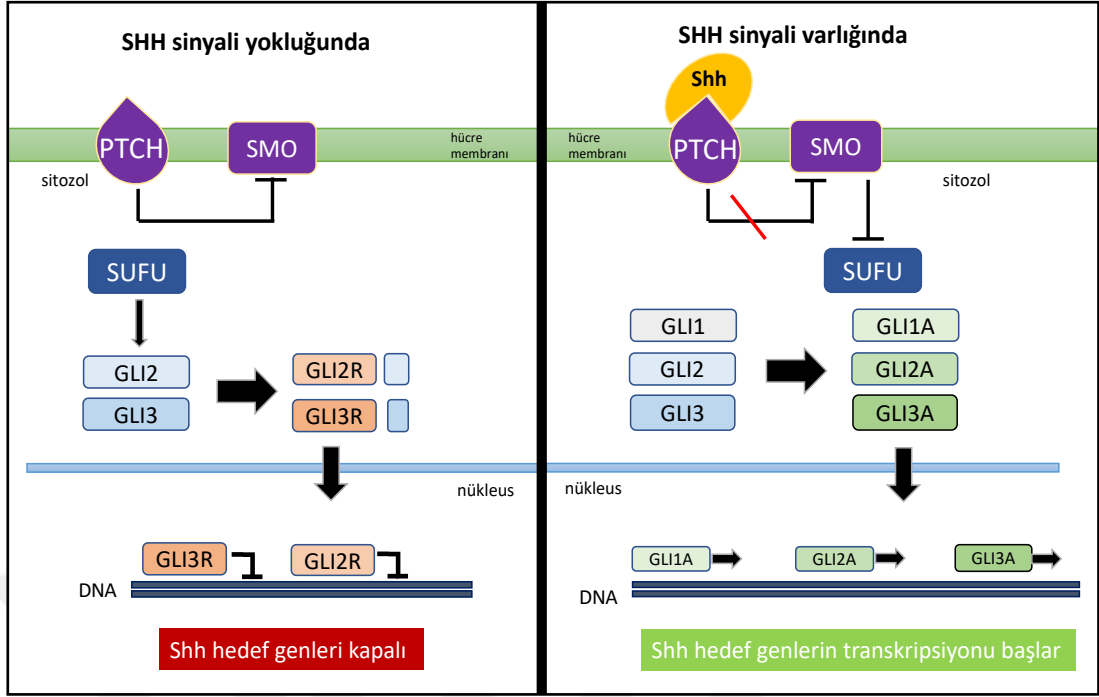
bağlanarak inaktive olur ve yıkım kompleksi bozulmuş olur. Degrade edilmeyen beta katenin nükleusa girer, Groucho – LEF1/TCF bağlantısını bozarak Groucho'nun yerine geçer ve *MYC*, *siklin D1* gibi önemli Wnt genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. (11,12)

Wnt yolağında inhibitör görevi gören APC proteininin germline mutasyonları sonucu görülen Turcot sendromuna bağlı olarak MB ortaya çıkabilir (2). Ayrıca, beta-katenin proteinini kodlayan *CTNNB1* genindeki somatik mutasyonlar sonucu da bu tip MB oluşabilmektedir (13). WNT alt grubundaki MB'larda en sık (%70-90) görülen belirteç, *CTNNB1* genindeki mutasyonlardır. Bunun haricinde, Wnt yolağını aktive edici diğer mutasyonlar da WNT-aktif MB oluşumuna sebep olabilmektedir. *APC* ve *Axin1* mutasyonları sık karşılaşılan örneklerdir. Ayrıca monozomi 6 da bu alt grubun en temel belirteçlerinden biri olarak bilinmektedir (2). Bazı WNT-aktif MB'larda bu belirteçlerden farklı olarak *CDH1*, *DDX3X*, *SMARCA4*, *CREBBP*, *TRRAP*, *MED13* gibi genlerde de mutasyonlar olduğu gösterilmiştir (14,15).

#### **2.1.3.2 Shh-Aktive Grup**

SHH alt grubuna giren MB tümörleri özellikle bebekler ve yetişkinlerde görülür. Hasta grubu eşit oranda kadın ve erkeklerden oluşur, prognozu orta derecedir. Bu tip tümörlerin, embriyonik gelişimde önemli rol oynayan Sonic Hedgehog (Shh) yolağının aktivasyonu sonucu geliştiği bilinmektedir (Şekil 3) (2).

Shh yolağı, Shh proteini yokluğunda inaktif haldedir. Shh reseptörü olan PTCH, on iki geçişli bir transmembran proteindir ve Shh'in bağlanmadığı durumlarda, G proteini ilişkili bir reseptör olan SMO'yu baskılar. Bu durumda, sitoplazmadaki GLI2 ve GLI3 proteinleri fosforillenerek proteolitik yıkıma gider ve represör hale gelirler (GLI2R, GLI3R). GLI1, GLI2 ve GLI3, Shh yolağı için hem aktivatör hem de represör olarak çalışabilen proteinlerdir. Represör formunda iken özellikle GLI3R tarafından Shh genlerinin transkripsiyonu engellenir. SHH varlığında, PTCH'in SMO üzerindeki inhibitör etkisi ortadan kalkar. GLI proteinleri yıkımdan kurtularak aktivatör hale gelirler (GLI1A, 2A, 3A). Özellikle GLI2A tarafından Shh yolağındaki genlerin transkripsiyonu aktive edilirken, GLI1A, Shh yolağının aktivatörü olan *GLI1*'in transkripsiyonunu başlatır. (16)



**Şekil 3.** Sonic Hedgehog yolağı.

Shh yolağında yer alan *PTCH1* genindeki inaktive edici mutasyonlar sonucu görülen Gorlin sendromu ile ilişkili olarak da SHH-aktif MB görülebilmektedir. Bu yolağı aktive eden *PTCH1*, *SMO*, *SUFU* genlerindeki somatik mutasyonlar *GLI1* ve *GLI2* amplifikasyonları, *PTCH1* genini taşıyan 9q kromozomunun delesyonu bu alt grubun en sık görülen belirteçleridir (8,17). SHH-aktif MB'un klinik ayrımı için SHH grubunun belirteci olan GAB1'in yanı sıra, WNT ve SHH gruplarının belirteci olan YAP1'in immünohistokimyasal boyamaları yapılmaktadır. (2,11)

Moleküler sınıflandırma üzerine yapılan ileri çalışmalar, SHH grubuna ait tümörlerin, *TP53* genindeki mutasyonlara bağlı olarak ikiye ayrıldığını (Tablo 2), bu iki grupta birbirinden farklı prognoz ve yaş aralıkları olduğunu göstermektedir. (18)

**Tablo 2.** SHH-aktif medulloblastomların alt grupları (1,18)

| Alt Grup                     | <i>TP53</i> mutant olmayan | <i>TP53</i> mutant |
|------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Rastlanma yüzdesi            | %79                        | %21                |
| Yaş grubu                    | Bebekler ve yetişkinler    | Çocuklar           |
| <i>TP53</i> mutasyon varlığı | “wild-type”                | Mutant             |
| Prognoz                      | Orta                       | Kötü               |

### **2.1.3.3 WNT/SHH-Aktive Olmayan Gruplar**

Grup 3 ve Grup 4 MB tümörleri, WNT ve SHH olmayan tümörler olarak da adlandırılmaktadır. Bunun en önemli sebebi, bu iki grup için belirleyici özelliklerin (aktive olan yollar, görülen mutasyonlar, belirteçleri) henüz kesin olarak belirlenmemiş olmasıdır (1). Bu sebeple ayrımları genellikle transkriptom analizleri ile yapılabilmektedir (2). Ancak, iki moleküler alt grup arasında bilinen bazı farklar vardır. Örneğin Grup 3 tümörler, çoğunlukla metastatiktir ve prognozu en kötü olan MB'lardır. Erkeklerde kadınlara kıyasla; bebek ve çocuklarda ise yetişkinlere kıyasla çok daha fazla görülür (2,10). Grup 4 tümörlerin prognozu ise orta düzeydedir, görülme olasılığı erkeklerde kadınlardan iki kat daha fazladır. Moleküler açıdan bakıldığında, izokromozom 17q iki grupta da görülmekle beraber, Grup 4 tümörlerin %66'sında karşılaşılan bu anomali, Grup 3 tümörlerin yalnızca %26'sında görülmektedir (19). MYC ailesi onkogenleri *c-MYC* ve *MYCN*'in amplifikasyonları, Grup 3 ve 4 arasında ayrım için kullanılabilir. Wnt ve Shh olmayan tümörlerde, Grup 3 MB'ların bir kısmında *c-MYC* amplifikasyonu görülürken, Grup 4 MB'ların bir kısmında ise *MYCN* amplifikasyonu görülmektedir (10,20).

### **2.1.4. Dünya Sağlık Örgütü 2016 SSS Tümörleri Sınıflandırmasında Medulloblastomlar**

MB moleküler sınıflandırmasına dair yapılan çalışmaların ve bulguların artması, 2016 yılında yapılan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflandırması'na da yansımıştır. Derece 4 olarak belirlenen MB'un 2007 yılında yapılan DSÖ sınıflandırmasında yalnızca histolojisi göz önüne alınmış, ancak yalnızca histolojinin, hastalığın klinik çeşitliliğini tanımlamakta yeterli olmadığı görülmüştür (21). 2016 DSÖ Santral Sinir Sistemi (SSS) tümörleri sınıflandırmasında moleküler alt grupların yanı sıra histoloji de göz önüne alınmış, bu iki değişkene göre hastalığın prognoz seviyeleri öngörülmüştür (Tablo 3) (1).

**Tablo 3.** Medulloblastomlarda moleküler alt gruplar Dünya Sağlık Örgütü SSS Tümörleri Sınıflandırması (2016) (1)

| <b>Moleküler Alt Grup</b>           | <b>Histoloji</b>                      | <b>Prognoz</b>                                                 |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>WNT-aktif</b>                    | Klasik                                | Düşük riskli tümör                                             |
|                                     | Büyük hücreli /anaplastik (çok nadir) | Belirsiz klinikopatolojik önemde tümör                         |
| <b>SHH-aktif, TP53 mutant</b>       | Klasik                                | Nadir yüksek riskli tümör                                      |
|                                     | Büyük hücreli /anaplastik             | 7-17 yaş aralığında yaygın, yüksek riskli tümör                |
|                                     | Desmoplastik/nodüler (çok nadir)      | Belirsiz klinikopatolojik önemde tümör                         |
| <b>SHH-aktif, TP53 yabancıl tip</b> | Klasik                                | Standart riskli tümör                                          |
|                                     | Büyük hücreli /anaplastik             | Belirsiz klinikopatolojik önemde tümör                         |
|                                     | Desmoplastik/nodüler                  | Bebeklikte düşük riskli tümör, bebek ve yetişkinlerde yaygın   |
|                                     | Ekstensif nodülerite                  | Bebeklikte düşük riskli tümör                                  |
| <b>Grup 3</b>                       | Klasik                                | Standart riskli tümör                                          |
|                                     | Büyük hücreli /anaplastik             | Yüksek riskli tümör                                            |
| <b>Grup 4</b>                       | Klasik                                | Standart riskli tümör, neredeyse tüm Grup 4 tümörlerde görülür |
|                                     | Büyük hücreli /anaplastik (çok nadir) | Belirsiz klinikopatolojik önemde tümör                         |

#### **2.1.5. Medulloblastomlarda Risk Stratifikasyonu**

MB tedavisinde, tümörün hangi alt gruba girdiğinin ve hangi önemli risk faktörlerini içerdiğinin belirlenmesi çok büyük öneme sahiptir. Çünkü standart MB tedavisi, cerrahi eksizyonu takiben kemoterapi ya da beyin omurilik ışınlaması olarak yapılmakla beraber, göreceli olarak daha iyi seyirli MB tümörlerinde tedavinin uzun süreli yan etkilerinin tümörün kendisinden daha fazla komplikasyona sebep olduğu görülmüştür. Dolayısıyla prognozu iyi olan tümörlere daha düşük dozlu tedaviler önerilmektedir (3,22–24). Bu bağlamda, araştırmalar MB risk gruplarının belirlenmesine odaklanmış, bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaları

derlenmiş ve 2015 yılında Heidelberg’de gerçekleşen konsensüs konferansında ortak bir karara varılmıştır (Tablo 4) (22).

**Tablo 4.** Medulloblastomlarda risk stratifikasyonu (22)

|                                                   | WNT-aktive | SHH-aktive                                                 | Grup 3                                                           | Grup 4                       | Diğer                                                    |
|---------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>Düşük Risk</b><br><b>&gt;%90 sağkalım</b>      | <16 yaş    |                                                            |                                                                  | •M (-)<br>•kr11 kaybı        |                                                          |
| <b>Standart Risk</b><br><b>%70-95 sağkalım</b>    |            | •wt <i>TP53</i><br>• <i>MYCN</i> amp (-)<br>•Met (-)       | • <i>MYC</i> amp (-)<br>•Met (-)                                 | •M (-)<br>•kr11 kaybı<br>yok |                                                          |
| <b>Yüksek Risk</b><br><b>%50-70 sağkalım</b>      |            | Biri ya da ikisi:<br>•Met (+)<br>• <i>MYCN</i><br>•amp (+) |                                                                  | Metastatik                   |                                                          |
| <b>Çok Yüksek Risk</b><br><b>&lt;%50 sağkalım</b> |            | •TP53 mut.<br>•Met (+/-)                                   | Metastatik                                                       |                              |                                                          |
| <b>Bilinmeyen Risk Seviyesi</b>                   | Metastatik |                                                            | • <i>MYC</i> amp (+)<br>& Met (-)<br>•Anaplazinin önemi<br>•i17q | Anaplazi                     | •Grup3-4 arası sınır<br>• <i>MYC</i> ve <i>MYCN</i> amp. |

Met (-): metastaz yok; Met (+): metastaz var; amp (-): amplifikasyon yok; amp (+): amplifikasyon var; kr: kromozom; i17q: izokromozom 17q; wt: “wild-type”; mut: mutant

## 2.2. Medulloblastomlarda Epigenetik Düzenlemeler

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyon seviyelerindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (25). Epigenetiğin insan sağlığı üzerindeki etkisi uzun zamandır bilinmektedir. MB’lardaki önemi ilk olarak 2001 yılında Fröhwald ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada CpG adalarının anormal hipermetilasyonunun gösterilmesiyle ortaya atılmıştır (26). Bu bulgular MB’larda epigenetik çalışmalarını hızlandırmış ve özellikle son yıllarda bazı araştırmacılar sadece hastalığın epigenetik yönüne odaklanmıştır. Hovestadt ve arkadaşları 2013 yılında MB’larda yalnızca DNA metilasyon profillemesi yöntemi kullanarak, altın standart olarak tanımlanan transkriptom analizleriyle en az %95 uyumlu sonuçlar alarak, MB moleküler alt gruplamasının yapılabileceğini göstermiştir (27).

Epigenetik düzenlemeler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatinin ATP'ye bağlı yeniden şekillenmesi ve kodlamayan RNA'lar yoluyla olmak üzere dört farklı mekanizma ile gerçekleşebilir (25).

### **2.2.1. DNA Metilasyonu**

DNA metilasyonu, bir metil grubunun, genellikle yanında bir guanin bulunan bir sitozin nükleotidine beş numaralı karbon atomu üzerinden kovalent bağlanması sonucu gözlemlenir DNA metilasyonu, retroviral elementlerin susturulması, X inaktivasyonu, dokuya spesifik gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi farklı hücresel olayların gerçekleşebilmesini sağlayan çok önemli bir düzenleme mekanizmasıdır (28,29).

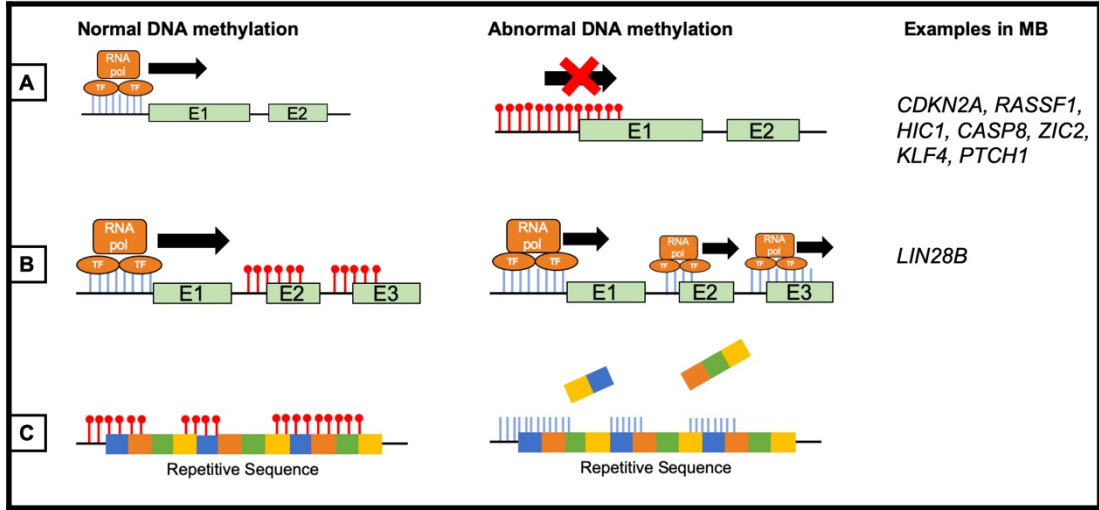
DNA metilasyonları, genom içinde farklı bölgelerde ve farklı biyolojik fonksiyonların gerçekleştirilmesini sağlayan bir mekanizmadır. Memeli genomunun yaklaşık %45'ini oluşturan ve ekspresyonu hücre için tehlike arz eden “transposable” ve viral elementler, DNA metilasyonu ile toplu bir şekilde susturularak genomun potansiyel mutasyonlardan korunması sağlanır (30). Bundan farklı olarak, spesifik genlerin ekspresyon düzeylerinin istenilen seviyelerde tutulması için de DNA metilasyonları, genin kodlayan bölgelerinde ya da promotor bölgelerinde gözlemlenmektedir (28).

Promotor bölgelerinin metilasyonu, en iyi bilinen DNA metilasyon mekanizmasıdır. DNA'da CpG adalarında görülen metilasyonlar genellikle promotor metilasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Genomun sitozin ve guanince zengin yaklaşık 1000 baz çifti uzunluğunda bölgeleri CpG adaları olarak adlandırılmaktadır (31). Başta “housekeeping” genler olmak üzere, gen promotorlarının yaklaşık %70'i CpG adaları üzerinde bulunur (32). Promotor bölgelerinin CpG adaları üzerinde bulunması, bu bölgelerin kromatin yapısının düzenlenmesi ile transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına olanak sağlamaktadır. CpG adalarını içeren genom bölgelerinin, diğer gen bölgelerine göre daha az sayıda histonla bağlanması sebebiyle CpG bölgeleri DNA'nın erişilebilirliğini artırarak transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını teşvik etmektedir (28). Bu sebeple, CpG adalarının metilasyonu, gen ekspresyonunun susturulmasına neden olmaktadır (33). Gametogenez ve erken embriyonik gelişimde

CpG adalarında farklı DNA metilasyon düzeyleri ile gen ekspresyon seviyelerinin doku spesifik regülasyonu sağlanmaktadır (28).

DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar (Dnmt) tarafından gerçekleştirilir. S-adenil metiyonin molekülünden koparılan bir metil grubunun sitozin nükleotidine transferinden sorumlu DNA metiltransferazların farklı çeşitleri ve görevleri bulunmaktadır. Dnmt1, DNA replikasyonu sırasında metilasyon paterninin yeni sentezlenen DNA zincirlerine aktarılmasından sorumludur. Dnmt3a ve Dnmt3b ise “*de novo*” DNA metilasyonu gerçekleştirmektedir (34). Bu proteinler, DNA metilasyon mekanizmasında “writer” işlevi görürler. DNA metilasyon işaretlerini silen proteinler ise “eraser” proteinler olarak bilinirler. DNA metilasyon izlerinin silinmesi, aktif ya da pasif olarak gerçekleşebilir. Pasif DNA demetilasyonu, Dnmt1’in inhibisyonu sonucu görülmekteyken aktif DNA demetilasyonu, metillenmiş sitozinlerden metil gruplarının enzimatik olarak uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir (28). DNA metilasyonunda “reader” olarak görev yapan proteinler metillenmiş sitozin nükleotidlerini tanıyıp bu bölgelere bağlanarak transkripsiyonu inhibe eden proteinlerdir. Çok sayıda protein ve protein ailesinden oluştuğu bilinen bu grup proteinler, farklı dokularda, farklı fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludurlar (28).

DNA’nın anormal metilasyonu ve demetilasyonu, farklı mekanizmalar ile genlerin anormal ekspresyonuna yol açabilmektedir (Şekil 4). Gen promotor bölgelerinin veya bu dizilimlere yakın çevresinin metillenmesi ile spesifik bir gen susturulabilir (Şekil 4.A), ya da tam tersine bu bölgelerin hipometilasyonu sonucu anormal gen ekspresyonu ve istenmeyen mRNA kalıntılarının oluşumu gözlemlenebilir (Şekil 4.B). Ayrıca, kodlanmayan DNA dizilerinin hipometilasyonu ya da demetilasyonu ile genom instabilitesi gerçekleşebilir (Şekil 4.C) (29).



**Şekil 4.** DNA'nın anormal metilasyonu ve demetilasyonu

MB'larda, belirli genlerin promotor bölgesi DNA metilasyonlarının doğrudan hastalığın prognozu ile ilişkisi kurulmuştur. MB'larda sıklıkla promotor metilasyonu ile susturulduğu gösterilen tümör baskılayıcı genlerin bir kısmını *CDKN2A* (26), *RASSF1* (35), *HIC1* (36), *CASP8* (37), *ZIC2* (38), *KLF4* (39), *PTCH1* (40), *SPINT2* (41) ve *SFRP* ailesi genleri (*SFRP1,2,3*) (42) oluşturmaktadır. Bunlar haricinde, MB'larda tümör idamesinde kritik rolü olduğu bilinen bir onkogen olan *VAV1*'in hipometilasyon sonucu upregülasyonu da gözlenmiştir (43). Ayrıca, *LIN28B* geninin promotor upstream bölgesindeki hipometilasyonu sonucu genin ekspresyonunda artış görülmüştür (44).

### 2.2.2. Histon Modifikasyonları

Histon oktomerleri DNA'nın paketlenmesinde görev alırlar ve sekiz küçük bazik proteinlerden oluşmaktadırlar. Bazik yapıdaki 2 H2A ve H2B histon dimerinden ve iki H3-H4 histon heterodimerinin H1 histon bağlayıcı protein ile bağlanması sonucu oluşurlar. Serbest N-terminal kuyruğunda lizin ve arjinin gibi pozitif yüklü aminoasitler içerirler. DNA'nın histon oktomerleri etrafında sarılmasının ardından geçirdiği posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu kromatin yapısının değişebilmesini sağlarlar. Kromatinin açık formu olarak bilinen ökromatin yapısında histonlar sıklıkla asetilenmiş olup, kapalı form olan heterokromatin yapısında spesifik bölgelerdeki metilasyonlara rastlanır. Histon modifikasyonları, DNA replikasyonu,

alternatif ekleme ve DNA onarımı gibi farklı süreçlerde normal hücresel aktivite için oldukça önemlidir (25,29).

Histonlarda asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon ve sitrülasyon gibi birçok farklı posttranslasyonel modifikasyon görülmektedir (25). Bu modifikasyonlar geri dönüşümlü olup, etkileri bulunduğu konuma ve modifikasyon tipine göre farklılıklar gösterebilir. Asetil grubu, lizinin pozitif yükünü nötralize ettiğinden ve kromatin yapısını gevşeterek, transkripsiyon faktörlerinin DNA ile etkileşime girmesini sağladığından, lizin kalıntılarının asetilasyonu genellikle ökromatin yapısına yol açar. Ayrıca, histon aminoasitlerinin metilasyon derecesi de (lizin amino asitlerinin mono-, di- veya trimetile olması) sonucu etkiler (45).

Çalışmalar histon modifikasyonlarının MB'un gelişimi üzerinde büyük bir etkisi olduğunu ve çeşitli “writer”, “reader” ve “reader” proteinlerinde modifikasyonlar olduğunu göstermektedir. MB'ların %16'sının, çoğunlukla da SHH-aktive ve Grup 4 MB'larda, lizin metiltransferazları kodlayan *KMT2D* ve *KMT2C* ekspresyonunu inaktive eden mutasyonlar taşıdığı bulunmuştur. Her iki enzimin aktiviteleri de ökromatin yapısı ile ilişkilidir ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (46). Benzer şekilde, *HDAC5* ve *HDAC9*'un upregülasyonunun anormal hücre döngüsüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir (47). Ayrıca, lizin demetilaz *KDM6A*'nın inaktive edici mutasyonları sonucu histon demetilasyonunun MB'larda önemli bir belirteç olduğu bilinmektedir (14). Bunun yanı sıra, *MYC* gibi bazı genlerin transkripsiyonunu, asetillenmiş histon işaretlerini tanıyıp bunlara bağlanarak başlatan BET (Bromodomain (BRD) ve ekstraterminal motif içeren) familyası proteinlerinde de değişiklikler bulunmuş olup, bu genlerdeki ekspresyon değişikliklerinin *MYC*'in aşırı ekspresyonuna yol açabildiği belirtilmektedir (48).

MB üzerinde yoğun olarak çalışılan bir diğer histon modifikasyon mekanizması, polycomb repressor kompleksi (PRC2) üzerindeki değişikliklerdir. Heterokromatin yoğunlaşması yoluyla transkripsiyonun inaktivasyonuna yol açan H3K27me3 işaretinin üretilmesinden sorumlu olan PRC2 kompleksi, EZH2, EED, SUZ12, JARID2 ve RBAp46.48 alt birimlerinden oluşmaktadır (49). EZH2, PRC2 kompleksinin işlevsel bileşenidir ve bazı MB vakalarında artan EZH2 seviyeleri ve buna bağlı olarak artan H3K27me3 işaretleri görülmektedir (50).

### 2.2.3. ATP-Bağımlı Kromatin Yeniden Düzenlenmesi

ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi, nükleozom konumlandırmasını ve DNA molekülünün çeşitli şekillerde nükleozomlara paketlenme şeklini kontrol eden, böylece transkripsiyon faktörlerinin ve aktivatörlerin DNA'ya bağlanmasına izin vererek veya bloke ederek genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir mekanizmadır (29,51). Ökaryotlarda bu mekanizma, dört farklı ATP'ye bağımlı kromatin yeniden modelleme kompleksi tarafından gerçekleştirilir; ISWI, CHD, SWI/SNF ve INO80. Her kompleks nükleozom konumlandırmasını farklı mekanizmalar ile düzenlemektedir. ISWI, DNA'ya erişimi devre dışı bırakan, genlerin downregülasyonuna ve susturulmasına yol açan veya aksine DNA'ya erişimi sağlayarak transkripsiyonu teşvik edecek şekilde yeniden konumlandırarak kromatin erişilebilirliğini kontrol eder. CHD kompleksi nükleozom konumlandırmasına üç farklı şekilde katkıda bulunur: nükleozomları aralayarak, promotor sekanslarını açığa çıkaracak şekilde histonları yeniden konumlandırarak veya histon varyantlarını hedef bölgeye dahil ederek. SWI/SNF kompleksi nükleozomları çıkarır veya kaydırır, böylece kromatin erişimini kolaylaştırarak hedef genlerin aktivasyonuna veya baskılanmasına yol açar. INO80 kompleksi, promotorlara erişim sağlamak için nükleozomları değiştirerek, düzenleyerek veya nükleozomları oluşturan histonları belirli histon varyantlarıyla değiştirerek ATP'ye bağlı kromatin yeniden modellemesini gerçekleştirir. (51)

ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenleme mekanizmalarındaki kusurlar, MB'larda yaygın olarak gözlenir. Özellikle SWI/SNF kompleks proteinlerini kodlayan genlerin mutasyonları MB'larda en çok araştırılan değişikliklerden biridir. SMARCA4'ün, SHH-aktive MB'ların gelişiminde, tümörün gelişimi için çok önemli olan genetik ve epigenetik yolları koordine etmede çok önemli bir rolü olduğu bulunmuştur (52).

### 2.2.4. Kodlamayan (noncoding) RNA'lar Aracılı Düzenleme

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA) ökaryotik DNA'nın önemli bir bölümünü oluşturur ve sağlıklı hücrelerde yapısal ve düzenleyici rollere sahiptirler. Proteinleri kodlayan haberci RNA'lar (mRNA) dışındaki tüm farklı RNA türleri ncRNA'lar olarak

tanımlanır. Artan sayıda çalışma, ncRNA'ların epigenetik modulatorler ile etkileşime girerek transkripsiyon ve translasyonu etkileyebileceğini göstermektedir (45). MB üzerine yapılan çalışmalar, özellikle miRNA'ların ve lncRNA'ların MB gelişiminde önemli rolleri olduğunu göstermektedir (46).

#### **2.2.4.1. Medulloblastomlarda miRNA Aracılı Düzenleme**

Kodlamayan RNA'lardan miRNA'lar 19-25 nükleotitten oluşur ve farklı mekanizmalar ile gen ekspresyonunu düzenlerler. Hedef mRNA'ya bağlanarak doğrudan veya dolaylı olarak gen ekspresyonunu düzenleyebilir; mRNA'yı parçalayarak veya translasyonu baskılayarak ya da epigenetik düzenleme enzimlerini (DNMT'ler gibi) inhibe ederek veya bunların çalışması için gerekli substratlara bağlanarak transkripsiyonu baskılayabilirler (45). miRNA'lar DNA'dan uzun zincirler olarak kopyalanır, daha sonra RNAz III Drosha ve Dicer enzimleri aracılığıyla sitoplazmada olgun miRNA haline getirilir ve RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile bir kompleks oluşturularak hedef mRNA'lara bağlanır (46,53). Sağlıklı bir hücrenin düzgün çalışması için miRNA aktivitesi çok önemli olduğundan, normal miRNA fonksiyonlarının bozulması çeşitli hastalıklara yol açabilir.

miRNA'lar MB'larda en çok çalışılan ncRNA'lardır ve çeşitli modifikasyonların MB gelişimi ve prognozunu etkilediği gösterilmiştir. *miR-21* PDCC4 yoluyla metastazı teşvik eder (54), buna karşın *miR-10b* bcl-2 yoluyla apoptozu inhibe eder (55), *miR106b* ise PTEN yoluyla proliferasyonu destekler (56). Bir diğer önemli miRNA ise *miR-124*'tür (57). Hücre proliferasyonunu kontrol eden *miR-125b*, *miR-324* ve *miR326*'nın downregülasyonu da literatürde MB'larla ilişkilendirilmiştir (58).

#### **2.2.4.2. lncRNA'lar Aracılı Düzenleme**

lncRNA'lar, 200 nükleotitten daha uzun ncRNA'lardır ve RNA polimeraz II tarafından genomik lokusların antisens dizilerinden transkripsiyonu ile oluşurlar (46,59). Bazı lncRNA'ların normal hücrelerde gen ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir, ancak çoğu lncRNA'nın spesifik işlevi henüz bilinmemektedir (60).

MB'larda lncRNA'lar üzerine yapılan çalışmalar, bazı MB alt tiplerine özgü lncRNA ekspresyon paternini ortaya çıkarmıştır. lncRNA'lar üzerine yapılan ilk

Çalışmalardan biri, *miR-17~92* kümesinden üç miRNA'yı bağlayarak hedef mRNA'larını baskılamalarını engelleyen Linc-NeD125'in (MIR100HG olarak da bilinir) keşfedilmesine yol açmıştır (61). Hedef miRNA'ları bağlayarak birkaç tümör baskılayıcı geni baskılayan NKX2-2-AS1'in SHH-aktif MB'larda downregüle olduğu bulunmuştur (62). MB alt tiplerinde yapılan bir lncRNA profillemesi çalışması, lncRNA'ların ifade seviyelerinin MB'ların her bir alt tipinde değışiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır (63).

### 2.3. Çalışmada Seçilen Genler

Çalışmamızda MB'larda önemi gösterilen *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *EZH2*, *SFRP1*, *KLF4* ve *PTCH1* promotor hipermetilasyonları, altın standart yöntem olarak bildirilen bisüfit çevrimli pirosekanslama yöntemi ile incelenmiştir (64). Seçilen genlerin promotor metilasyonlarına MB'larda sıkça rastlanmaktadır (65). *CDKN2A*, *RASSF1A*, *KLF4* genleri birçok kanser tipinde farklı modifikasyonlarla susturulduğu bilinen tümör baskılayıcı proteinler kodlamaktadır ve bu çalışmada MB vakalarındaki değışimleri incelenmiştir (66–73). Çalışmada incelenen diğer genler ise, çeşitli kanserlerde promotor metilasyonu görülen *HIC1* geni (74,75), beyin gelişiminde görevli olduğu bilinen *ZIC2* geni (76–78), kanser gelişimi ve metastazında rol oynadığı bilinen *SPINT2* geni (41,79,80), MB'larda ekspresyonu arttığı bilinen *EZH2* geni (81,82), Shh yolağında kritik rolü olan *PTCH1* geni (40) ve Wnt yolağı ile ilişkilendirilen *SFRP1* geni (42) olarak belirlenmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın Tipi

Bu tez çalışması tanımlayıcı-retrospektif bir araştırmadır.

#### 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız 2017-2021 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi'nde Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Bu tez çalışmasına dair araştırma planı Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5.** Araştırma Planı

|                     |                                                                                     |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Kasım 2017          | Etik Kurul onayının alınması                                                        |
| Temmuz 2019         | Proje başvurusunun DEU BAP Koordinatörlüğüne yapılması                              |
| Ekim 2019           | Tez önerisinin tez izleme jürisine sunumu ve Enstitü tarafından kabulü              |
| Mart 2020           | Projenin DEU BAP Koordinatörlüğüne kabulü                                           |
| Mart-Ağustos 2020   | Kabul edilen BAP projesi bütçesinden sarf malzeme alımlarının yapılması             |
|                     | Tıbbi Patoloji arşivlerinden dokuların ve hasta kayıtlarından verilerin çıkarılması |
|                     | Histoloji revizyonu                                                                 |
| Eylül-Aralık 2020   | Malzeme alımları                                                                    |
|                     | İmmünohistokimyasal boyamalar                                                       |
|                     | Dokulardan kesit alma ve DNA izolasyonu                                             |
|                     | DNA konsantrasyonu ve saflık tayini                                                 |
| Ocak-Mart 2021      | DNA'ların bisülfid çevrimi                                                          |
|                     | PCR ile gen bölgelerinin çoğaltılması                                               |
|                     | Pirosekanslama ile DNA metilasyon analizi                                           |
| Nisan-Haziran 2021  | Verilerin istatistiksel analizi                                                     |
|                     | Araştırmanın yayına dönüştürülmesi, kabul yazısı alınması                           |
| Temmuz-Ağustos 2021 | Tez yazım aşaması                                                                   |

### 3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi (Çalışma Grupları)

Çalışmada 47 FFPG MB dokusu kullanılmış olup, araştırmaya dahil olma kriterleri şu şekilde belirlenmiştir:

- I. Medulloblastom histolojik tanısı almış olmak,
- II. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde standart tedavi görmüş olmak,
- III. Çalışmalar için yeterli tümör dokusu olması ve
- IV. Hastanın 0-18 yaş aralığında olması

Araştırmanın dışlama kriterleri ise;

- I. Hastanın 18 yaşından büyük olması,
  - II. Hastaların standart tedavi almamış olması ve/veya
  - III. Parafin bloklarda yeterli tümör dokusu olmaması
- olarak belirlenmiştir.

### 3.4. Çalışma Materyali

Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1990-2020 yılları arasında MB tanısı almış 47 vakaya ait FFPG dokusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu vakalara ait demografik (yaş, cinsiyet), histolojik ve klinik (nüks, eks, metastaz) veriler hasta kayıtlarından elde edilmiştir.

### 3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmadaki bağımsız değişkenler şunlardır:

- Hastaların yaşı
- Hastaların cinsiyeti
- Hastalarda BOS tümör hücresi varlığı
- Hastalığın nüks durumu

- Hastaların sağ kalım durumu

Çalışmadaki bağımlı değişkenler ise şu şekildedir:

- Histolojik alt tipler
- Moleküler alt tipler
- *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *EZH2*, *SFRP1*, *KLF4* ve *PTCH1* promotor hipermetilasyonlarının varlığı

### 3.6. Veri Toplama Araçları

#### 3.6.1. Çalışmada Kullanılan Arşiv Materyalleri, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Bu çalışma, arşivden çıkarılan 47 FFPG MB tümör dokularında gerçekleştirilen pirosekanslama sonuçları ve bu vakalara ait demografik (yaş, cinsiyet), histolojik ve klinik (nüks, eks, metastaz) veriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelerinin listesi Tablo 6'da yer almaktadır.

**Tablo 6.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

| Malzeme adı                                                     | Markası/Kod                   | Çalışmadaki kullanım amacı                    |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>ultraVIEW Universal DAB Detection Kit</b>                    | Ventana/ 760-500              | İHK boyamaları esnasında kullanılmıştır.      |
| <b>beta-katenin antikoru</b>                                    | Roche Diagnostics, İsviçre    | İHK boyamalarında kullanılan antikordur.      |
| <b>YAP-1 antikoru</b>                                           | Thermo Fisher Scientific, ABD | İHK boyamalarında kullanılan antikordur.      |
| <b>GAB1 antikoru</b>                                            | Thermo Fisher Scientific, ABD | İHK boyamalarında kullanılan antikordur.      |
| <b>p53 antikoru</b>                                             | Roche Diagnostics, İsviçre    | İHK boyamalarında kullanılan antikordur.      |
| <b>Steril, filtreli, DNase/RNase free pipet ucu (0.5-20 µL)</b> | HTL, 490018230026             | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır. |

|                                                                           |                             |                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Steril, filtreli,<br/>DNase/RNase free pipet<br/>ucu (10-100 µL)</b>   | HTL,<br>490017530106        | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır.                                |
| <b>Steril, filtreli,<br/>DNase/RNase free pipet<br/>ucu (20-200 µL)</b>   | HTL,<br>490017730206        | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır.                                |
| <b>Steril, filtreli,<br/>DNase/RNase free pipet<br/>ucu (100-1000 µL)</b> | HTL,<br>490018931006        | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır.                                |
| <b>2 mL'lik collection<br/>tüpleri</b>                                    | Qiagen, Almanya,<br>19201   | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır.                                |
| <b>PCR tüpleri (0.2mL)</b>                                                | Qiagen, Almanya,<br>981005  | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır.                                |
| <b>Etanol</b>                                                             | Merck,Almanya,<br>100983    | PS analizlerinin her adımında kullanılmıştır.                                |
| <b>Ksilen</b>                                                             | Sigma-Aldrich,<br>109843    | DNA izolasyonunda deparafinizasyon için kullanılmıştır.                      |
| <b>QIAMP DNA FFPE<br/>Tissue Kit</b>                                      | Qiagen, Almanya,<br>56404   | DNA izolasyonunda kullanılmıştır.                                            |
| <b>EPI TECT Bisulfite Kit</b>                                             | Qiagen, Almanya,<br>59104   | Genomik DNA'nın bisülfite çevrimi için kullanılmıştır.                       |
| <b>PyroMark PCR kit</b>                                                   | Qiagen, Almanya,<br>978703  | PS ile incelenecek bölgenin amplifikasyonu için kullanılmıştır.              |
| <b>PyroMark Q24<br/>Advanced CpG<br/>Reagents</b>                         | Qiagen, Almanya,<br>970922  | PS analizlerinde kullanılmıştır.                                             |
| <b>PyroMark Wash Buffer</b>                                               | Qiagen, Almanya,<br>979308  | PS analizinin yıkama aşamalarında kullanılmıştır.                            |
| <b>PyroMark<br/>Denaturation Buffer</b>                                   | Qiagen, Almanya,<br>979307  | PS analizinin yıkama aşamalarında kullanılmıştır.                            |
| <b>EpiTect PCR Control<br/>DNA Set</b>                                    | Qiagen, Almanya,<br>59695   | PCR ve PS aşamalarında çalışmanın doğruluğunu göstermek için kullanılmıştır. |
| <b>PyroMark Q24 Plate</b>                                                 | Qiagen, Almanya,<br>1061862 | PS analizinde örnekler cihaza yüklenirken kullanılmıştır.                    |

PCR ve PS çalışmalarında kullanılan primer çiftleri, PyroMark CpG Assay (Qiagen, Almanya, Ürün no: 978746) adıyla ticari olarak hazır satılan primer setleridir. Belirli bölge için hem PCR hem PS çalışmalarında kullanılan primerleri içeren bu kitler ile ilgili detaylı bilgi Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** PCR ve pirosekanslama analizlerinde kullanılan primerler

| Gen adı        | Katalog no | İncelenen DNA sekansı                          |
|----------------|------------|------------------------------------------------|
| <i>CDKN2A</i>  | PM00139993 | CGAAATTAAACTAAACCGCTGCACGCCTCT<br>GACGCGA      |
| <i>RASSF1A</i> | PM00013293 | GGTAGCGCAGTCGCCGCGGGTCAAGTCGC<br>GGC           |
| <i>HIC1</i>    | PM00182434 | TGCCGCGCACACCGAATCCATGCGT                      |
| <i>ZIC2</i>    | PM00054131 | CGCGGGCTGGGACAGGGACCAGGCGCGGA                  |
| <i>SPINT2</i>  | PM00191534 | AACGCGTGTCTGCCGC                               |
| <i>SFRP1</i>   | PM00035371 | CGCCGGCACCCAGGTCTTCCTCTGCTCGCT<br>CTTCGCGCCCGT |
| <i>KLF4</i>    | PM00039550 | TCACTGAACGAGGGTAAGGAGCGGCCACC<br>GCGCGGA       |
| <i>PTCH1</i>   | PM00144333 | CTCCCCCGACCGGCGT                               |
| <i>EZH2</i>    | PM00029806 | CGATGGCGATTGGGCTGCCGCGTTTGGCG<br>CTCGGTCCG     |

Tez çalışmaları süresince İHK ve PS analizleri kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 8’de listelenmiştir.

**Tablo 8.** Kullanılan cihazların listesi

| Cihaz adı                                     | Markası                     | İşlevi                |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| BenchMark ULTRA                               | Ventana                     | Otomatize İHK sistemi |
| Sigma 1-14 Santrifüj                          | Sigma Aldrich               | Santrifüj             |
| Rotor (80301)                                 | Sigma-Aldrich               | Rotor                 |
| Vortex (MX-S)                                 | SciLogex                    | Vorteks               |
| Bio TDB-100 Dry Block<br>Thermostat           | BioSan                      | Termal Blok           |
| Socorex (1-100µL, 20-200 µL ve<br>100-1000µL) | Socorex Isba SA,<br>İsviçre | Otomatik pipetörler   |

|                           |                                    |                                     |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| NanoDrop 2000C            | Thermo-Fischer Scientific, ND-2000 | Spektrofotometre                    |
| SensoQuest LabCycler      | GmbH, Almanya                      | PCR analizi için termal döngüleyici |
| T-shaker                  | EuroClone                          | plate çalkalayıcı                   |
| Dry Bath                  | EuroClone                          | plate ısıtıcı                       |
| PyroMark Q24 Wash Station | Qiagen, Almanya                    | PS için yıkama istasyonu            |
| PyroMark Q24              | Qiagen, Almanya                    | PS analiz sistemi                   |

### 3.6.2. Histolojik Revizyon

Arşivden çıkarılan olgulara ait Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı preparatlar tekrar incelenerek histolojik tanıları revize edilmiştir. Bu kapsamda, histolojik bulgular ışığında vakalar klasik histoloji, D/N, MBEN ve LC/A olmak üzere dört histolojik alt gruba ayrılmıştır. Ek incelemeler için optimal tümör blokları seçilmiştir.

### 3.6.3. İmmünohistokimyasal Boyamalar

Tüm dokulardan 5 mikron kalınlığında kesit alınarak ve beta-katenin, YAP-1, GAB1 ve p53 antikorları kullanılarak, otomatize İHK cihazında (BenchMark ULTRA, Ventana) BenchMark ULTRA IHC/ISH boyama modülü ile ultraVIEW Universal DAB Detection Kit kullanılarak İmmünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Kullanılan beta-katenin (Roche Diagnostics, Switzerland), YAP-1 (Thermo Fisher Scientific, USA), GAB1 (Thermo Fisher Scientific, USA) ve p53 (Roche Diagnostics, Switzerland) antikorları için U ultraView DAB (v1.02.0018) protokolü uygulanmıştır ve basamakları şu şekildedir.

1. Lamlar 72°C’de 4 dk inkübe edildi.
2. EZPrep Hacim ayarı uygulanarak EZPrep ile yıkandı.
3. EZPrep Hacim ayarı yeniden uygulanarak lamel eklendi.
4. Slaytlar EZPrep ile yıkandı, depar hacim ayarı ve lamel uygulanarak karıştırıcılar etkinleştirildi.

5. Slayt ısıtıcısı devre dışı bırakıldı ve 8 dk iyileştirmeye bırakıldı.
6. Slaytlar EZPrep ile yıkandı ve uzun hücre iyileştirici uygulandı.
7. CC Uzun lamel uygulanarak 95°C’de 8 dk inkübe edildi.
8. CC orta lamel No BB uygulandı.
9. Slayt ısıtıcısı devre dışı bırakılarak 8 dk inkübe edildi.
10. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
11. Lamel uygulanarak slaytlar 36°C’ye kadar ısıtıldı.
12. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
13. Bir damla UV INHIBITOR ve lamel uygulanarak 4 dk inkübe edildi.
14. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
15. Slayt 37°C’ye ısıtıldı ve 4 dk inkübe edildi.
16. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
17. Bir damla antikör uygulandı, lamel kapatılarak inkübe edildi. İnkübasyon süreleri beta-katenin için 32 dk, YAP-1 ve GAB1 için 48 dk, p53 için 40 dk olarak belirlendi.
18. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
19. Lamel uygulandı ve 36°C’ye kadar ısıtıldı ve reaksiyon tamponu ile çalkalandı.
20. Bir damla UV HRP UNIV MULT damlatılıp lamel kapatıldı ve 8 dk inkübe edildi.

21. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
22. Birer damla UV DAB ve UV DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı, lamel kapatılıp 8 dk inkübe edildi.
23. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
24. Bir damla UV COPPER uygulandı, lamel kapatılarak 4 dk inkübe edildi.
25. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
26. Arka plan boyaması için bir damla hematoksilen uygulandı, lamel kapatılıp 12 dk inkübe edildi.
27. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı ve slayt hacmi reaksiyon tamponu ile ayarlandı.
28. Arka plan boyamasını iyileştirmek için bir damla BLUING REAGENT damlatıldı, lamel kapatılarak 4 dk inkübe edildi.
29. Reaksiyon tamponu ile slayt çalkalandı, lamel uygulandı, slayt ısıtıcısı kapatıldı.

#### **3.6.4. Pirosekanslama alışmaları**

Pirosekanslama (PS) analizi için öncelikle tüm dokulardan 5 mikron kalınlığında 10 kesit alınarak DNA izolasyonu için kullanıldı. İzole edilen genomik DNA’lardaki metilasyonların tespiti için bisülfıt çevrimi yapıldı. Bisülfıt uygulaması sonrası Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) yöntemi ile ilgili gen bölgeleri çoğaltılarak pirosekanslama analizi için önce yıkama aşamalarından geçirildi, ardından analize alındı.

#### 3.6.4.1. DNA İzolasyonu

FFPG dokulardan DNA izolasyonu QIAMP DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

DNA izolasyon protokolü şu şekildedir:

1. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) kullanılarak her bir bloktan 5µm'lik 10 kesit alındı ve 2 mL'lik eppendorf tüplere koyuldu.
2. Üzerine 1 mL ksilen eklendi (500 µL x2), 10 saniye vortekslendi, 14800 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
3. Pipet ile süpernatant uzaklaştırılıp 2. adım tekrarlandı.
4. Pipet ile süpernatant uzaklaştırılıp 1 mL etanol eklendi (500 µLx2), 10 sn vortekslenip, 14.800 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
5. Pipet ile süpernatant uzaklaştırılıp 4. adım tekrarlandı ve süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Etanolün uzaklaştırılması için 56°C'de 10 dk tüplerin kapakları açık şekilde inkübe edildi.
7. Tüplerin dibinde kalan pellet üzerine 180 µL ATL Buffer eklendi.
8. Üzerine 20 µL Proteinaz K eklendi, 1-2 sn vortekslendi.
9. Tüpler 56°C termal bloğa yerleştirildi ve 1 saat inkübe edildi. Bu aşamada kapakların ısı ile açılmaması için üzerine ağırlık koyuldu.
10. Ardından tüpler 90°C'de 1 saat inkübe edildi ve inkübasyon süresince üzerine ağırlık koyuldu.
11. İnkübasyonlardan sonra çok kısa santrifüjleyerek buhar damlacıklarının aşağı inmesi sağlandı.
12. 200 µL AL Buffer eklendi, kısaca vortekslendi.

13. Üzerine 300 µL etanol eklendi, kısaca vortekslendi.
14. Kısa santrifüj yapılarak örnek tüpün altında toplandı.
15. Lizat MinElute filtresine transfer edildi.
16. 9000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda alt tüp atılıp, yenisi yerleştirildi.
17. Filtreye 500 µL AW1 Buffer eklenip, 9000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası alt tüp atılıp, yenisini yerleştirildi.
18. Filtreye 500 µL AW2 Buffer eklendi, 9000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası alt tüp atılıp, yenisini yerleştirildi.
19. Maksimum hızda 3 dk santrifüjlenip, alt tüp atıldı. Filtre temiz 2 mL'lik eppendorf tüpe yerleştirildi.
20. Filtrenin üzerine dikkatlice 100 µL ATE Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
21. Maksimum hızda 1 dk 15 sn santrifüjlenerek DNA izolasyonu tamamlandı.

#### **3.6.4.2. DNA Konsantrasyon ve Saflık Tayini**

İzolasyon sonrası DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve saflıkların belirlenmesi için Nanodrop (Thermo Fischer, Almanya) cihazı kullanıldı. 1,5 µL ATE buffer ile blank alındı. Ardından tekrar 1,5 µL ATE buffer ile ölçüm yapılarak ölçümün doğruluğu kontrol edildi. Her örnekten 1,5 µL alınıp cihaza yüklenerek ölçümler yapıldı. Ölçüm sonuçları (konsantrasyon, 260/280, 260/230) kaydedildi. Her bir örneğin verdiği pikin yapısı incelenerek DNA'ların kullanılabilirliği teyit edildi. Ölçümlerden sonra son kez 1,5 µL ATE buffer ve 1,5 µL su ile ölçüm yapılarak cihaz temizlendi.

#### **3.6.4.3. Genomik DNA'nın Bisülfid Çevrimi**

İzole edilen genomik DNA'lar bisülfid uygulamasına tabi tutularak metillenmemiş sitozinlerin urasile çevrimi gerçekleştirildi. İşlem sürecinde EpiTect

Bisulfite kit (Qiagen, Almanya), üreticinin önerdiği yöntem ile çalışıldı. İşlemden uygulanan protokol aşağıdaki gibidir:

1. Yeterli miktarda Bisüfit Mix'e 800 µL RNase-free su eklendi, tamamen çözünene kadar vortekslendi.
2. 200 µL'lik PCR tüplerine her bir örnek için Tablo 9'da verilen reaksiyon kuruldu.

**Tablo 9.** Bisüfit çevrim reaksiyonu

| Reaksiyon içeriği  | Miktar (µL) |
|--------------------|-------------|
| DNA                | 20 µL       |
| Bisüfit karışımı   | 85 µL       |
| DNA Protect Buffer | 35 µL       |
| Son hacim          | 140 µL      |

3. PCR tüpleri iyice karıştırılarak oda sıcaklığında bekletildi.
4. Termal döngüleyiciye Tablo 10'daki program tanımlandı.

**Tablo 10.** Bisüfit çevrimi için uygulanan program

| Adım         | Süre (dk) | Sıcaklık (°C) |
|--------------|-----------|---------------|
| Denatürasyon | 5         | 95            |
| İnkübasyon   | 25        | 60            |
| Denatürasyon | 5         | 95            |
| İnkübasyon   | 85        | 60            |
| Denatürasyon | 5         | 95            |
| İnkübasyon   | 175       | 60            |
| Hold         | -         | 20            |

5. PCR tüpler cihaza yerleştirildi ve reaksiyonu başlatıldı.

6. Reaksiyon bittikten sonra PCR tüpündeki tüm içeriği temiz bir ependorfa aktarıldı.
7. Ependorfa 310 µL Buffer BL eklendi. Vorteks ile karıştırılıp, santrifüjlendi.
8. Üzerine 250 µL etanol eklendi. 15 saniye pulse vortekslenip, kısaca santrifüjlendi.
9. Çözelti spin kolonlara aktarıldı. Maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi, alt tüp boşaltıldı, tekrar filtrenin altına yerleştirildi.
10. Filtreye 500 µL Buffer BW eklendi, maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alt tüp boşaltılarak, tekrar filtrenin altına yerleştirildi.
11. Filtreye 500 uL Buffer BD eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
12. Tüpler maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi, alt tüp boşaltılıp, tekrar filtrenin altına yerleştirildi.
13. Filtreye 500 µL Buffer BW eklendi, maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alt tüp boşaltılıp, tekrar filtrenin altına yerleştirildi.
14. Onüçüncü adım tekrarlandı.
15. Filtreler temiz toplama tüplerine aktarıldı, maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi.
16. Filtreler temiz ependorflara yerleştirildi ve 5 dakika boyunca 56<sup>0</sup>C'de kapakları açık olarak inkübe edilerek kalan sıvı uzaklaştırıldı.
17. Filtreler temiz tüplere yerleştirildi. Her filtrenin üzerine dikkatlice 20 µL Buffer EB eklendi. 15,000 g'de 1 dakika santrifüjleyerek DNA'yı ekstraksiyonunu tamamlandı.
18. Filtreye 30 µL daha Buffer EB eklenip, max hızda 1 dakika daha santrifüjlendi.
19. DNA kısa dönem (1 gün için) 4<sup>0</sup>C'de, uzun dönem -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### 3.6.4.4. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) Yöntemi

Bisülfid dönüşümü gerçekleştirilen DNA’larda analizi yapılacak bölgenin çoğaltılması için, biyotin işaretli primerler (*CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *SFRP1*, *KLF4*, *PTCH1*, *EZH2* genlerindeki belirli bölgeleri çoğaltmak üzere dizayn edilmiş) kullanılarak PCR yöntemi uygulandı. Deneysel süreçte Pyromark PCR Kit (Qiagen, Almanya) ve PM00139993, PM00013293, PM00182434, PM00054131, PM00191534, PM00035371, PM00039550, PM00144333 ve PM00029806 katalog numaralı primerler (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Üreticinin önerileri doğrultusunda uygulanan yöntemde bisülfid uygulaması yapılan DNA’lar kullanılarak Tablo 11’de belirtilen reaksiyon 0,2 mL’lik PCR tüplerine kuruldu. Birden fazla örnek çalışılacağı durumlarda master mix hazırlanarak her tüpe 20 µL olacak şekilde dağıtıldı, üzerine 5 µL DNA eklendi.

**Tablo 11.** PCR içeriği

| Content        | 1x    | 17x   | 18x | 19x   | 20x | 21x   | 22x |
|----------------|-------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| DNA            | 5 uL  |       |     |       |     |       |     |
| Master Mix     | 12,5  | 212,5 | 225 | 237,5 | 250 | 262,5 | 275 |
| Primer         | 1     | 17    | 18  | 19    | 20  | 21    | 22  |
| Coral Load 10x | 2,5   | 42,5  | 45  | 47,5  | 50  | 52,5  | 55  |
| H2O            | 4     | 68    | 72  | 76    | 80  | 84    | 88  |
| Final Volume   | 25 uL |       |     |       |     |       |     |

Çalışmaya 4 kontrol grubu dahil edildi. PCR çalışmalarında Epiect PCR Control DNA Set (Qiagen, Almanya) ticari kontrol seti kullanıldı.

- C1: Metillenmemiş Kontrol
- C2: Metillenmiş Kontrol
- C3: Bisülfid kontrolü (Bisülfid uygulaması yapılarak kullanıldı)
- NTC: DNA içermeyen kontrol (dH2O)

Reaksiyonlar hazırlandıktan sonra Tablo 12'deki PCR protokolü termal döngüleyici cihazına tanıtıldı.

**Tablo 12.** PCR reaksiyonu

| Sıcaklık | Süre  | Döngü Sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 95 °C    | 15 dk | -            |
| 94 °C    | 30 sn | 45 döngü     |
| 56 °C    | 30 sn |              |
| 72 °C    | 30 sn |              |
| 72 °C    | 10 dk | -            |
| 4 °C     | ∞     | -            |

Program tamamlandıktan sonra, PCR ürünleri kısa süreli (maksimum 30 gün) +4°C'de saklandı.

#### **3.6.4.5. Pirosekanslama**

PCR yöntemi ile her primer için tüm örnekler çalışılmış olup, PCR ürünleri son aşama olan Pirosekanslama analizinde kullanıldı. Pirosekanslama çalışmalarında, PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Almanya) üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılmış olup, yıkama aşamaları PyroMark Q24 Workstation (Qiagen, Almanya) yardımıyla yapıldı. Son analizler PyroMark Q24 Software (Qiagen, Almanya) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Pirosekanslama deneyinin aşamaları şu şekildedir:

##### Hazırlık aşamaları

- Yazılım açılarak örnek bilgisi ve çalışılacak primerleri içeren run bilgileri sisteme kaydedildi.
- Tools seçeneğinden “Prerun Information” kısmına giderek kartuşa yapılacak yükleme miktarını kaydedildi. Tüm bilgiler doğrultusunda sistem, kartuşa yüklenecek nükleotit miktarını belirtir. Belirtilen miktarlar kaydedildi.
- Run dosyası flash diske kaydedildi ve Pyromark cihazına takıldı.

### Deneysel aşamalar

- Streptavidin Sepharose bead'leri içeren tüp (4°C) nazıkçe çalkalandı ve Tablo 13'te belirtilen master mix, uygun örnek sayısına göre hazırlandı.

**Tablo 13.** Pirosekanslama için hazırlanan sefâroz boncuk çözeltisi

| Bileşen                             | 1x | 17x | 18x | 20x | 21x | 22x | 23x |
|-------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>Binding Buffer</b>               | 40 | 680 | 720 | 800 | 840 | 880 | 920 |
| <b>H2O</b>                          | 28 | 476 | 504 | 560 | 588 | 616 | 644 |
| <b>Streptavidin Sepharose Beads</b> | 2  | 34  | 36  | 40  | 42  | 44  | 46  |

- 96 well plate'ler 4 eşit parçaya kesildi ve kullanılacak kuyulara 70 uL olacak şekilde mastermix dağıtıldı ve üzerine 10 uL PCR ürünü eklendi.
- PCR plate'inin üstü seal ile kapatıldı, çalkalayıcıya koyuldu. Oda sıcaklığında 10 dakika 1400 rpm'de çalkalayarak inkübe edildi.
- Temiz bir ependorfa Tablo 14'te belirtilen annealing mix için mastermix hazırlandı.

**Tablo 14.** Pirosekanslama için hazırlanan “annealing mix”

| Bileşen                       | 1x   | 17x   | 18x | 20x | 21x   | 22x | 23x   |
|-------------------------------|------|-------|-----|-----|-------|-----|-------|
| <b>Annealing Buffer</b>       | 22,5 | 382,5 | 405 | 450 | 472,5 | 495 | 517,5 |
| <b>Pirosekanslama primeri</b> | 2,5  | 42,5  | 45  | 50  | 52,5  | 55  | 57,5  |

- Annealing mix, Q24 platelerinde son hacim 25 uL olacak şekilde dağıtıldı ve güvenli bir yerde beklemeye alındı.
- Bu esnada Pyromark Workstation hazırlıkları yapılarak sistem kullanılabilir hale getirildi, 1x Wash buffer, Denaturation Buffer, %70 EtOH ve distile su, uygun bölgelere yerleştirildi. Vakum çalıştırılarak akış hızı sabitlenene kadar ünite başlığı temiz su haznesinde tutuldu.

- İnkübasyon tamamlanınca iki plate de workstation'da uygun yerlere yerleştirildi.
- Temiz ünite başlığı önce PCR plate'inde 15 saniye kadar tutulatak tüm sıvı çekildi ve boncukların başlığa yapışması sağlandı.
- Başlık %70 EtOH kuyucuğuna getirildi, 10 saniye akış sağlandı.
- Ardından başlık Denaturation Solution içeren kuyucuğa yerleştirildi ve 10 saniye kadar akış yapıldı.
- Son olarak başlık Wash Buffer içeren kuyucuğa getirilerek 10 saniye kadar boncuklar yıkandı.
- El ünitesi ve vakum kapatıldı, el ünitesi Q24 plate'inin üzerine yerleştirildi. 5-10 saniye hafifçe çalkalanarak bead'lerin kuyucuklara girmesi sağlandı.
- Q24 plate'i 80 °C'de 2 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon esnasında el ünitesi önce kirli su kuyusunda 10 saniye, sonra da temiz su kuyusunda vakum açık olarak tutularak temizlendi. El başlığı docking station'a getirilerek vakumlar kapatıldı.
- İnkübasyon sonrası Q24 plate'i oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Pyromark cihazına yerleştirilecek kartuş, belirtilen miktarlarda enzim, substrat ve nükleotidlerin kuyucuklara pipetlenmesiyle hazırlandı. Hazırlanan kartuş cihaza dikkatlice yerleştirildi.
- İnkübasyonu tamamlanan Q24 plate'i cihaza yerleştirildi ve kapak kapatıldı. Run komutundan uygun program seçilerek başlatıldı.
- Program sonlandığında Q24 plate'i cihazdan çıkarıldı, kartuş ddH<sub>2</sub>O ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Flash bellek cihazdan çıkartılarak bilgisayara takıldı.

- Cihazın oluşturduğu analiz dosyası PyroMark yazılımıyla açıldı. Analyze All Wells komutuyla analiz tamamlandı. Oluşturulan pirogramlar çalışma raporları olarak kaydedildi.

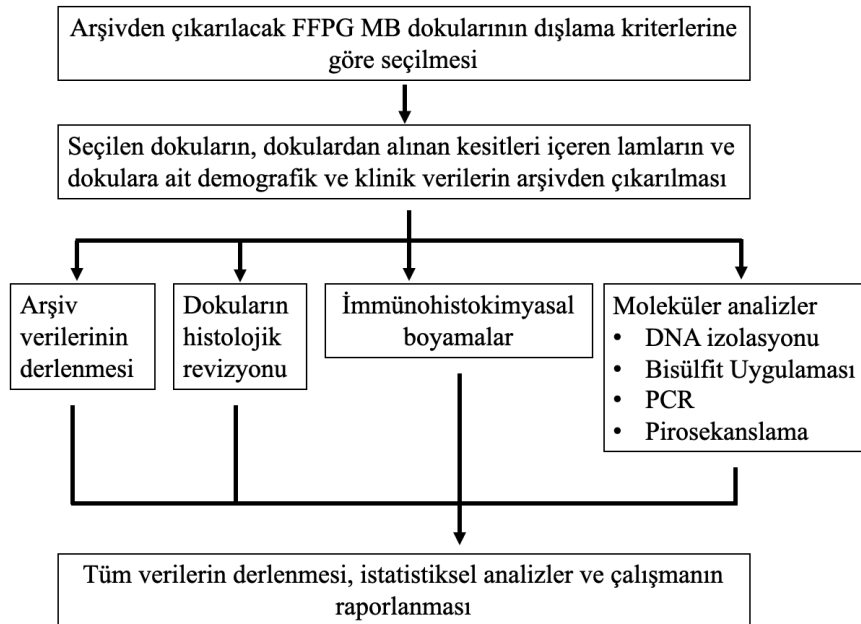
Analiz sonucunda kontrol gruplarında beklenen sonuçlar şu şekildedir:

- NTC: hiç peak olmamalı
- C1 (metillenmemiş kontrol): metilasyon yüzdesi %8'in altında olmalı
- C2 (metillenmiş kontrol): metilasyon maksimum seviyede olmalı
- C3 (bisüfit kontrol): C1 ile benzer olarak metilasyon yüzdesi %8'in altında olmalı

Belirtilen metod tüm örnekler için 9 primer çifti ile çalışıldı. Literatüre paralel olarak, ortalama metilasyon seviyesi %8'den fazla olan örneklerin bu gen için hipermetile olduğu belirtildi (83,84).

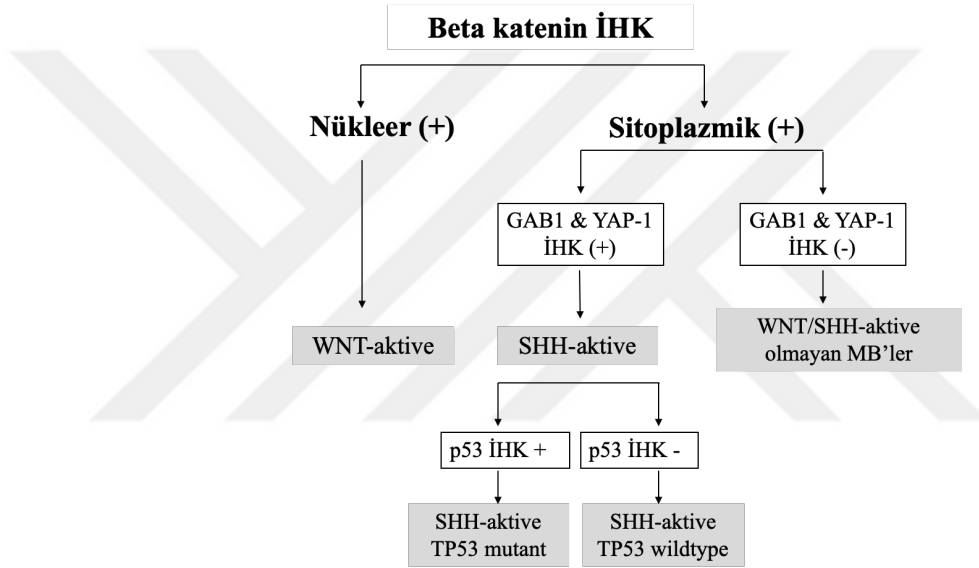
### 3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında yapılan çalışmalar ve uygulanan analizlerin bir akış şeması Şekil 5'te belirtildiği gibidir.



Şekil 5. Çalışmanın akış şeması

İHK inceleme sonuçları değerlendirilirken, Şekil 6’da verilen algoritma kullanıldı. Beta-katenin boyaması sonrası nükleer ekspresyon görülen dokular WNT-aktif MB’lar olarak sınıflandırıldı. Kalan sitoplazmik beta-katenin pozitivitesi gösteren dokular GAB1 ve YAP1 ile boyandı; artmış ekspresyon görülenler SHH-aktif MB’lar olarak sınıflandırılırken, diğer negatif dokular ise WNT/SHH-aktif olmayan MB’lar olarak sınıflandırıldı. SHH-aktif MB’lar p53 antikoru ile boyanarak, artmış nükleer ekspresyon (%50’den fazla) gözlenen dokular SHH-aktif *TP53* mutant alt grup olarak sınıflandırılırken düşük ya da negatif boyama görülenler SHH-aktif *TP53* mutant olmayan “wild-type” olarak sınıflandırıldı.



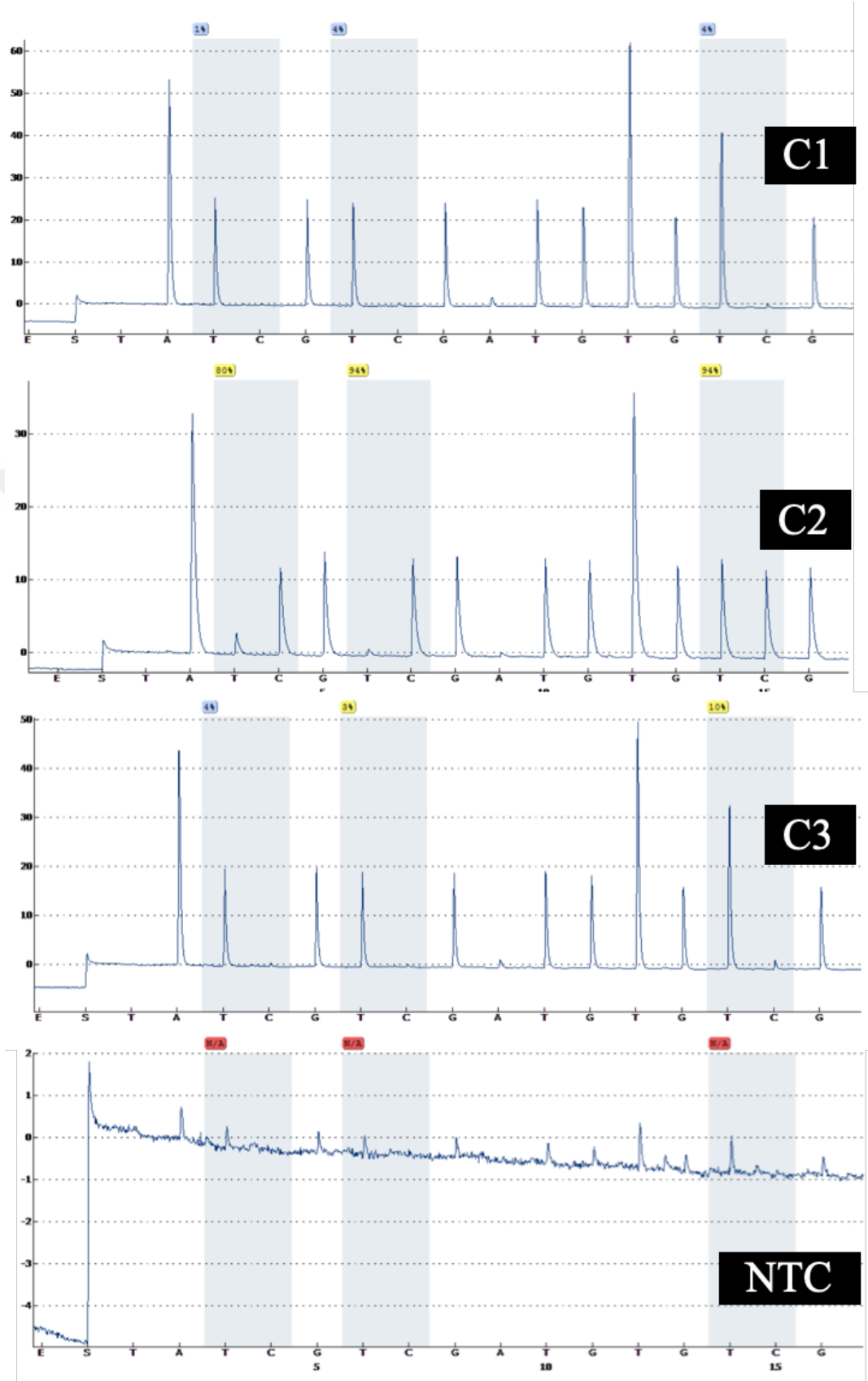
**Şekil 6.** İmmünohistokimyasal değerlendirme algoritması

PS analizinde, incelenen sekanstaki her CpG bölgesine ait metilasyon değerinin ortalaması alınarak, literatürde de belirtildiği şekilde %8 üzeri metilasyon görülmesi durumunda çalışılan genin hipermetile olduğu gösterildi (83,84).

PS analizinde kontrol grupları değerlendirilirken (Şekil 7) C1’de (metillenmemiş kontrol) %8 altında peak ortalaması beklenirken, C2’de (metillenmiş kontrol) maksimum seviyede metilasyon yüzdesi görülmesi beklendi. C3 kontrol grubunda (bisülfid uygulaması yapılan metillenmemiş kontrol), C1’e benzer şekilde peak ortalamasının %8 değerinin altında olması beklendi. NTC ismi verilen ve DNA içermeyen bu grupta ise hiçbir amplifikasyonun gerçekleşmemesi beklendi.

Pirogramda y ekseni peak yüksekliğini gösterirken, x ekseni analiz edilen DNA sekansını gösterecek şekilde düzenlendi. İncelenen sekansta analiz edilen CpG bölgeleri açık mavi bloklar ile gösterilip, bu bölgelerde sitozin/timin peak'lerinin oranına göre metilasyon değeri tanımlandı. Şekil 10'da örnek verilen pirogramda, analizlenen sekansta üç CpG incelenmiş olup, değerlendirmeler bu bölgelerde elde edilen yüzde metilasyon değerlerinin ortalaması alınarak yapıldı. Peak'ler üzerindeki yüzde değerleri belirtilirken, mavi ve sarı renk kodu ile belirtilen yüzde değerleri güvenilir kabul edilirken kırmızı renk kodlu peak veren örnekler çalışma dışı bırakıldı.





Şekil 7. Kontrol grupları için beklenen örnek pirogramlar

Her olgu için seçilen genlerdeki metilasyon durumu ile histolojik değişkenler ve moleküler alt grupların yanı sıra yaş, cinsiyet, metastaz varlığı (BOS'ta tümör hücresi) ve sağ kalım oranları arasındaki istatistiksel ilişki araştırıldı. Bu amaçlar ki-kare testleri IBM SPSS Statistics, (v.22, Armonk, NY, ABD) yazılımı kullanılarak uygulandı. İstatistiksel anlamlılık değeri  $p < 0.05$  olarak belirlendi. Tüm  $p$  değerleri two-sided olarak hesaplandı. Frekansların standart ki-kare testleri için çok düşük olduğu durumlarda Fisher's Exact Test uygulanarak  $p$  değerleri belirlendi.

### 3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez önerisi kapsamında, ek bir aşama olarak Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile *c-MYC* gen amplifikasyonlarının incelenmesi hedeflenmekteydi. Ancak yöntem dahilinde kullanılması planlanan prob için ihaleye çıkıldığında, istenilen fiyat aralığında ve özelliklerde prob teklifleridöviz kur artışı nedeniyle bütçenin üzerinde kaldı.

Ayrıca proje kapsamında metilasyon analizi için seçilen genlerden *COLIA2* geni için gereken kitlerin üretiminin durması sonucu, bu gen çalışmalara dahil edilemedi. Proje kabulünü takiben bu gen, çalışmadan çıkarılarak *EZH2* geni çalışmaya dahil edildi.

### 3.9. Etik Kurul Onayı

Bu tez çalışması etik açıdan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 09.11.2017 tarihinde 2017/26-23 karar numarası ile onaylanmıştır (EK-2).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Arşiv Verilerinin Derlenmesi ve Histolojik Revizyon

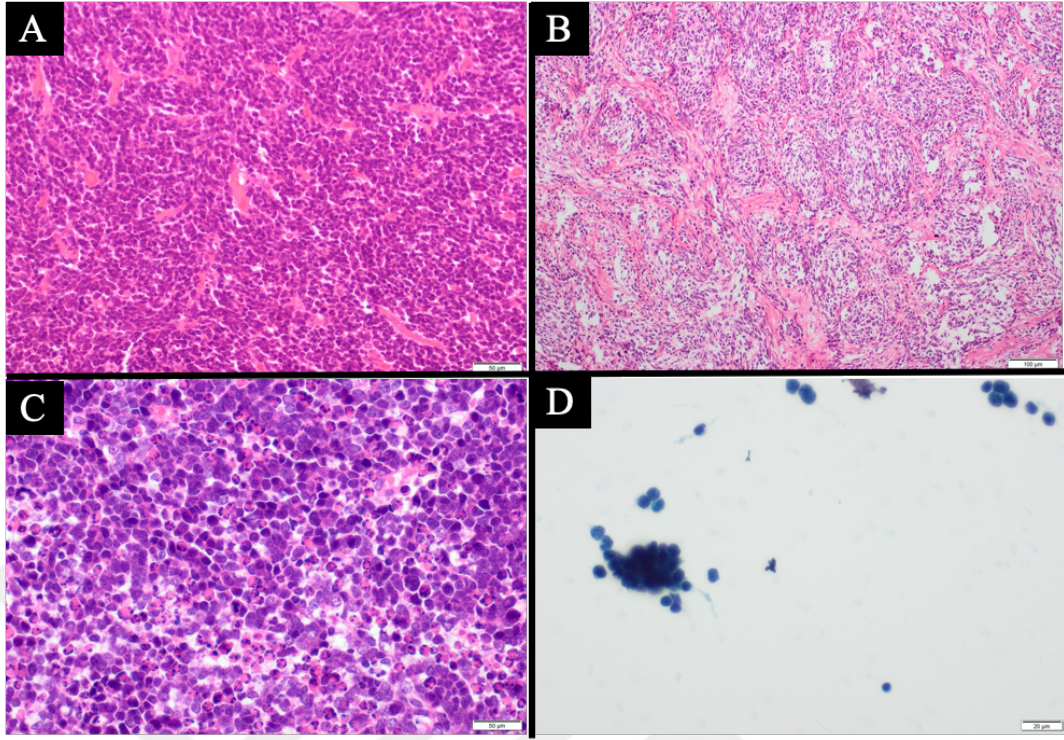
Çalışma kapsamında yeterli arşiv tümör dokusu bulunan 47 pediatrik MB olgusuna ait demografik (yaş, cinsiyet), histolojik ve klinik (nüks, eks, metastaz varlığı) veriler çıkarıldı. Arşivden çıkarılan hasta verileri, histolojik revizyonlar ve İHK sonuçlarıyla elde edilen moleküler alt gruplar her bir hasta için kaydedildi (Tablo 15).

**Tablo 15.** Çalışma vakalarının demografik, histolojik, klinik verileri ve moleküler alt grupları (N/A: mevcut değil)

| No | Yaş | Cinsiyet | Metastaz | Nüks/Eks | Histoloji | Moleküler Alt Grup         |
|----|-----|----------|----------|----------|-----------|----------------------------|
| 1  | 10  | Kadın    | N/A      | N/A      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 2  | 15  | Erkek    | yok      | yok      | D/N       | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 3  | 11  | Erkek    | yok      | N/A      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 4  | 2   | Erkek    | yok      | yok      | D/N       | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |
| 5  | 5   | Kadın    | var      | var      | LC/A      | SHH-aktif TP53 mutant      |
| 6  | 8   | Kadın    | var      | yok      | Klasik    | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |
| 7  | 8   | Erkek    | yok      | yok      | D/N       | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 8  | 3   | Erkek    | yok      | yok      | Klasik    | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |
| 9  | 14  | Erkek    | yok      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 10 | 10  | Erkek    | var      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 11 | 6   | Kadın    | yok      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 12 | 6   | Erkek    | yok      | yok      | LC/A      | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 13 | 8   | Kadın    | yok      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 14 | 2   | Kadın    | var      | var      | LC/A      | SHH-aktif TP53 mutant      |
| 15 | 13  | Erkek    | var      | yok      | LC/A      | SHH-aktif TP53 mutant      |
| 16 | 17  | Kadın    | var      | yok      | Klasik    | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |
| 17 | 2   | Kadın    | yok      | yok      | D/N       | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 18 | 5   | Erkek    | yok      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 19 | 2   | Erkek    | var      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 20 | 14  | Erkek    | yok      | yok      | Klasik    | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |
| 21 | 13  | Kadın    | yok      | yok      | Klasik    | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |
| 22 | 4   | Erkek    | yok      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 23 | 2   | Erkek    | yok      | var      | LC/A      | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 24 | 17  | Erkek    | var      | yok      | Klasik    | WNT/SHH-olmayan MB         |
| 25 | 4   | Erkek    | yok      | yok      | LC/A      | SHH-aktif TP53 yabanıl tip |

|    |     |       |     |     |        |                             |
|----|-----|-------|-----|-----|--------|-----------------------------|
| 26 | 15  | Kadın | yok | var | LC/A   | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 27 | 4   | Erkek | var | N/A | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 28 | 2   | Erkek | var | yok | D/N    | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 29 | 7   | Erkek | yok | yok | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 30 | 3   | Kadın | var | yok | LC/A   | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 31 | 5   | Erkek | yok | yok | Klasik | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 32 | 9   | Erkek | var | yok | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 33 | 3   | Kadın | var | var | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 34 | 8   | Erkek | yok | yok | Klasik | WNT-aktive                  |
| 35 | 4   | Erkek | yok | N/A | Klasik | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 36 | 2   | Erkek | yok | yok | Klasik | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 37 | 1   | Erkek | yok | N/A | Klasik | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 38 | 7   | Kadın | yok | yok | Klasik | WNT-aktive                  |
| 39 | 15  | Erkek | var | var | D/N    | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 40 | 6   | Kadın | yok | var | LC/A   | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 41 | 12  | Kadın | yok | yok | D/N    | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 42 | 4   | Erkek | var | var | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 43 | 6   | Erkek | var | N/A | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 44 | 6   | Erkek | var | var | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |
| 45 | 1,5 | Erkek | yok | yok | D/N    | SHH-aktive TP53 yabancı tip |
| 46 | 3   | Kadın | yok | N/A | D/N    | WNT-aktive                  |
| 47 | 14  | Erkek | N/A | N/A | Klasik | WNT/SHH-olmayan MB          |

Çalışmaya dahil edilen vakaların ortalama yaşı  $7,2 \pm 4,7$  ve 1-17 aralığındaydı. Tüm hastaların %65,9'u (n: 31) erkek, %34,1'i (n: 16) ise kadındı. Hastaların 2 tanesinde BOS'ta hücre tutulumuna dair veri bulunamadı; kalan 45 hastanın 17'sinde (%37,8) metastaz tespit edilirken, 28 hastada (%62,2) metastaz görülmedi. Klinikte takibi yapılan ve verilerine ulaşılabilen 39 hastadan dokuzunda (%23,1) nüks görüldüğü ve bu hastalardan sekizinin MB sebebiyle eks olduğu belirlendi. Tümörlerin histolojik dağılımına bakıldığında 29 klasik histoloji (%61,8), 9 D/N histoloji (%19,1) ve 9 LC/A histoloji (%19,1) tespit edildi (Şekil 8).

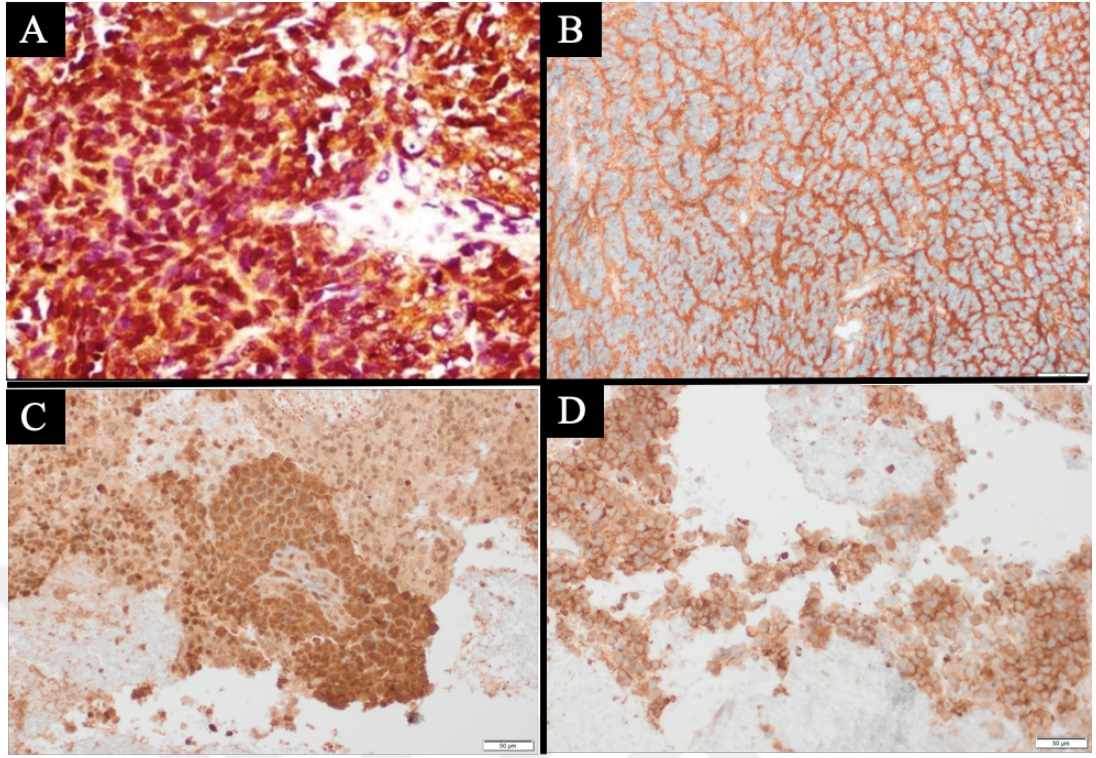


**Şekil 8.** Medulloblastomlarda mikroskopik özellikler A) Klasik tümör histolojisi B) Desmoplastik/Nodüler histoloji C) Büyük hücreli/anaplastik histoloji D) BOS'ta tümör hücresi varlığı (metastatik hastalık)

#### 4.2. İmmünohistokimya ile Moleküler Alt Sınıflandırma

Tüm dokular İHK ile boyanarak moleküler alt sınıflandırma şu şekilde yapıldı:

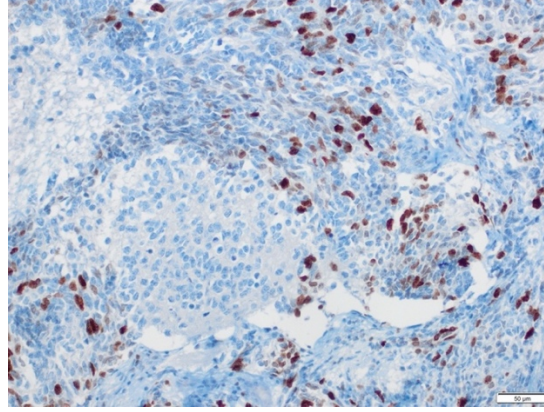
- WNT-aktif MB'lar: nükleer beta-katenin ekspresyonu gösteren dokular (Şekil 9.A)
- SHH-aktif MB'lar: sitoplazmik beta-katenin ekspresyonu (Şekil 9.B), YAP-1 nükleer boyanması (Şekil 9.C) ve GAB1 sitoplazmik boyanması (Şekil 9.D) gösterenler
- WNT/SHH-olmayan MB'lar: beta-katenin, YAP-1 ve GAB1 negatif olan dokular.



**Şekil 9.** Medulloblastomlarda beta-katenin, YAP1 ve GAB1 immünohistokimyası. **A)** WNT-aktif MB'larda görülen nükleer beta-katenin ekspresyonu **B)** WNT-aktif olmayan MB'larda sitoplazmik beta-katenin ekspresyonu **C)** WNT-aktif ve SHH-aktif MB'larda görülen YAP-1 nükleer ekspresyonu **D)** SHH-aktif MB'larda görülen sitoplazmik GAB1 ekspresyonu.

SHH-aktif MB'lar, *TP53* mutasyon durumuna göre değerlendirilmiş olup

- SHH-aktif *TP53*-mutant MB'lar: nükleer p53 ekspresyonu (Şekil 10) gösteren dokular ve
- SHH-aktif *TP53*-mutant olmayan MB'lar: p53 ekspresyonu gözlemlenmeyen dokular olarak sınıflandırıldı.



**Şekil 10.** SHH-aktif *TP53*-mutant medulloblastom

IHK sonuçları, üç olgunun WNT-aktif MB (%6,4) grubunda, 17 olgunun SHH-aktif MB (%36,2) grubunda, kalan 27 olgunun ise WNT/SHH-olmayan MB'lar (%57,4) olduğunu gösterdi. SHH-aktif MB'ların 3 tanesi SHH-aktif *TP53* mutant grupta iken 14 tanesinin SHH-aktif *TP53* mutant olmayan grupta olduğu belirlendi. Demografik, klinik ve histolojik verilerin alt gruplara göre dağılımları Tablo 16'da gösterildiği gibidir.

**Tablo 16.** Çalışma vakalarının moleküler alt gruplara göre klinik, histolojik ve onkolojik özellikleri

| Moleküler Alt Grup  | WNT-aktif MB (n=3)                  | SHH-aktif <i>TP53</i> wildtype MB (n=14)              | SHH-aktif <i>TP53</i> mutant MB (n=3) | WNT/SHH olmayan MB (n=27)                               |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Yaş                 | 6.0±7.8                             | 9.0±5.4                                               | 6.6±5.6                               | 7.3±4.1                                                 |
| Cinsiyet            | Erkek: 3 (%100)                     | Erkek: 9 (%64.3)<br>Kadın: 5 (%35.7)                  | Erkek: 1 (%33.3)<br>Kadın: 2 (%66.7)  | Erkek: 18 (%66.7)<br>Kadın: 9 (%33.3)                   |
| Histolojik Alt Grup | Klasik: 2 (%66.7)<br>D/N: 1 (%33.3) | Klasik: 9 (%64.2)<br>D/N: 4 (%28.5)<br>LC/A: 1 (%7.1) | LC/A: 3 (%100.0)                      | Klasik: 18 (%66.6)<br>LC/A: 5 (%18.5)<br>D/N: 4 (%14.8) |
| Metastaz varlığı    | Yok: 3                              | Yok: 11<br>Var: 3                                     | Var: 3                                | Yok: 14<br>Var: 11<br>Bilinmiyor: 2                     |
| Olaysız sağkalım    | Var: 2 (%100)<br>Bilinmiyor: 1      | Var: 12 (%100)<br>Bilinmiyor: 2                       | Yok: 2 (%66.7)<br>Var: 1 (%33.3)      | Var: 17 (%70.9)<br>Yok: 7 (%29.1)<br>Bilinmiyor: 3      |

### 4.3. Pirosekanslama ile DNA Metilasyon Analizi Bulguları

#### 4.3.1. DNA Konsantrasyon ve Safılıkları

Dokulardan belirtilen şekilde izole edilen DNA'lara ait konsantrasyon değerleri, 260/280 ve 260/230 oranları Tablo 17'de verilmiştir.

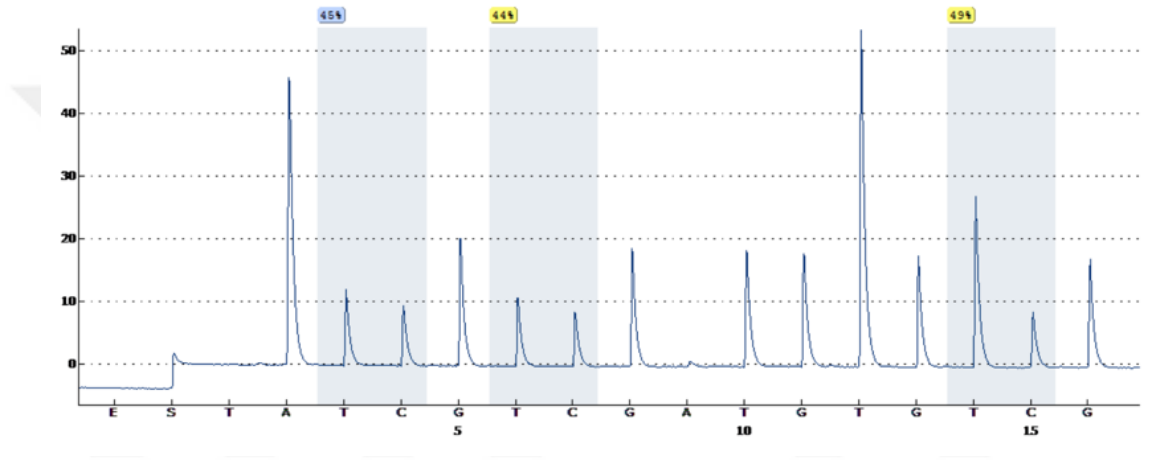
**Tablo 17.** Çalışmada izole edilen DNA'ların konsantrasyonları (ng/uL)

| No | ng/uL  | 260/280 | 260/230 | No | ng/uL | 260/280 | 260/230 |
|----|--------|---------|---------|----|-------|---------|---------|
| 1  | 327,3  | 1,878   | 2,182   | 25 | 402,6 | 1,998   | 2,001   |
| 2  | 434,7  | 1,965   | 2,468   | 26 | 782,3 | 1,969   | 2,344   |
| 3  | 223,2  | 2,007   | 2,502   | 27 | 956,7 | 1,985   | 2,366   |
| 4  | 240,8  | 1,855   | 2,718   | 28 | 899,1 | 1,972   | 2,381   |
| 5  | 58,70  | 1,834   | 7,623   | 29 | 676,6 | 1,941   | 2,564   |
| 6  | 434,0  | 1,594   | 2,290   | 30 | 282,8 | 1,990   | 2,704   |
| 7  | 360,4  | 1,977   | 2,527   | 31 | 70,70 | 1,911   | 3,950   |
| 8  | 224,2  | 1,862   | 2,256   | 32 | 962,8 | 1,979   | 2,504   |
| 9  | 246,2  | 1,957   | 3,291   | 33 | 258,7 | 1,993   | 2,987   |
| 10 | 575,2  | 1,931   | 2,609   | 34 | 493,4 | 1,987   | 2,609   |
| 11 | 163,2  | 1,712   | 2,863   | 35 | 204,9 | 1,976   | 3,426   |
| 12 | 368,2  | 1,918   | 2,813   | 36 | 421,3 | 1,897   | 2,694   |
| 13 | 1035,0 | 1,878   | 2,350   | 37 | 17,8  | 1,521   | -0,7417 |
| 14 | 257,4  | 1,465   | 1,770   | 38 | 427,5 | 1,959   | 2,928   |
| 15 | 1132,0 | 1,958   | 2,522   | 39 | 878,8 | 1,927   | 2,619   |
| 16 | 451,4  | 1,798   | 1,978   | 40 | 642,1 | 1,966   | 2,383   |
| 17 | 703,6  | 1,965   | 2,367   | 41 | 252,0 | 1,984   | 2,485   |
| 18 | 316,2  | 1,789   | 2,506   | 42 | 463,3 | 1,919   | 2,467   |
| 19 | 112,9  | 1,854   | 3,096   | 43 | 445,0 | 1,935   | 2,259   |
| 20 | 83,50  | 1,868   | 4,744   | 44 | 300,2 | 1,901   | 2,423   |
| 21 | 528,7  | 1,911   | 2,645   | 45 | 325,9 | 1,920   | 2,548   |
| 22 | 126,0  | 1,664   | 3,739   | 46 | 86,4  | 1,930   | 3,520   |
| 23 | 111,0  | 1,968   | 6,133   | 47 | 234,6 | 1,890   | 2,330   |
| 24 | 657,7  | 1,967   | 2,539   |    |       |         |         |

### 4.3.2. Pirosekanslama Sonuçları

#### 4.3.2.1. *SPINT2* Sonuçları

47 örnek ve 4 kontrol grubuyla yapılan *SPINT2* metilasyon analizinde 43 örnekten istenilen aralıkta peak'ler elde edilebildi (Şekil 11). Çalışan 43 örnekten 6 tanesinde *SPINT2* hipermetilasyonu gözlemlendi (Tablo 18). Bunlardan 5 tanesinin WNT-SHH-olmayan medulloblastomlardan olduğu ve tüm 6 hastada da arşiv verilerinden metastaz varlığı tespit edildi ( $p=0.001$ ).



Şekil 11. *SPINT2* hipermetilasyon analizi pirogram örneği

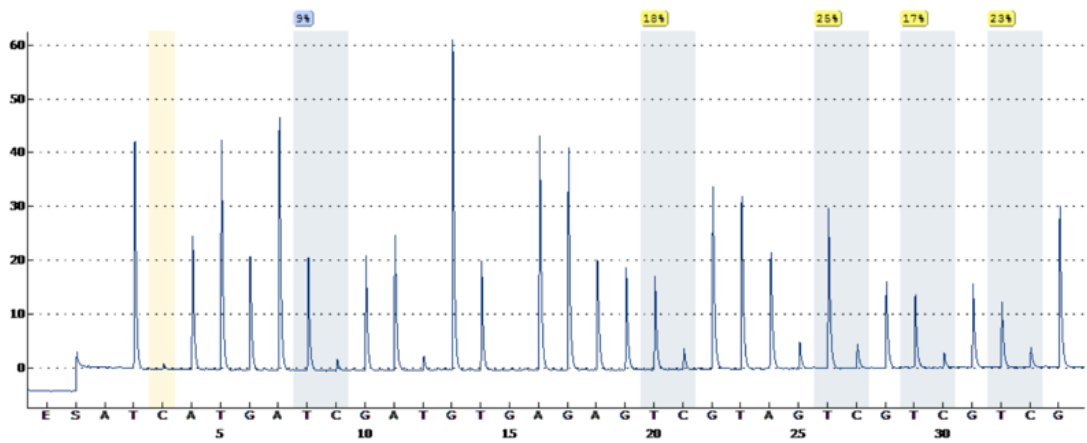
Tablo 18. *SPINT2* geninde analiz edilen üç CpG bölgesindeki metilasyon oranları

| no | 1 | 2 | 3  | Ortalama | SD   | no | 1  | 2  | 3  | Ortalama | SD   |
|----|---|---|----|----------|------|----|----|----|----|----------|------|
| 1  | 4 | 3 | 4  | 3,7      | 0,58 | 27 | 45 | 44 | 49 | 46,0     | 2,65 |
| 2  | 3 | 2 | 6  | 3,7      | 2,08 | 28 | 6  | 5  | 11 | 7,3      | 3,21 |
| 3  | 2 | 2 | 3  | 2,3      | 0,58 | 29 | 3  | 3  | 6  | 4,0      | 1,73 |
| 4  | 0 | 0 | 9  | 3,0      | 5,20 | 30 | 5  | 5  | 8  | 6,0      | 1,73 |
| 5  | - | - | -  | -        | -    | 31 | 3  | 3  | 8  | 4,7      | 2,89 |
| 6  | 3 | 2 | 8  | 4,3      | 3,21 | 32 | 4  | 3  | 7  | 4,7      | 2,08 |
| 7  | 3 | 2 | 5  | 3,3      | 1,53 | 33 | 22 | 17 | 28 | 22,3     | 5,51 |
| 8  | 2 | 2 | 4  | 2,7      | 1,15 | 34 | 4  | 3  | 8  | 5,0      | 2,65 |
| 9  | 2 | 2 | 4  | 2,7      | 1,15 | 35 | 4  | 3  | 7  | 4,7      | 2,08 |
| 10 | 2 | 2 | 5  | 3,0      | 1,73 | 36 | 4  | 3  | 6  | 4,3      | 1,53 |
| 11 | 1 | 0 | 12 | 4,3      | 6,66 | 37 | 12 | 2  | 9  | 7,7      | 5,13 |

|    |    |   |    |      |      |     |    |    |    |      |      |
|----|----|---|----|------|------|-----|----|----|----|------|------|
| 12 | 4  | 2 | 7  | 4,3  | 2,52 | 38  | 3  | 3  | 7  | 4,3  | 2,31 |
| 13 | -  | - | -  | -    | -    | 39  | 4  | 3  | 8  | 5,0  | 2,65 |
| 14 | 13 | 2 | 16 | 10,3 | 7,37 | 40  | 4  | 2  | 8  | 4,7  | 3,06 |
| 15 | 4  | 3 | 8  | 5,0  | 2,65 | 41  | 5  | 3  | 11 | 6,3  | 4,16 |
| 16 | 2  | 2 | 7  | 3,7  | 2,89 | 42  | 5  | 5  | 14 | 8,0  | 5,20 |
| 17 | 4  | 3 | 7  | 4,7  | 2,08 | 43  | 3  | 4  | 8  | 5,0  | 2,65 |
| 18 | -  | - | -  | -    | -    | 44  | 7  | 6  | 16 | 9,7  | 5,51 |
| 19 | 6  | 6 | 12 | 8,0  | 3,46 | 45  | 2  | 3  | 7  | 4,0  | 2,65 |
| 20 | 0  | 0 | 8  | 2,7  | 4,62 | 46  | 3  | 2  | 6  | 3,7  | 2,08 |
| 21 | 3  | 2 | 9  | 4,7  | 3,79 | 47  | 3  | 3  | 7  | 4,3  | 2,31 |
| 22 | -  | - | -  | -    | -    | C1  | 1  | 4  | 4  | 3,0  | 1,73 |
| 23 | 8  | 1 | 6  | 5,0  | 3,61 | C2  | 80 | 94 | 94 | 89,3 | 8,08 |
| 24 | 2  | 2 | 7  | 3,7  | 2,89 | C3  | 4  | 3  | 10 | 5,7  | 3,79 |
| 25 | 3  | 3 | 8  | 4,7  | 2,89 | NTC | -  | -  | -  | -    | -    |
| 26 | 4  | 3 | 7  | 4,7  | 2,08 |     |    |    |    |      |      |

#### 4.3.2.2. KLF4 Sonuçları

*KLF4* hipermetilasyonunun değerlendirilmesinde 45 örnekte istenilen aralıkta peak'ler elde edilebildi (Şekil 12) ve bu 45 örnekten 4 tanesinde hipermetilasyon tespit edildi (Tablo 19). *KLF4* hipermetilasyonu görülen tüm örneklerin SHH-aktive medulloblastomlar olduğu belirlendi.



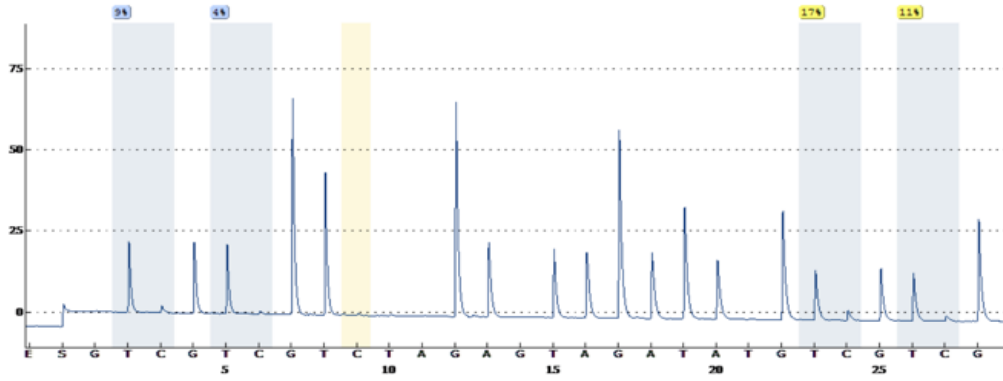
Şekil 12. *KLF4* hipermetilasyon analizi pirogram örneği

**Tablo 19.** *KLF4* geninde analiz edilen beş CpG bölgesindeki metilasyon oranları

| no | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | Ort. | SD   | no  | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | Ort. | SD   |
|----|----|----|----|----|----|------|------|-----|----|----|----|----|----|------|------|
| 1  | 3  | 2  | 5  | 2  | 2  | 2,8  | 1,30 | 27  | 7  | 4  | 13 | 4  | 3  | 6,2  | 4,09 |
| 2  | 3  | 3  | 8  | 2  | 3  | 3,8  | 2,39 | 28  | 5  | 4  | 13 | 4  | 4  | 6,0  | 3,94 |
| 3  | 5  | 3  | 9  | 2  | 2  | 4,2  | 2,95 | 29  | 5  | 3  | 9  | 3  | 2  | 4,4  | 2,79 |
| 4  | 3  | 0  | 7  | 0  | 4  | 2,8  | 2,95 | 30  | 5  | 4  | 11 | 2  | 3  | 5,0  | 3,54 |
| 5  | 0  | 2  | 8  | 5  | 0  | 3,0  | 3,46 | 31  | 29 | 29 | 36 | 28 | 29 | 30,2 | 3,27 |
| 6  | 9  | 18 | 25 | 17 | 23 | 18,4 | 6,23 | 32  | 5  | 3  | 11 | 3  | 4  | 5,2  | 3,35 |
| 7  | 4  | 2  | 7  | 1  | 2  | 3,2  | 2,39 | 33  | 7  | 7  | 12 | 4  | 3  | 6,6  | 3,51 |
| 8  | 6  | 14 | 16 | 9  | 17 | 12,4 | 4,72 | 34  | 6  | 4  | 11 | 3  | 3  | 5,4  | 3,36 |
| 9  | 2  | 2  | 5  | 0  | 0  | 1,8  | 2,05 | 35  | 6  | 3  | 13 | 2  | 3  | 5,4  | 4,51 |
| 10 | 4  | 2  | 7  | 2  | 3  | 3,6  | 2,07 | 36  | 8  | 5  | 14 | 5  | 5  | 7,4  | 3,91 |
| 11 | 7  | 4  | 10 | 0  | 3  | 4,8  | 3,83 | 37  | 7  | 3  | 11 | 3  | 2  | 5,2  | 3,77 |
| 12 | 6  | 3  | 12 | 2  | 3  | 5,2  | 4,09 | 38  | 6  | 3  | 10 | 3  | 3  | 5,0  | 3,08 |
| 13 | -  | -  | -  | -  | -  | -    | -    | 39  | 5  | 3  | 9  | 2  | 2  | 4,2  | 2,95 |
| 14 | 37 | 39 | 46 | 38 | 41 | 40,2 | 3,56 | 40  | -  | -  | -  | -  | -  | -    | -    |
| 15 | 5  | 3  | 11 | 3  | 3  | 5,0  | 3,46 | 41  | 6  | 3  | 11 | 3  | 4  | 5,4  | 3,36 |
| 16 | 4  | 4  | 9  | 1  | 4  | 4,4  | 2,88 | 42  | 7  | 5  | 11 | 4  | 5  | 6,4  | 2,79 |
| 17 | 5  | 3  | 11 | 3  | 4  | 5,2  | 3,35 | 43  | 5  | 3  | 10 | 2  | 2  | 4,4  | 3,36 |
| 18 | 7  | 3  | 10 | 3  | 3  | 5,2  | 3,19 | 44  | 7  | 2  | 9  | 2  | 3  | 4,6  | 3,21 |
| 19 | 5  | 3  | 9  | 2  | 3  | 4,4  | 2,79 | 45  | 7  | 4  | 12 | 4  | 4  | 6,2  | 3,49 |
| 20 | 5  | 3  | 6  | 3  | 4  | 4,2  | 1,30 | 46  | 6  | 8  | 10 | 4  | 9  | 7,4  | 2,41 |
| 21 | 4  | 3  | 9  | 3  | 3  | 4,4  | 2,61 | 47  | 5  | 3  | 11 | 3  | 4  | 5,2  | 3,35 |
| 22 | 2  | 1  | 6  | 3  | 1  | 2,6  | 2,07 | C1  | 3  | 2  | 6  | 2  | 2  | 3,0  | 1,73 |
| 23 | 6  | 3  | 10 | 2  | 2  | 4,6  | 3,44 | C2  | 77 | 91 | 87 | 88 | 94 | 87,4 | 6,43 |
| 24 | 4  | 3  | 7  | 2  | 3  | 3,8  | 1,92 | C3  | 6  | 2  | 8  | 2  | 0  | 3,6  | 3,29 |
| 25 | 4  | 5  | 10 | 6  | 6  | 6,2  | 2,28 | NTC | -  | -  | -  | -  | -  | -    | -    |
| 26 | 5  | 3  | 10 | 3  | 3  | 4,8  | 3,03 |     |    |    |    |    |    |      |      |

#### 4.3.2.3. *ZIC2* Sonuçları

Çalışmada 38 örnekte istenilen düzeyde sinyal elde edildi (Şekil 13) ve üç örnekte hipermetilasyon tespit edildi (Tablo 20). Hipermetilasyon görülen hastaların tamamının SHH-aktive p53 wildtype medulloblastomlar olduğu görüldü.



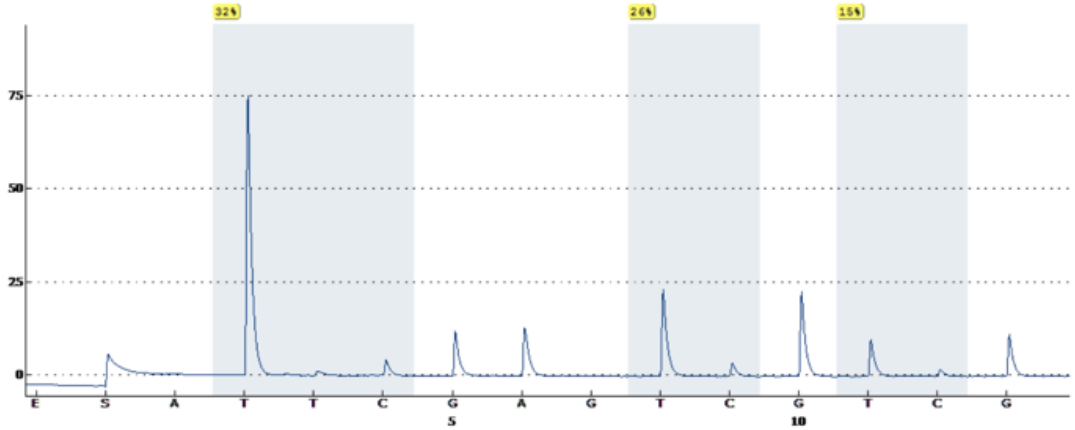
Şekil 13. ZIC2 hipermetilasyon analizi pirogram örneği

Tablo 20. ZIC2 geninde analiz edilen dört CpG bölgesindeki metilasyon oranları

| no | 1 | 2 | 3  | 4 | ort. | SD    | no  | 1  | 2  | 3  | 4  | ort.  | SD    |
|----|---|---|----|---|------|-------|-----|----|----|----|----|-------|-------|
| 1  | 3 | 2 | 10 | 2 | 4,25 | 3,86  | 27  | 5  | 4  | 12 | 4  | 6,25  | 3,86  |
| 2  | 3 | 2 | 7  | 3 | 3,75 | 2,22  | 28  | 4  | 3  | 13 | 5  | 6,25  | 4,57  |
| 3  | 3 | 2 | 6  | 8 | 4,75 | 2,75  | 29  | 4  | 3  | 12 | 3  | 5,5   | 4,36  |
| 4  | 4 | 0 | 6  | 8 | 4,5  | 3,42  | 30  | -  | -  | -  | -  | -     | -     |
| 5  | 3 | 3 | 5  | 4 | 3,75 | 0,96  | 31  | 5  | 4  | 15 | 5  | 7,25  | 5,19  |
| 6  | 3 | 3 | 10 | 2 | 4,5  | 3,70  | 32  | -  | -  | -  | -  | -     | -     |
| 7  | 3 | 3 | 10 | 3 | 4,75 | 3,50  | 33  | 2  | 9  | 14 | 2  | 6,75  | 5,85  |
| 8  | 4 | 4 | 7  | 4 | 4,75 | 1,50  | 34  | 4  | 3  | 10 | 3  | 5     | 3,37  |
| 9  | 3 | 2 | 8  | 4 | 4,25 | 2,63  | 35  | 9  | 4  | 17 | 11 | 10,25 | 5,38  |
| 10 | 4 | 3 | 8  | 5 | 5    | 2,16  | 36  | 9  | 5  | 8  | 11 | 8,25  | 2,50  |
| 11 | 2 | 0 | 3  | 2 | 1,75 | 1,26  | 37  | 4  | 4  | 13 | 0  | 5,25  | 5,50  |
| 12 | 9 | 5 | 7  | 3 | 6    | 2,58  | 38  | 4  | 4  | 14 | 5  | 6,75  | 4,86  |
| 13 | - | - | -  | - | -    | -     | 39  | 4  | 2  | 10 | 3  | 4,75  | 3,59  |
| 14 | - | - | -  | - | -    | -     | 40  | 5  | 5  | 11 | 5  | 6,5   | 3,00  |
| 15 | 4 | 3 | 12 | 3 | 5,5  | 4,36  | 41  | 5  | 2  | 4  | 4  | 3,75  | 1,26  |
| 16 | 3 | 2 | 23 | 4 | 8    | 10,03 | 42  | -  | -  | -  | -  | -     | -     |
| 17 | 3 | 3 | 13 | 4 | 5,75 | 4,86  | 43  | -  | -  | -  | -  | -     | -     |
| 18 | - | - | -  | - | -    | -     | 44  | -  | -  | -  | -  | -     | -     |
| 19 | 3 | 1 | 13 | 4 | 5,25 | 5,32  | 45  | 3  | 2  | 35 | 2  | 10,5  | 16,34 |
| 20 | 7 | 0 | 14 | 0 | 5,25 | 6,70  | 46  | 3  | 2  | 12 | 3  | 5     | 4,69  |
| 21 | 6 | 3 | 17 | 5 | 7,75 | 6,29  | 47  | 4  | 4  | 9  | 3  | 5     | 2,71  |
| 22 | - | - | -  | - | -    | -     | C1  | 2  | 2  | 8  | 3  | 3,75  | 2,87  |
| 23 | 2 | 3 | 4  | 6 | 3,75 | 1,71  | C2  | 94 | 97 | 93 | 90 | 93,5  | 2,89  |
| 24 | 3 | 3 | 11 | 3 | 5    | 4,00  | C3  | 4  | 1  | 7  | 0  | 3     | 3,16  |
| 25 | 3 | 2 | 7  | 5 | 4,25 | 2,22  | NTC | -  | -  | -  | -  | -     | -     |
| 26 | 3 | 3 | 11 | 3 | 5    | 4,00  |     |    |    |    |    |       |       |

#### 4.3.2.4. PTCH1 Sonuçları

PS analizi sonucunda yalnızca 32 örnekte istenilen düzeyde sinyal alındı (Şekil 14), bu örneklerden 11 tanesi hipermetile olarak tanımlandı (Tablo 21). SHH-aktive MB'larda bu genin hipermetilasyonunun anlamlı olarak gözlemlendiği belirlendi ( $p=0.002$ ).



Şekil 14. PTCH1 hipermetilasyon analizi pirogram örneği

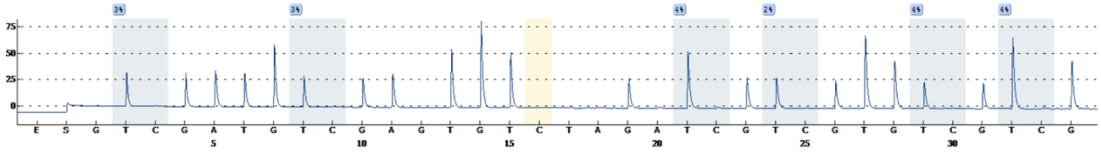
Tablo 21. PTCH1 geninde analiz edilen üç CpG bölgesindeki metilasyon oranları

| no | 1  | 2  | 3  | Ort  | SD   | no | 1  | 2  | 3  | Ort  | SD   |
|----|----|----|----|------|------|----|----|----|----|------|------|
| 1  | 8  | 3  | 2  | 4,3  | 3,21 | 27 | 26 | 16 | 9  | 17,0 | 8,54 |
| 2  | 7  | 3  | 2  | 4,0  | 2,65 | 28 | 37 | 36 | 20 | 31,0 | 9,54 |
| 3  | 12 | 5  | 4  | 7,0  | 4,36 | 29 | 8  | 5  | 3  | 5,3  | 2,52 |
| 4  | 7  | 4  | 4  | 5,0  | 1,73 | 30 | -  | -  | -  | -    | -    |
| 5  | -  | -  | -  | -    | -    | 31 | -  | -  | -  | -    | -    |
| 6  | -  | -  | -  | -    | -    | 32 | -  | -  | -  | -    | -    |
| 7  | 10 | 4  | 3  | 5,7  | 3,79 | 33 | 13 | 6  | 3  | 7,3  | 5,13 |
| 8  | 11 | 9  | 4  | 8,0  | 3,61 | 34 | 10 | 5  | 3  | 6,0  | 3,61 |
| 9  | 5  | 3  | 1  | 3,0  | 2,00 | 35 | 11 | 6  | 3  | 6,7  | 4,04 |
| 10 | 7  | 4  | 3  | 4,7  | 2,08 | 36 | 13 | 8  | 0  | 7,0  | 6,56 |
| 11 | 6  | 5  | 3  | 4,7  | 1,53 | 37 | 17 | 8  | 0  | 8,3  | 8,50 |
| 12 | 12 | 8  | 3  | 7,7  | 4,51 | 38 | 10 | 4  | 3  | 5,7  | 3,79 |
| 13 | -  | -  | -  | -    | -    | 39 | 10 | 5  | 3  | 6,0  | 3,61 |
| 14 | -  | -  | -  | -    | -    | 40 | 9  | 5  | 3  | 5,7  | 3,06 |
| 15 | 10 | 5  | 3  | 6,0  | 3,61 | 41 | 17 | 12 | 6  | 11,7 | 5,51 |
| 16 | 32 | 26 | 15 | 24,3 | 8,62 | 42 | -  | -  | -  | -    | -    |
| 17 | 10 | 4  | 3  | 5,7  | 3,79 | 43 | 9  | 3  | 3  | 5,0  | 3,46 |

|    |    |    |    |      |       |     |    |    |    |      |      |
|----|----|----|----|------|-------|-----|----|----|----|------|------|
| 18 | -  | -  | -  | -    | -     | 44  | 12 | 10 | 5  | 9,0  | 3,61 |
| 19 | 12 | 5  | 3  | 6,7  | 4,73  | 45  | 13 | 7  | 4  | 8,0  | 4,58 |
| 20 | 50 | 50 | 29 | 43,0 | 12,12 | 46  | 9  | 5  | 3  | 5,7  | 3,06 |
| 21 | 17 | 12 | 9  | 12,7 | 4,04  | 47  | 12 | 5  | 3  | 6,7  | 4,73 |
| 22 | -  | -  | -  | -    | -     | C1  | 6  | 3  | 2  | 3,7  | 2,08 |
| 23 | 12 | 4  | 3  | 6,3  | 4,93  | C2  | 97 | 85 | 89 | 90,3 | 6,11 |
| 24 | -  | -  | -  | -    | -     | C3  | 8  | 5  | 0  | 4,3  | 4,04 |
| 25 | 29 | 26 | 15 | 23,3 | 7,37  | NTC | -  | -  | -  | -    | -    |
| 26 | 10 | 5  | 3  | 6,0  | 3,61  |     |    |    |    |      |      |

#### 4.3.2.5. EZH2 Sonuçları

Bu gende yapılan analizler sonucu, 47 örneğin 40 tanesinden uygun düzeyde sinyal alındı (Şekil 15). Kırk örneğin hiçbirinde metilasyon paterni gözlemlenmedi (Tablo 22).



Şekil 15. EZH2 hipermetilasyon analizi pirogram örneği

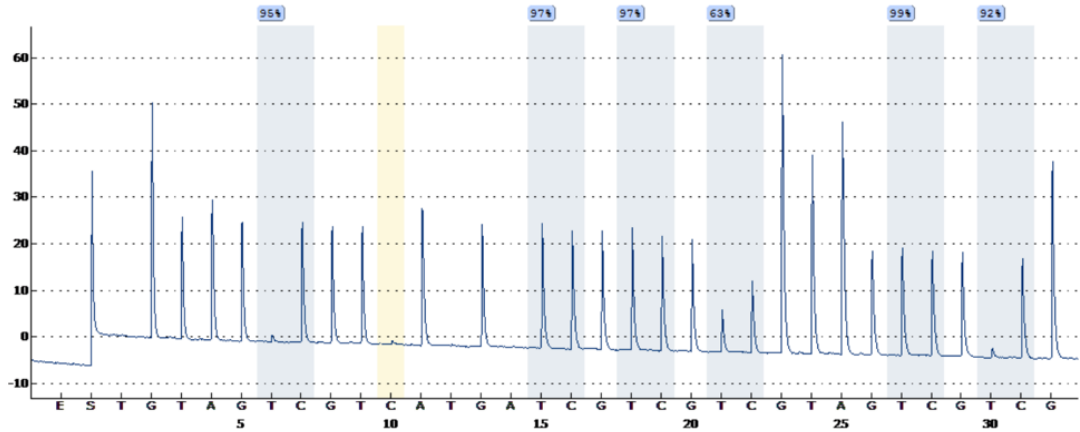
Tablo 22. EZH2 geninde analiz edilen altı CpG bölgesindeki metilasyon oranları

| no | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Ort | SD   | no | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Ort | SD   |
|----|---|---|---|---|---|---|-----|------|----|---|---|---|---|---|---|-----|------|
| 1  | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 2,8 | 0,75 | 27 | 4 | 4 | 6 | 3 | 4 | 6 | 4,5 | 1,22 |
| 2  | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3,3 | 0,82 | 28 | 3 | 4 | 6 | 3 | 4 | 6 | 4,3 | 1,37 |
| 3  | 4 | 4 | 6 | 3 | 3 | 4 | 4,0 | 1,10 | 29 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 3,3 | 1,03 |
| 4  | 4 | 4 | 5 | 0 | 4 | 7 | 4,0 | 2,28 | 30 | 4 | 4 | 5 | 2 | 4 | 6 | 4,2 | 1,33 |
| 5  | - | - | - | - | - | - | -   | -    | 31 | - | - | - | - | - | - | -   | -    |
| 6  | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 4 | 3,3 | 0,82 | 32 | - | - | - | - | - | - | -   | -    |
| 7  | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 3,0 | 0,63 | 33 | 4 | 4 | 7 | 3 | 4 | 5 | 4,5 | 1,38 |
| 8  | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2,7 | 0,52 | 34 | 4 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 | 4,2 | 0,75 |
| 9  | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2,3 | 0,82 | 35 | 4 | 4 | 5 | 3 | 3 | 5 | 4,0 | 0,89 |
| 10 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 3 | 2,7 | 0,82 | 36 | 6 | 5 | 6 | 4 | 6 | 8 | 5,8 | 1,33 |
| 11 | 3 | 4 | 4 | 1 | 3 | 4 | 3,2 | 1,17 | 37 | 5 | 7 | 5 | 4 | 7 | 4 | 5,3 | 1,37 |
| 12 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 4,3 | 0,82 | 38 | 4 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 | 4,2 | 0,75 |
| 13 | - | - | - | - | - | - | -   | -    | 39 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3,5 | 0,55 |
| 14 | 6 | 5 | 6 | 5 | 5 | 4 | 5,2 | 0,75 | 40 | - | - | - | - | - | - | -   | -    |

|    |   |   |    |   |   |    |     |      |     |    |    |    |    |    |     |      |      |
|----|---|---|----|---|---|----|-----|------|-----|----|----|----|----|----|-----|------|------|
| 15 | 3 | 4 | 5  | 2 | 3 | 5  | 3,7 | 1,21 | 41  | 4  | 4  | 4  | 2  | 4  | 6   | 4,0  | 1,26 |
| 16 | - | - | -  | - | - | -  | -   | -    | 42  | 3  | 3  | 5  | 2  | 3  | 6   | 3,7  | 1,51 |
| 17 | 3 | 5 | 5  | 2 | 4 | 6  | 4,2 | 1,47 | 43  | 3  | 3  | 5  | 2  | 4  | 5   | 3,7  | 1,21 |
| 18 | 4 | 4 | 6  | 4 | 5 | 7  | 5,0 | 1,26 | 44  | 4  | 4  | 4  | 3  | 3  | 5   | 3,8  | 0,75 |
| 19 | 2 | 4 | 4  | 2 | 3 | 4  | 3,2 | 0,98 | 45  | 5  | 5  | 10 | 3  | 5  | 6   | 5,7  | 2,34 |
| 20 | 4 | 5 | 5  | 0 | 5 | 6  | 4,2 | 2,14 | 46  | 3  | 4  | 6  | 3  | 4  | 4   | 4,0  | 1,10 |
| 21 | 3 | 5 | 4  | 3 | 3 | 6  | 4,0 | 1,26 | 47  | 4  | 4  | 6  | 3  | -  | 6   | 4,6  | 1,34 |
| 22 | 6 | 3 | 10 | 6 | 8 | 14 | 7,8 | 3,82 | C1  | 3  | 3  | 3  | 0  | 2  | 3   | 2,3  | 1,21 |
| 23 | 3 | 3 | 3  | 0 | 4 | 5  | 3,0 | 1,67 | C2  | 94 | 95 | 92 | 85 | 92 | 100 | 93,0 | 4,90 |
| 24 | - | - | -  | - | - | -  | -   | -    | C3  | 2  | 4  | 5  | 2  | 4  | 3   | 3,3  | 1,21 |
| 25 | 4 | 5 | 4  | 3 | 4 | 5  | 4,2 | 0,75 | NTC | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -    | -    |
| 26 | 3 | 3 | 4  | 2 | 2 | 4  | 3,0 | 1,00 |     |    |    |    |    |    |     |      |      |

#### 4.3.2.6. RASSF1A Sonuçları

Bu genin hipermetilasyon sonuçları 42 hasta için değerlendirildi (Şekil 16). Tüm vakalarda genin farklı seviyelerde hipermetile olduğu gözlemlendi (Tablo 23).



Şekil 16. RASSF1A hipermetilasyon analizi pirogram örneği

Tablo 23. RASSF1A geninde analiz edilen altı CpG bölgesindeki metilasyon oranları

| no | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | Ort. | SD    | no | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | Ort. | SD    |
|----|----|----|----|----|----|----|------|-------|----|----|----|----|----|----|----|------|-------|
| 1  | 95 | 97 | 97 | 63 | 99 | 92 | 90,5 | 13,68 | 27 | 93 | 95 | 96 | 94 | 93 | 76 | 91,2 | 7,52  |
| 2  | 81 | 60 | 40 | 23 | 47 | 57 | 51,3 | 19,68 | 28 | 89 | 89 | 93 | 20 | 92 | 86 | 78,2 | 28,60 |
| 3  | 59 | 49 | 41 | 43 | 48 | 53 | 48,8 | 6,59  | 29 | 90 | 91 | 67 | 37 | 89 | 86 | 76,7 | 21,40 |
| 4  | 90 | 94 | 79 | 54 | 89 | 86 | 82,0 | 14,60 | 30 | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -    | -     |
| 5  | 71 | 78 | 52 | 39 | 63 | 57 | 60,0 | 13,91 | 31 | 43 | 39 | 42 | 33 | 40 | 36 | 38,8 | 3,76  |
| 6  | 90 | 97 | 81 | 83 | 94 | 71 | 86,0 | 9,59  | 32 | 87 | 92 | 76 | 81 | 91 | 78 | 84,2 | 6,79  |

|    |    |    |     |    |    |    |      |       |     |    |     |    |    |     |    |      |       |
|----|----|----|-----|----|----|----|------|-------|-----|----|-----|----|----|-----|----|------|-------|
| 7  | 93 | 97 | 95  | 97 | 99 | 80 | 93,5 | 6,92  | 33  | 74 | 73  | 69 | 54 | 56  | 51 | 62,8 | 10,30 |
| 8  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -    | -     | 34  | 80 | 81  | 56 | 63 | 80  | 74 | 72,3 | 10,48 |
| 9  | 91 | 93 | 70  | 52 | 75 | 87 | 78,0 | 15,65 | 35  | 73 | 73  | 76 | 64 | 76  | 70 | 72,0 | 4,52  |
| 10 | 92 | 95 | 90  | 70 | 94 | 88 | 88,2 | 9,26  | 36  | 82 | 81  | 70 | 80 | 81  | 75 | 78,2 | 4,71  |
| 11 | 65 | 64 | 73  | 38 | 63 | 59 | 60,3 | 11,86 | 37  | 74 | 79  | 72 | 66 | 76  | 63 | 71,7 | 6,09  |
| 12 | 88 | 76 | 57  | 40 | 80 | 74 | 69,2 | 17,55 | 38  | 88 | 87  | 79 | 39 | 82  | 84 | 76,5 | 18,66 |
| 13 | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -    | -     | 39  | 87 | 91  | 91 | 87 | 90  | 83 | 88,2 | 3,13  |
| 14 | 93 | 95 | 100 | 91 | 98 | 91 | 94,7 | 3,72  | 40  | 86 | 100 | 45 | 29 | 73  | 75 | 68,0 | 26,35 |
| 15 | 42 | 27 | 19  | 8  | 20 | 32 | 24,7 | 11,76 | 41  | 83 | 82  | 83 | 80 | 86  | 70 | 80,7 | 5,57  |
| 16 | 92 | 96 | 85  | 67 | 95 | 76 | 85,2 | 11,62 | 42  | 84 | 87  | 34 | 26 | 71  | 80 | 63,7 | 26,75 |
| 17 | 88 | 90 | 80  | 54 | 89 | 82 | 80,5 | 13,59 | 43  | 80 | 70  | 52 | 38 | 56  | 68 | 60,7 | 15,00 |
| 18 | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -    | -     | 44  | 35 | 31  | 36 | 14 | 23  | 29 | 28,0 | 8,29  |
| 19 | 83 | 84 | 87  | 76 | 88 | 81 | 83,2 | 4,36  | 45  | 84 | 84  | 61 | 72 | 85  | 77 | 77,2 | 9,41  |
| 20 | 79 | 84 | 65  | 78 | 80 | 71 | 76,2 | 6,91  | 46  | 79 | 80  | 56 | 43 | 72  | 61 | 65,2 | 14,50 |
| 21 | 88 | 80 | 61  | 44 | 66 | 79 | 69,7 | 15,98 | 47  | 81 | 80  | 78 | 22 | 83  | 78 | 70,3 | 23,75 |
| 22 | 2  | 8  | 28  | 3  | 1  | 8  | 8,3  | 10,09 | C1  | 1  | 3   | 4  | 2  | 5   | 0  | 2,5  | 1,87  |
| 23 | 84 | 90 | 82  | 46 | 83 | 77 | 77,0 | 15,75 | C2  | 97 | 98  | 97 | 97 | 100 | 93 | 97,0 | 2,28  |
| 24 | 86 | 88 | 59  | 40 | 85 | 78 | 72,7 | 19,22 | C3  | 2  | 7   | 8  | 0  | 15  | 5  | 6,2  | 5,27  |
| 25 | 87 | 89 | 82  | 71 | 89 | 78 | 82,7 | 7,17  | NTC | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -    | -     |
| 26 | -  | -  | -   | -  | -  | -  | -    | -     |     |    |     |    |    |     |    |      |       |

#### 4.3.2.7. CDKN2A Sonuçları

Bu genin pirosekanslamasında kontrol grupları dahil olmak üzere ve yapılan tekrarlar rağmen yeterli sayıda örnekten optimal düzeyde sinyal alınamadığından bu genin metilasyon analizinden veri alınamadı

#### 4.3.2.8. SFRP1 Sonuçları

Bu genin pirosekanslama çalışmalarında elde edilen sinyal değerleri, yapılan tekrarlar rağmen kabul edilebilir aralığın altında olduğundan metilasyon durumu ile ilgili veri alınamadı.

#### 4.3.2.9. HIC1 Sonuçları

Bu primerle yapılan çalışmalarda, primerde sitozin kontaminasyonu tespit edildi. Peak görülmesi beklenmeyen NTC kontrol grubunda çıkan yüksek sitozin peakleri, analiz sitozin/timin oranına bağlı olarak yapıldığından, primerlerden doğru veri

alınamayacağını gösterdi. Üretim kaynaklı olabilen bu hata sebebiyle analiz tamamlanamadı.

#### 4.4. İstatistiksel Analiz

Çalışma dahilinde analizi yapılan *RASSF1A* promotor hipermetilasyonları incelendiğinde, tüm vakalarda farklı seviyelerde hipermetilasyon gözlemlendi. Bu sebeple, literatür ışığında (85), bu genin farklı metilasyon yüzdeleri için dört farklı kuartil tanımlandı (Tablo 24). Her bir çeyrekteki metilasyon seviyesi şu şekildedir:

- Q1: metilasyon seviyesi %63,47'den düşük olan vakalar
- Q2: metilasyon seviyesi %63,47 ile %76,37 aralığında olan vakalar
- Q3: metilasyon seviyesi %76,37 ile %82,82 aralığında olan vakalar
- Q4: metilasyon seviyesi %82,82'den yüksek olan vakalar

*RASSF1A* metilasyon yüzdesi yüksek olan kuartildeki hastalar için metastaz varlığı istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlendi ( $p=0.001$ )

**Tablo 24.** *RASSF1A* hipermetilasyon seviyelerine göre kuartillere ayrılan olguların morfolojik ve klinik parametrelerle ilişkisi

| Kuartil                 |                                | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 |
|-------------------------|--------------------------------|----|----|----|----|
| Moleküler Alt Grup (n)  | WNT-aktif                      | 0  | 2  | 1  | 0  |
|                         | SHH-aktif <i>TP53</i> wildtype | 1  | 4  | 6  | 2  |
|                         | SHH-aktif <i>TP53</i> mutant   | 2  | 0  | 0  | 2  |
|                         | WNT/SHH-olmayan MB             | 7  | 5  | 4  | 7  |
| Histolojik Alt Grup (n) | Klasik                         | 7  | 8  | 4  | 7  |
|                         | D/N                            | 1  | 1  | 5  | 2  |
|                         | LC/A                           | 2  | 2  | 2  | 1  |
| Metastaz (n)            | Var                            | 5  | 2  | 1  | 8* |
|                         | Yok                            | 5  | 8  | 10 | 1  |
|                         | Bilinmiyor                     | 0  | 1  | 0  | 1  |
| Prognoz (n)             | Eks                            | 3  | 2  | 1  | 2  |
|                         | İyi ve hayatta                 | 5  | 5  | 10 | 6  |
|                         | Bilinmiyor                     | 2  | 4  | 0  | 2  |

Çalışılan diğer genler değerlendirildiğinde, *EZH2* geninde hipermetilasyon tespit edilemediğinden, istatistiksel analizler *KLF4*, *SPINT2*, *ZIC2* ve *PTCH1* genlerinin metilasyon seviyeleri için yapıldı. Yapılan analiz sonucunda elde edilen dağılımlar Tablo 25'te gösterilmiştir.

**Tablo 25.** *KLF4*, *SPINT2*, *ZIC2* ve *PTCH1* genlerindeki hipermetilasyon seviyeleri ile moleküler alt grup, histolojik sınıflandırma ve klinik veriler arasındaki ilişki

| Genler                       | <i>KLF4</i>                                                                                                                               | <i>SPINT2</i>                                                                                                             | <i>ZIC2</i>                                                                                      | <i>PTCH1</i>                                                                                                                     |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hipermetile örnek sayısı (%) | 4/45 (%8.9)                                                                                                                               | 6/43 (%13.9)                                                                                                              | 3/38 (%7.9)                                                                                      | 11/36 (%30.6)                                                                                                                    |
| Moleküler alt gruplar (n)    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SHH- aktive <i>TP53</i> mutant (1)</li> <li>• SHH- aktive <i>TP53</i> yabancı tip (3)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SHH- aktive <i>TP53</i> mutant (1)</li> <li>• WNT/SHH- olmayan MB (5)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SHH- aktive <i>TP53</i> yabancı tip (3)</li> </ul>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SHH- aktive <i>TP53</i> yabancı tip (9) *</li> <li>• WNT/SHH- olmayan MB (2)</li> </ul> |
| Histolojik alt tipler (n)    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LC/A (1)</li> <li>• Klasik (3)</li> </ul>                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LC/A (1)</li> <li>• Klasik (5)</li> </ul>                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• D/N (1)</li> <li>• Klasik (2)</li> </ul>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LC/A (1)</li> <li>• D/N (3)</li> <li>• Klasik (7)</li> </ul>                            |
| Metastaz (n)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Var (2)</li> <li>• Yok (2)</li> </ul>                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Var (6) *</li> </ul>                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Yok (3)</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Var (4)</li> <li>• Yok (7)</li> </ul>                                                   |
| Prognoz (n)                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eks (1)</li> <li>• İyi ve hayatta (3)</li> </ul>                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eks (4) *</li> <li>• İyi ve hayatta (1)</li> <li>• Bilinmiyor (1)</li> </ul>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• İyi ve hayatta (2)</li> <li>• Bilinmiyor (1)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eks (1)</li> <li>• İyi ve hayatta (8)</li> <li>• Bilinmiyor (2)</li> </ul>              |

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, 47 pediatrik MB tümör dokusundan izole edilen genomik DNA'lar kullanılarak *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *EZH2*, *SFRP1*, *KLF4* ve *PTCH1* genlerinin promotor metilasyon seviyeleri ile tümör histolojisi, moleküler alt grubu ve klinik veriler arasındaki ilişki araştırıldı. Seçilen genler literatürde MB'larda metilasyonu en sık görülen genler olduğundan çalışmaya dahil edildi (64). Ayrıca bu çalışma, altın standart olarak belirlenen bisülfid temelli pirosekanslama ile yapıldı (64).

MB'ların moleküler alt sınıflandırmasına dair güncel bir konsensüs olmasına rağmen, araştırmalar MB'un genetik temelini çok daha heterojen olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, 2016 yılında yapılan bir çalışma, MB'ları 16 farklı alt gruba ayırmıştır (3). Ancak laboratuvar ortamında MB'ları 4 temel moleküler alt gruba ayırmak için kullanılabilecek ucuz ve efektif yöntemler bulunabilmiş değildir. Moleküler alt sınıflandırma günümüzde en doğru biçimde tüm genom metilasyon analizleri ya da NanoString yöntemi ile yapılabilir (44,87), ancak bu yöntemler, klinikte kullanım için pahalı ve uygulaması zor yöntemlerdir. Bu iki yöntem dışında, Grup 3 ve Grup 4 MB'ları ayırmak şu an için mümkün olmadığından, doğrudan klinik ile ilişkili biyobelirteçlerin tanımlanması önem kazanmaktadır.

FFPG tümör dokuları, uzun yıllar boyunca uygun oda sıcaklığı ve nem koşullarında bozulmadan saklanabilmektedir. Ancak formalin fiksasyonu, protein yapısına daha az zarar vermesine karşın başta RNA degradasyonu olmak üzere genomik DNA'nın kırılması ve kromozomal yapıların bozulmasına sebep olabilmektedir (65). MB'ların moleküler alt sınıflandırmasında kullanılması önerilen transkriptom analizleri (2) ve NanoString yöntemi (87), formalin fiksasyonu sırasında RNA'ların degrade olması sebebiyle, ancak taze donmuş (fresh frozen; FF) dokular kullanılarak yapılabilir. FF dokular, tümör eksizyonunu takiben sıvı nitrojen ile dondurularak, sadece sıvı nitrojen tanklarında uzun süreli saklanabilmektedir. Sıvı nitrojen uygulaması hücrelere minimal zarar vermekte, dolayısıyla özellikle RNA'ların korunmasına yardımcı olmaktadır. Ancak, dokuların sıvı nitrojende saklanma koşullarının maliyetli olması, patolojik tanı için genellikle formalin fiksasyonun kullanılmasına, bu nedenle de FFPG tümör dokularının yaygın olarak

arşivlenmesine yol açmaktadır. MB'ların moleküler sınıflandırmasında da ilk olarak FF dokulardan RNA temelli analizler kullanılmış olsa da, daha fazla örneğin analizini mümkün kılan FFPG dokulardan tüm genomun DNA metilasyon analizleri ilerleyen yıllarda önem kazanmıştır. Bu sebeple, günümüzde MB moleküler alt sınıflandırması FF ya da FFPG dokular kullanılarak DNA metilom analizleri ile gerçekleştirilmektedir (87). Bu çalışmada kullanılacak tümör dokularının FFPG özellikte olması nedeniyle, daha doğru sonuçlar için İHK ve DNA metilasyon analizleri uygulanarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ilk aşamasında dokuların histolojik revizyonları yapılmış olup büyük oranda klasik histoloji gösteren olgular bulunmuştur. Literatürde MB histolojisinin benzer bir dağılım gösterdiği bilinmektedir (6). Bu çalışmada MBEN tanısı alan tek olgu, D/N grubunun içinde değerlendirilmiştir. Çalışma dahilinde histolojik tanı revizyonu sonrası MB'ların moleküler alt sınıflandırmasının yapılması için İHK ile olgular üç moleküler alt gruba ayrılmıştır ve literatürde MB'ların benzer bir dağılım gösterdiği belirtilmektedir (2). Ayrıca, SHH-aktive MB'ların *TP53* mutasyon varlığına göre alt gruplarına ayrılmasında da literatürde benzer dağılımlar görülmektedir (88). Sonuç olarak, bu çalışmadaki MB histolojik ve moleküler alt sınıf dağılımları literatür ile benzerlik göstermekte olup, her alt gruptan tümörü içermektedir.

Tez çalışmasının bir sonraki bölümünde, seçilen genlerin DNA metilasyon seviyeleri pirosekanslama yöntemi ile incelendi. *SPINT2* promotor hipermetilasyonu görülen örneklerden çoğunun WNT/SHH olmayan MB'lar olduğu görüldü. Aynı zamanda, hipermetilasyon tespit edilen tüm WNT/SHH olmayan MB'larda metastaz varlığı ile ilişki istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. Literatürde, *SPINT2* gen ekspresyonundaki değişikliklerin farklı kanser tiplerinde metastaz ve kanser gelişimi ile olan ilişkisi ortaya koyulmuştur (79,80). Bizim çalışmamızda *SPINT2* gen hipermetilasyon oranı %12,9'dur. MB'larda yapılan bir çalışmada ise promotor hipermetilasyonu aracılı *SPINT2* down regülasyonunun MB'ların %34,3'ünde görüldüğü belirtilmiştir. Ancak bu çalışmada *SPINT2* metilasyonu görülen vakaların moleküler alt grupları ve klinik seyirlerine dair ilişki araştırılmamıştır (41). *SPINT2* hipermetilasyonu görülen WNT/SHH-olmayan MB vakalarının tamamında metastaz tespit edilmiş olup, bu tümörlerin histolojisinde nodüler yapılanmaya rastlanmamıştır.

Yakın zamanlı bir çalışmada, nodüler histolojinin özellikle Grup 4 MB'larda olası bir belirteç olduğu ortaya konulmuş olduğundan (89) ve Grup 3 MB'ların prognozu Grup 4 MB'lara kıyasla daha kötü seyrettiğinden ötürü, çalışmamızdaki *SPINT2* hipermetilasyonu gösteren WNT/SHH-olmayan vakaların Grup 3 MB'lar olabileceğini speküle etmek mümkündür.

Çalışılan bir diğer gen olan *KLF4*'ün hipermetilasyonu çalışmamıza dahil edilen tümörlerin %13,9'unda gözlemlenmiştir. Literatürde, MB'ların yaklaşık %16'sında bu hipermetilasyonun varlığı gösterilmiş olup, bu genin MB'lardaki tümör baskılayıcı ve kanser gelişimindeki rolü bilinmektedir (39). Ancak, çalışmalarda *KLF4* promotor hipermetilasyonu hiçbir moleküler alt grupla ilişkilendirilememiştir. Bu çalışmada, *KLF4* metilasyonu gözlemlenen tüm vakaların SHH-aktif MB'lar olduğu gösterilmiş olsa da bu değişikliğin bir belirteç olarak önemi olduğunu söylemek için elimizde yeterli kanıt yoktur.

*PTCH1* promotor hipermetilasyonu, çalışmaya dahil edilen vakaların %30,6'sında görülmüş olup bu vakaların büyük çoğunluğunu SHH-aktif *TP53* mutant olmayan MB'lar oluşturmaktadır. *PTCH1* mutasyon ve metilasyonları literatürde SHH-aktif MB'lar için potansiyel bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (40). Çalışmamızda, *PTCH1* metilasyonları kötü prognoz ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bunun bir sebebi, metilasyonun gözlemlendiği vakaların çoğunun SHH-aktif *TP53* mutant olmayan MB'lar olması ve bu alt grubun daha iyi prognoz ile seyretmesi olabilir.

*ZIC2* hipermetilasyonları çalışılan tümörlerin %7,9'unda görülmüştür. Bu hipermetile olguların prognoz ile ilişkisi saptanmamıştır. Buna karşın, MB'larda görülen *ZIC2* metilasyonlarının kötü prognoz ile ilişkisi literatürde ortaya koyulmuş olsa da (38) çalışmamızda *ZIC2* hipermetilasyonu görülen tümörlerin hepsi, *PTCH1* metilasyonlarında da olduğu gibi, SHH-aktif *TP53* mutant olmayan MB'lar olduğundan, genellikle daha iyi prognoz ile ilişkilendirilen olgulardır. Bu genin prognoz ile ilişkisinin ortaya koyulabilmesi için daha fazla sayıda örnekle yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmada, hiçbir vakada *EZH2* promotor hipermetilasyonu tespit edilememiştir. Bu genin MB'larda ekspresyonunun arttığı bilinmekte olup, özellikle Grup 3 ve Grup 4 MB'lar için önemli bir terapötik hedef olduğu düşünülmektedir (14,81). Bu genin çeşitli modifikasyonlarının daha büyük bir örneklem ile çalışılması ile genin MB'deki potansiyel önemi ortaya koyulabilecektir.

Çalışmada, *RASSF1A* geninin hipermetilasyonu tüm vakalarda gözlemlenmiş olup, MB'larda bu genin biallelik epigenetik inaktivasyonu sık görülen bir düzenleme olarak bilinmektedir (35). Çalışmamızda elde edilen bulgular, tümör dokularındaki hipermetilasyon seviyeleri arasındaki farklılığı vurgulamaktadır. Bu sebeple vakalar, metilasyon seviyelerine göre dört gruba ayrılmıştır. Son kuartilde yer alan ve metilasyon seviyeleri %82,8'in üzerinde olan vakalarda metastaz varlığı istatistiksel olarak anlamı bulunmuştur. Benzer şekilde literatürde diğer organ kanserlerinde bu genin hipermetilasyonu metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş olsa da (68–70), MB'ların klinik gidişatları ile bu genin promotor hipermetilasyonu ile ilgili bir çalışma bildiğimiz kadarı ile literatürde yoktur. Ancak, çalışmamızda sonuç alınan 36 vakanın tamamında bu değişimin tanımlanması, *RASSF1A* metilasyon seviyelerinin kuartiller olarak incelenmesinin, hastalığın risk stratifikasyonunda önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Bu genin DNA metilasyon aracılı susturulması birçok kanser tipinde görülen bir değişiklik olduğundan *RASSF1A* hedefli tedavi yöntemleri günümüzde gelişim aşamasındadır (70,90,91). Bu çalışma, özellikle hedefli tedavi için bir belirteç olabilecek *RASSF1A* metilasyonlarının MB'lardaki öneminin araştırılmasına ihtiyaç olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmaya dahil edilen diğer üç gen; *SFRP1*, *CDKN2A* ve *HIC1* için yapılan analizlerden teknik nedenlerle sonuç alınamamıştır. Promotor hipermetilasyonu tespiti için dizayn edilen farklı primerlerle çalışmaların tekrar edilebilmesi, MB'ların klinik seyri ve bu genlerin hipermetilasyonları arasındaki ilişkinin aydınlatılması açısından faydalı olabilecektir.

Literatürde, MB'larda görülen çeşitli epigenetik değişikliklerin moleküler alt gruplarla ilişkisine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. DNA metilasyon analizleri, *LIN28B* geninin promotor upstream bölgesindeki hipometilasyonu sonucu genin ekspresyonunda artış görüldüğünü ve bu değişimi taşıyan özellikle grup 3 ve Grup 4

MB'larda tümörün daha agresif hale geldiği göstermiştir (44). Histon modifikasyonlarındaki değişikliklerin incelenmesi sonucu H4K16 Histon asetil transferaz görevi yapan hMOF'un downregülasyonuna yol açan değişikliklerin, MB'un prognozunda etkili olduğu bulunmuştur (46). Ayrıca, artmış *EZH2* ekspresyon seviyeleri ve buna bağlı olarak artan H3K27me3 işaretlerinin özellikle Grup 3 ve Grup 4 MB'larda tespit edilmiş olup, MB prognozu için bir belirteç olabilecek *EZH2* aşırı ekspresyonu ile *KDM6A*'nın tamamen kaybına yol açan mutasyonların beraber gözlemlendiği ortaya koyulmuştur (50). ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenleme mekanizmalarındaki değişikliklerden, SWI/SNF ailesi proteinlerinin bir üyesi olan *SMARCA4*'ün WNT-aktif ve Grup 3 MB'larda yaygın olarak mutasyona uğradığını belirlenmiştir (92). Bunun yanı sıra, bir başka kromatin yeniden düzenleyici proteini kodlayan *CHD7* genindeki mutasyonlar Grup 3 ve 4 MB'larda; Dead-Box RNA helikazını kodlayan gen olan *DDX3X*'teki mutasyonların anormal Wnt sinyallerine katkıda bulunmakta ve çoğunlukla WNT-aktif MB'larda görüldüğü bilinmektedir (14). MB'larda kodlamayan RNA'lardaki değişiklikleri inceleyen çalışmalar, WNT-aktif MB'larda tümör baskılayıcı *miR-193*'ün upregüle olduğu tespit etmiştir (93). Artmış *MYCN* ekspresyonu yoluyla Shh yolağı aktivasyonunu tetikleyen onkogenik *miR-17~92* kümesinin SHH-aktif MB'larda upregülasyonu görülmüştür (94). Ayrıca, fonksiyonu henüz bilinmeyen *miR-30b/d*'nin Grup 3 MB'larda upregüle olduğu gösterilmiştir (95). Ek olarak, diğer birçok miRNA'nın MB alt tipleri arasında değişen ekspresyon seviyeleri gözlemlendiği bilinmektedir. Literatürde, lncRNA'ların MB'lardaki değişimlerini ve moleküler gruplar arasındaki dağılımlarını inceleyen bir çalışma, Linc-NeD125'in aşırı ekspresyonunun, *KDM6A*, *SNCAIP*, *CDK6* dahil olmak üzere Grup 4 MB'larda önemli bazı genlerin ekspresyonuna yol açtığını bulmuştur (61). Bir başka çalışma ise, *EMX2OS*, *LINC01315*, *LINC00348* ve *LINC01419* lncRNA'larının upregülasyonunun yalnızca sırasıyla WNT-aktif, SHH-aktif, Grup 3 ve Grup 4 MB'larda gözlemlendiğini ve alt gruplama için bir belirteç olarak önemini ortaya koyulabilmesi için daha fazla araştırma gerektiğini göstermiştir (63).

Epigenetik mekanizmalar sıklıkla birbirini etkileme eğilimindedir ve bazı durumlarda farklı değişiklikler aynı durumlarda görülür. Bir histon bağlayıcı proteini kodlayan *ZMYM3* genindeki mutasyonlar sadece Grup 4 MB'larda (34) gözlenmekte olup bu mutasyonlar, *KDM6A* mutasyonları ve azalmış *EZH2* ekspresyonu ile birlikte

yaygın olarak gözlemlenmekte ve farklı epigenetik modifikasyonlar arasındaki iş birliğini ve MB'lardaki potansiyel önemine işaret etmektedir (14,96).



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde MB'ların moleküler temellerine dair çalışmalar oldukça yoğun bir şekilde devam etmekte olsa da çalışmaların büyük bir kısmı spesifik olarak MB'ların moleküler alt sınıflandırmaları ile belirteçlerin ilişkisini araştırma yönündedir. Hastalık nüksü, kansere bağlı ölüm, metastaz gibi olası olumsuz klinik senaryoları öngörebilecek belirteçlerin ortaya konulması, hastanın doğru yönetimi ve tedavisi açısından çok büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, 47 pediatrik MB olgusunda histolojik ve moleküler alt sınıflandırma yapılmış ve literatür ışığında prognostik açıdan önemli olabilecek promotor hipermetilasyonlarının onkopatolojik önemi araştırılmıştır.

Araştırmanın hipotezi, *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *ZIC2*, *SPINT2*, *EZH2*, *SFRP1*, *KLF4* ve *PTCH1* genlerinin promotor bölgelerinin hipermetilasyonunun MB'ların histolojik ve moleküler alt sınıfları ve klinik seyriyle olası ilişkisini ortaya koymaktır. Bu çalışma, başta *SPINT2* ve *RASSF1A* genleri olmak üzere, *ZIC2*, *SPINT2*, *KLF4* ve *PTCH1* genlerinde promotor hipermetilasyonlarının MB moleküler alt gruplarıyla ve metastaz varlığı ile ilişkisini ortaya koymakla beraber, daha büyük örneklem ile yapılabilecek çalışmalara olan ihtiyacı işaret etmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin, MB'ların epigenetik özellikleri açısından literatüre katkı sağlayacağını, ayrıca hastaların risk stratifikasyonu ve kişiye özel tedavi seçenekleri açısından anlamlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızın, daha geniş serileri içeren ileri çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.

## KAYNAKLAR

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Vol. 131, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2016. p. 803–20.
2. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):465–72.
3. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*. 2017;31(6):737-754.e6.
4. Liang L, Aiken C, Felton K, Hogg A, Landeghem F Van, Klonisch T, et al. Development of the Cerebellum from Molecular Aspects to Diseases [Internet]. Marzban H, editor. *Development of the Cerebellum from Molecular Aspects to Diseases*. Cham: Springer International Publishing; 2017.
5. Rutka JT, Hoffman HJ. Medulloblastoma: A historical perspective and overview. *J Neurooncol*. 1996;29(1):1–7.
6. David N. Louis, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler WKC, editor. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Revised 4t*. Lyon: IARC; 2016. 194–200 p.
7. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol*. 2006;24(12):1924–31.
8. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*. 2008;3(8).
9. Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, et al. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1424–30.
10. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1408–14.
11. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, et al. Medulloblastoma: Clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*. 2011;121(3):381–96.
12. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan M, Raff, Keith Roberts PW. *Molecular biology of the cell*. Vol. 21, *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*. Garland Sciences; 2014. 870–871 p.
13. Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic  $\beta$ -catenin mutations. *Cancer Res*. 1998;58(5):896–9.

14. Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature*. 2012 Aug 2;488(7409):43–8.
15. Jones DTW, Jäger N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*. 2012;488(7409):100–5.
16. Brodski C, Blaess S, Partanen J, Prakash N. Crosstalk of intercellular signaling pathways in the generation of midbrain dopaminergic neurons in vivo and from stem cells. *J Dev Biol*. 2019;7(1):1–34.
17. Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: A review. *Neurosurgery*. 2000;47(4):888–901.
18. Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJH, Martin DC, et al. Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(23):2927–35.
19. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DTW, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):473–84.
20. Ryan SL, Schwalbe EC, Cole M, Lu Y, Lusher ME, Megahed H, et al. MYC family amplification and clinical risk-factors interact to predict an extremely poor prognosis in childhood medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):501–13.
21. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97–109.
22. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):821–31.
23. Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, Crosier S, Smith AJ, Hicks D, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):958–71.
24. Shih DJH, Northcott PA, Remke M, Korshunov A, Ramaswamy V, Kool M, et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol*. 2014;32(9):886–96.
25. Sadakierska-Chudy A, Kostrzewa RM, Filip M. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape Part I: DNA Methylation, Passive and Active DNA Demethylation Pathways and Histone Variants. *Neurotox Res*. 2015;27(1):84–97.
26. Frühwald MC, O’Dorisio MS, Dai Z, Tanner SM, Balster DA, Gao X, et al. Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas-Implications for tumor biology and potential clinical utility. *Oncogene*. 2001;20(36):5033–42.

27. Hovestadt V, Remke M, Kool M, Pietsch T, Northcott PA, Fischer R, et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol.* 2013;125(6):913–6.
28. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23–38.
29. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057–68.
30. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;310:211–50.
31. Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell.* 1985 Jan;40(1):91–9.
32. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1412–7.
33. Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, et al. Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. *Mol Cell.* 2008 Jun;30(6):755–66.
34. Feng J, Chang H, Li E, Fan G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2005;79(6):734–46.
35. Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson ADJ, Ellison DW, Clifford SC. Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development. *Cancer Res.* 2002;62(20):5906–11.
36. Rood BR, Zhang H, Weitman DM, Cogen PH. Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res.* 2002;62(13):3794–7.
37. Zuzak TJ, Steinhoff DF, Sutton LN, Phillips PC, Eggert A, Grotzer MA. Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma. *Eur J Cancer.* 2002;38(1):83–91.
38. Pfister S, Schlaeger C, Mendrzyk F, Wittmann A, Benner A, Kulozik A, et al. Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(7).
39. Nakahara Y, Northcott PA, Li M, Kongkham PN, Smith C, Yan H, et al. Genetic and epigenetic inactivation of Kruppel-like Factor 4 in medulloblastoma. *Neoplasia* [Internet]. 2010;12(1):20–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1593/neo.91122>
40. Diede SJ, Guenthoer J, Geng LN, Mahoney SE, Marotta M, Olson JM, et al. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 2010;107(1):234–9.

41. Kongkham PN, Northcott PA, Ra YS, Nakahara Y, Mainprize TG, Croul SE, et al. An epigenetic genome-wide screen identifies SPINT2 as a novel tumor suppressor gene in pediatric medulloblastoma. *Cancer Res.* 2008;68(23):9945–53.
42. Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene.* 2010;29(20):3017–24.
43. Lindsey JC, Kawauchi D, Schwalbe EC, Solecki DJ, Selby MP, McKinnon PJ, et al. Cross-species epigenetics identifies a critical role for VAV1 in SHH subgroup medulloblastoma maintenance. *Oncogene.* 2015;34(36):4746–57.
44. Hovestadt V, Jones DTW, Picelli S, Wang W, Kool M, Northcott PA, et al. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature.* 2014;510(7506):537–41.
45. Sadakierska-Chudy A, Filip M. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs. *Neurotox Res.* 2015;27(2):172–97.
46. Roussel MF, Stripay JL. Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. *Cerebellum.* 2018;17(1):28–36.
47. Milde T, Oehme I, Korshunov A, Kopp-Schneider A, Remke M, Northcott P, et al. HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: Novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clin Cancer Res.* 2010;16(12):3240–52.
48. Shi J, Vakoc CR. The Mechanisms behind the Therapeutic Activity of BET Bromodomain Inhibition. *Mol Cell.* 2014;54(5):728–36.
49. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science (80-).* 2002;298(5595):1039–43.
50. Dubuc AM, Remke M, Korshunov A, Northcott PA, Zhan SH, Mendez-Lago M, et al. Aberrant patterns of H3K4 and H3K27 histone lysine methylation occur across subgroups in medulloblastoma. *Acta Neuropathol.* 2013;125(3):373–84.
51. Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(7):407–22.
52. Shi X, Wang Q, Gu J, Xuan Z, Wu JI. SMARCA4/Brg1 coordinates genetic and epigenetic networks underlying Shh-type medulloblastoma development. *Oncogene.* 2016;35(44):5746–58.
53. Motameny S, Wolters S, Nürnberg P, Schumacher B. Next generation sequencing of miRNAs - Strategies, resources and methods. *Genes (Basel).* 2010;1(1):70–84.
54. Grunder E, D'Ambrosio R, Fiaschetti G, Abela L, Arcaro A, Zuzak T, et al.

- MicroRNA-21 suppression impedes medulloblastoma cell migration. *Eur J Cancer*. 2011;47(16):2479–90.
55. Pal R, Greene S. MicroRNA-10b is overexpressed and critical for cell survival and proliferation in medulloblastoma. *PLoS One*. 2015;10(9):1–15.
  56. Li KKW, Xia T, Ma FMT, Zhang R, Mao Y, Wang Y, et al. miR-106b is overexpressed in medulloblastomas and interacts directly with PTEN. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015;41(2):145–64.
  57. Pierson J, Hostager B, Fan R, Vibhakar R. Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J Neurooncol*. 2008;90(1):1–7.
  58. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J*. 2008;27(19):2616–27.
  59. Joshi P, Katsushima K, Zhou R, Meoded A, Stapleton S, Jallo G, et al. The therapeutic and diagnostic potential of regulatory noncoding RNAs in medulloblastoma. *Neuro-Oncology Adv*. 2019;1(1):1–14.
  60. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*. 2015;47(3):199–208.
  61. Laneve P, Po A, Favia A, Legnini I, Alfano V, Rea J, et al. The long noncoding RNA linc-NeD125 controls the expression of medulloblastoma driver genes by microRNA sponge activity. *Oncotarget*. 2017;8(19):31003–15.
  62. Zhang Y, Wang T, Wang S, Xiong Y, Zhang R, Zhang X, et al. Nkx2-2as suppression contributes to the pathogenesis of sonic hedgehog medulloblastoma. *Cancer Res*. 2018;78(4):962–73.
  63. Kesharwani V, Shukla M, Coulter DW, Sharp JG, Joshi SS, Chaturvedi NK, et al. Long non-coding RNA profiling of pediatric Medulloblastoma. *BMC Med Genomics*. 2020;13(1):1–14.
  64. Singer BD. A practical guide to the measurement and analysis of DNA methylation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;61(4):417–28.
  65. Batora N V., Sturm D, Jones DTW, Kool M, Pfister SM, Northcott PA. Transitioning from genotypes to epigenotypes: Why the time has come for medulloblastoma epigenomics. *Neuroscience*. 2014;264:171–85.
  66. Zhou C, Li J, Li Q. CDKN2A methylation in esophageal cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(30):50071–83.
  67. Bortolotto S, Chiad L, Cavalla P, Bosone I, Mauro A. CDKN2A / p16 in ependymomas. 2001;9–13.
  68. Bin Y, Ding Y, Xiao W, Liao A. RASSF1A: A promising target for the diagnosis and treatment of cancer. *Clin Chim Acta*. 2020;504(September 2019):98–108.
  69. Inda MDM, Castresana JS. RASSF1A promoter is highly methylated in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system.

- Neuropathology. 2007;27(4):341–6.
70. García-Gutiérrez L, McKenna S, Kolch W, Matallanas D. RASSF1A tumour suppressor: Target the network for effective cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):1–22.
  71. Wei D, Kanai M, Jia Z, Le X, Xie K. Krüppel-like factor 4 induces p27Kip1 expression in and suppresses the growth and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(12):4631–9.
  72. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbitt BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene*. 2004;23(2):395–402.
  73. Yasunaga JI, Taniguchi Y, Nosaka K, Yoshida M, Satou Y, Sakai T, et al. Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. *Cancer Res*. 2004;64(17):6002–9.
  74. Fujii H, Biel MA, Zhou W, Weitzman SA, Baylin SB, Gabrielson E. Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene*. 1998;16(16):2159–64.
  75. Rathi A, Virmani AK, Harada K, Timmons CF, Miyajima K, Hay RJ, et al. Aberrant methylation of the HIC1 promoter is a frequent event in specific pediatric neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10 I):3674–8.
  76. Marchini S, Poyner E, Barakat RR, Clivio L, Cinquini M, Fruscio R, et al. The zinc finger gene ZIC2 has features of an oncogene and its overexpression correlates strongly with the clinical course of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4313–24.
  77. Zhu P, Wang Y, He L, Huang G, Du Y, Zhang G, et al. ZIC2-dependent OCT4 activation drives self-renewal of human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*. 2015;125(10):3795–808.
  78. Kim KT, Lee C-H, Chung CK, Kim JH. Is NF2 a Key Player of the Differentially Expressed Gene Between Spinal Cord Ependymoma and Intracranial Ependymoma? *World Neurosurg*. 2018 Oct;118:e906–17.
  79. Roversi FM, Olalla Saad ST, Machado-Neto JA. Serine peptidase inhibitor Kunitz type 2 (SPINT2) in cancer development and progression. *Biomed Pharmacother*. 2018;101(October 2017):278–86.
  80. Hwang S, Kim HE, Min M, Raghunathan R, Panova IP, Munshi R, et al. Epigenetic Silencing of SPINT2 Promotes Cancer Cell Motility via HGF-MET Pathway Activation in Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2015;135(9):2283–91.
  81. Alimova I, Venkataraman S, Harris P, Marquez VE, Northcott PA, Dubuc A, et al. Targeting the enhancer of zeste homologue 2 in medulloblastoma. *Int J Cancer*. 2012;131(8):1800–9.
  82. Chase A, Cross NCP. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2613–8.
  83. Preusser M, Berghoff AS, Manzl C, Filipits M, Weinhäusel A, Pulverer W, et al. Clinical Neuropathology practice news 1-2014: Pyrosequencing meets

- clinical and analytical performance criteria for routine testing of MGMT promoter methylation status in glioblastoma. *Clin Neuropathol.* 2014;33(1):6–14.
84. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wohrer A, et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2015;17(8):1064–75.
  85. Yamamura K, Kosumi K, Baba Y, Harada K, Gao F, Zhang X, et al. LINE-1 methylation level and prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review. *Surg Today.* 2017;47(12):1450–9.
  86. Bator N V., Sturm D, Jones DTW, Kool M, Pfister SM, Northcott PA. Transitioning from genotypes to epigenotypes: Why the time has come for medulloblastoma epigenomics. Vol. 264, *Neuroscience.* 2014. p. 171–85.
  87. Northcott PA, Shih DJH, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):615–26.
  88. Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJH, Martin DC, et al. Subgroup-Specific Prognostic Implications of TP53 Mutation in Medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2013 Aug 10;31(23):2927–35.
  89. Triscott J, Yip S, Johnston D, Michaud J, Rassekh SR, Hukin J, et al. Histologic Correlates of Molecular Group 4 Pediatric Medulloblastoma: A Retrospective Canadian Review. *Pediatr Dev Pathol.* 2021;
  90. Grawenda AM, O'Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *Br J Cancer.* 2015 Jul 9;113(3):372–81.
  91. Bin Y, Ding Y, Xiao W, Liao A. RASSF1A: A promising target for the diagnosis and treatment of cancer. *Clin Chim Acta.* 2020 May;504:98–108.
  92. Yi J, Wu J. Epigenetic regulation in medulloblastoma. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2018;87(July 2017):65–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.09.003>
  93. Gokhale A, Kunder R, Goel A, Sarin R, Moiyadi A, Shenoy A, et al. Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway. *J Cancer Res Ther.* 2010;6(4):521–9.
  94. Northcott PA, Fernandez-L A, Hagan JP, Ellison DW, Grajkowska W, Gillespie Y, et al. The miR-17/92 polycistron is up-regulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. *Cancer Res.* 2009;69(8):3249–55.
  95. Weeraratne SD, Amani V, Teider N, Pierre-Francois J, Winter D, Kye MJ, et al. Pleiotropic effects of miR-183/96/182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):539–52.
  96. Leung JWC, Makharashvili N, Agarwal P, Chiu LY, Pourpre R, Cammarata MB, et al. ZMYM3 regulates BRCA1 localization at damaged chromatin to promote DNA repair. *Genes Dev.* 2017;31(3):260–74.

## EKLER

### EK-1: TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYINLAR

1) Yayınlanmak üzere kabul edildi.

Author Dashboard

3 Manuscripts I Have Co-Authored

Start New Submission

5 Most Recent E-mails

### Manuscripts I Have Co-Authored

| STATUS                          | ID             | TITLE                                                                                                                                                                       | CREATED     | SUBMITTED   |
|---------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| ADM: Narula, Taru               | PDP-21-0076.R2 | Gene-Specific DNA Methylation Profiles in Pediatric Medulloblastomas<br><a href="#">View Submission</a><br>Submitting Author: Ozer, Erdener<br><a href="#">Cover Letter</a> | 29-Jun-2021 | 29-Jun-2021 |
| Accept as is (05-Jul-2021)      |                |                                                                                                                                                                             |             |             |
| Complete Contributor Form       |                |                                                                                                                                                                             |             |             |
| <a href="#">Contact Journal</a> |                |                                                                                                                                                                             |             |             |
| ADM: Narula, Taru               | PDP-21-0076.R1 | Gene-Specific DNA Methylation Profiles in Pediatric Medulloblastomas<br><a href="#">View Submission</a><br>Submitting Author: Ozer, Erdener                                 | 04-Jun-2021 | 04-Jun-2021 |
| Minor                           |                |                                                                                                                                                                             |             |             |

### Dergi İndeksi

Journal Home Browse Journal Journal Info Stay Connected Submit Paper Search

### Abstracting and Indexing

This journal is included in the following abstracting and indexing databases.

- Adis International
- Clarivate Analytics: Science Citation Index Expanded (SCIE)
- EBSCO
- Gale: InfoTrac Custom
- PubMed: MEDLINE
- SCOPUS

Also from SAGE Publishing

CQ Library  
American political resources

Data Planet  
A universe of data

Lean Library  
Increase the visibility of your library

SAGE Business Cases  
Real-world cases at your fingertips

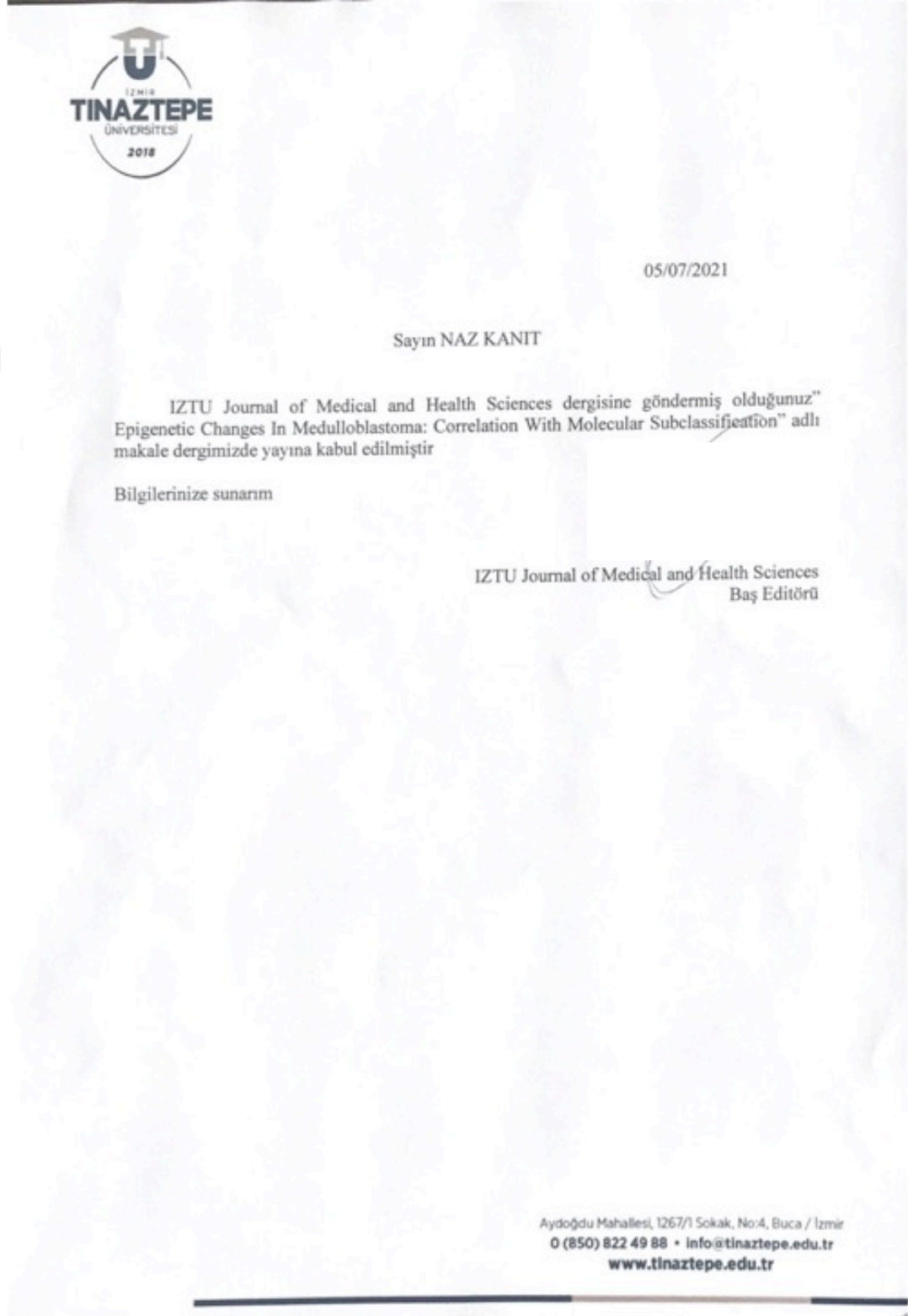
## Pediatric and Developmental Pathology

### Gene-Specific DNA Methylation Profiles in Pediatric Medulloblastomas

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Journal:                      | <i>Pediatric and Developmental Pathology</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Manuscript ID:                | PDP-21-0076.R2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Manuscript Type:              | Original Manuscript                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Date Submitted by the Author: | 29-Jun-2021                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Complete List of Authors:     | Kanit, Naz; Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Molecular Medicine<br>Uysal Yoca, Özge; Dokuz Eylul University School of Medicine, Medical Biology and Genetic<br>Ince, Dilek; Dokuz Eylul University Institute of Oncology, Clinical Oncology<br>Olgun, Nur; Dokuz Eylul University Institute of Oncology, Clinical Oncology<br>Ozer, Erdener; Dokuz Eylul University School of Medicine, Pathology                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Keywords:                     | DNA methylation, epigenetic, medulloblastoma, pyrosequencing, WNT pathway, SHH pathway                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Abstract:                     | <p><b>Introduction:</b> Medulloblastoma is the most common pediatric central nervous tumor of high malignancy that has been classified into both histological subtypes and molecular subgroups by the 2016 World Health Organization classification. However, there is a still need to understand the genomic characteristics and predict the clinical course. The aim of the study is to investigate the significance of the methylation profiles in molecular subclassification and precision medicine of the disease.</p> <p><b>Methods:</b> The study enrolled 47 pediatric medulloblastoma patients. DNA methylation levels of KLF4, SPINT2, RASSF1A, EZH2, ZIC2, and PTCH1 genes were analyzed using methylation-specific pyrosequencing. The significance of the statistical relationship between methylation profiles and clinicopathological parameters including molecular subgroups and histological subtypes, the status of metastasis, and event-free survival were analyzed.</p> <p><b>Results:</b> DNA methylation analysis demonstrated that KLF4, PTCH1, and ZIC2 hypermethylation were associated with the SHH-activated subgroup, whereas both SPINT2 and RASSF1A hypermethylation were associated with metastatic disease. EZH2 gene was not methylated in any of the samples.</p> <p><b>Conclusion:</b> We think that customized DNA methylation profiling may be a useful tool in the molecular subclassification of pediatric medulloblastoma and a potential technical approach in precision medicine.</p> |

<https://mc.manuscriptcentral.com/pedpath>

2) Yayınlanmak üzere kabul edildi.



## Dergi İndeksi

← → ↻ dergipark.org.tr/en/pub/iztujmhs ☆ 🔍 🌐 📧 📧 📧 📧 📧 📧



İZTÜ  
TIP VE SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ  
JOURNAL OF MEDICAL AND HEALTH SCIENCE

hosted by  
**DergiPark**  
AKADEMİK

### IZTU Journal of Medical and Health Sciences

Period Tri-annual | Founded: 2020 | Publisher İzmir Tınaztepe Üniversitesi |

PDF Download | New Issue | Next Issue 2021



Archive

RSS

English

Search in the journal 🔍

Login

Submit Article

Send Reviewer Request

# EPIGENETIC CHANGES IN MEDULLOBLASTOMA: CORRELATION WITH MOLECULAR SUBCLASSIFICATION

**Running Title: EPIGENETIC CHANGES IN MEDULLOBLASTOMA**

Naz KANIT <sup>1</sup>

Erdener OZER <sup>1,2</sup>

- 1) Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, Balçova, Izmir/TURKEY
- 2) Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Pathology, Balçova, Izmir/TURKEY
- 3)

## **Epigenetic Changes in Medulloblastoma: Correlation With Molecular Subclassification**

### **Abstract**

Medulloblastoma is a malignant childhood brain tumor and shows high clinical heterogeneity among patients. Three major molecular categories of MB have been established; WNT activated group, SHH activated group, and non-WNT/non-SHH-activated group. The latter includes Group 3 and Group 4. All groups show different histological features as well as different genetic and epigenetic backgrounds. Genetic basis of the disease has been widely studied in the last decade, however epigenetic basis of the disease has become a trend research area. The epigenetic researches focus on histone modification mechanisms involving some genes such as *KDM6A* and *EZH2*, and also PRC2 complex, in addition to variations in ATP-dependent chromatin remodeling complexes, mainly on SWI/SNF complexes. *EZH2* is a candidate target gene as its repressors are currently on trial for MB patients. Finally lncRNA, a noncoding RNA is likely to be the most promising subgroup specific marker. Understanding both genetic and epigenetic differences in medulloblastomas, determining subtype-specific alterations and discovering therapeutics that specifically targets those alterations might be valuable for management of this cancer. In this review, we aimed to address the epigenetic mechanisms in medulloblastomas in the light of the current literature and emphasize the relevant unpublished data in our preliminary study.

**Keywords:** medulloblastoma, DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling, lncRNA

### 3) Dergiye gönderildi.



**Dustri-Verlag**

*Clinical Neuropathology*

- Welcome
- Login/Logout
- Edit Profile
- Authors Zone
  - Online Submission
  - My Manuscripts
- Search
- Imprint

**1. OVERVIEW [ 301426 - 1 ]**

**Download:** Methylation Profiling of Specific Genes in Ependymomas  
301426\_1\_Consestform.pdf

**Present Status:** Submitted

**Date Submitted:** 2021-07-01

**Reviews:**

| COMMENT | DOWNLOAD | DATE |
|---------|----------|------|
|         |          |      |

**Last Edited:**

**2. TYPE, TITLE & ABSTRACTS**

**Manuscript Type:** Tumor

**Manuscript Title:** Methylation Profiling of Specific Genes in Ependymomas

**Running Head:** Methylation profiles of ependymomas

**Abstract:**  
 Ependymomas are neuroepithelial tumors of the central nervous system with heterogeneous biology and clinical course. The present study aims to investigate the methylation status of ependymomas and address their relationships with the histological type, patient age, and anatomic location of the tumor. DNA methylation profiles of CDKN2A, RASSF1A, KLF4, and ZIC2 genes were quantitatively analyzed with pyrosequencing in 44 ependymoma tumor tissues. The methylation analyses for CDKN2A revealed no methylation change in overall cases. Of the optimal 31 analyses for ZIC2 methylation, 10 were hypermethylated (32.3%) and this change was significantly observed in adult spinal ependymomas. KLF4 hypermethylation was observed in 6 of the overall 35 optimal analyses, however, there was no statistical significant relation of the methylation status with the histological subtype, age group or tumor location. RASSF1A hypermethylation was observed in overall 40 optimal analyses with varying methylation levels. Higher levels of hypermethylation were significantly related to anaplastic histology and spinal ependymomas. The pediatric cases with anaplastic histology and adult cases with spinal location showed significantly increased RASSF1A hypermethylation levels. We conclude that DNA methylation changes may have biological importance in ependymomas. Both ZIC2 and RASSF1A methylation status may be useful parameters in the molecular subclassification of ependymomas.

**Authors:** Naz Kanit, Pelin Yalcin, Serhat Erbayraktar, Erdener Ozer

### Dergi İndeksi

[dustri.com/nc/journals-in-english/mag/clinical-neuropathology.html](https://dustri.com/nc/journals-in-english/mag/clinical-neuropathology.html)



**Dustri-Verlag**

Publications (monthly)

- Subscribe
- Subscription Plan
- Alerts
- Instructions for Authors
- Submit Article Online
- Aims and Scope
- Editorial Board
- Legal
- Article Search
- Contact
- Login



**ISSN 0722-5091**

**Characterization:**  
 Clinical Neuropathology appears bi-monthly and publishes reviews and editorials, original papers, short communications and reports on recent advances in the entire field of clinical neuropathology. Papers on experimental neuropathologic subjects are accepted if they bear a close relationship to human diseases. Correspondence (letters to the editors) and current information including book announcements will also be published.

**Indices:**  
 This journal is regularly covered in Current Contents, Science Citation Index, Medline, Index Medicus, EMBASE/Excerpta Media, Elsevier Biobase/Current Awareness in Biological Sciences and SCOPUS.

**Official Organ of the European Confederation of Neuropathological Societies:**  
 Internet: [www.euro-cns.org](http://www.euro-cns.org)

## Methylation Profiling of Specific Genes in Ependymomas

**Running Title:** Methylation profiles of ependymomas

**Naz Kanit, MSc<sup>1</sup>, Pelin Yalcin, MSc<sup>2</sup>, Serhat Erbayraktar, MD<sup>3</sup>, Erdener Ozer, MD, PhD<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Department of Molecular Medicine, Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Izmir, Turkey

<sup>2</sup> Department of Medical Biology and Genetics, Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Izmir, Turkey

<sup>3</sup> Department of Neurosurgery, Dokuz Eylul University School of Medicine, Izmir, Turkey

<sup>4</sup> Department of Pathology, Dokuz Eylul University School of Medicine, Izmir, Turkey

### Abstract

Ependymomas are neuroepithelial tumors of the central nervous system with heterogeneous biology and clinical course. The present study aims to investigate the methylation status of ependymomas and address their relationships with the histological type, patient age, and anatomic location of the tumor. DNA methylation profiles of *CDKN2A*, *RASSF1A*, *KLF4*, and *ZIC2* genes were quantitatively analyzed with pyrosequencing in 44 ependymoma tumor tissues. The methylation analyses for *CDKN2A* revealed no methylation change in overall cases. Of the optimal 31 analyses for *ZIC2* methylation, 10 were hypermethylated (32.3%) and this change was significantly observed in adult spinal ependymomas. *KLF4* hypermethylation was observed in 6 of the overall 35 optimal analyses, however, there was no statistically significant relation of the methylation status with the histological subtype, age group or tumor location. *RASSF1A* hypermethylation was observed in overall 40 optimal analyses with varying methylation levels. Higher levels of hypermethylation were significantly related to anaplastic histology and spinal ependymomas. The pediatric cases with anaplastic histology and adult cases with spinal location showed significantly increased *RASSF1A* hypermethylation levels. We conclude that DNA methylation changes may have a biological importance in ependymomas. Both *ZIC2* and *RASSF1A* methylation status may be useful parameters in the molecular subclassification of ependymomas.

**Keywords:** DNA methylation, ependymoma, epigenetics, pyrosequencing

## EK-2: ETİK KURUL ONAYI

### DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI

|                     |                                                                         |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| ETİK KOMİSYONUN ADI | DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ                                                |
| AÇIK ADRES          | GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU                            |
| TELEFON             | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR |
| FAKS                | 0 232 412 22 54-0 232 412 22 58                                         |
| E-POSTA             | 0 232 412 22 43<br>etikkurul@deu.edu.tr                                 |

|                   |                                                         |                                                                                                                                                           |
|-------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | DOSYA NO:                                               | 3648-GOA                                                                                                                                                  |
|                   | ARAŞTIRMA                                               | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/><br>YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/> |
|                   | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                   | Çocukluk Çağı Medulloblastomlarında Moleküler Alt Sınıflandırma                                                                                           |
|                   | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                 |                                                                                                                                                           |
|                   | SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI | Prof.Dr.Erdener ÖZER<br>Patoloji A.D                                                                                                                      |
|                   | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ                             | -                                                                                                                                                         |
|                   | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ VE ADRESİ              | -                                                                                                                                                         |
|                   | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                           | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>                                                                      |

|                          |                                     |        |                   |                                                                                                              |
|--------------------------|-------------------------------------|--------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | Belge Adı                           | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili                                                                                                         |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR      | Mevcut |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | OLGU RAPOR FORMU                    | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                  |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| KARAR BİLGİLERİ             | Karar No:2017/26-23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Tarih:09.11.2017 |
|                             | Prof.Dr.Erdener ÖZER'in sorumlusu olduğu "Çocukluk Çağı Medulloblastomlarında Moleküler Alt Sınıflandırma" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. |                  |
| <b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                  |
| ÇALIŞMA ESASI               | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu                                                                                                                                                                                                                                   |                  |
| <b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                  |

| Unvanı/Adı/Soyadı                            | Uzmanlık Alanı                                       | Kurumu                                                             | Cinsi yet | Araştırma ile ilişkili mi? |                                       | İmza |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------|---------------------------------------|------|
| Prof.Dr.Banu ÖNVURAL<br>(Başkan)             | Tıbbi Biyokimya                                      | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU<br>(Başkan Yardımcısı) | Halk Sağlığı                                         | DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.                                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU                  | Kalp Damar Cerrahisi                                 | DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Sevinç ERASLAN                       | Endokrinoloji                                        | DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK                   | Tıbbi Mikrobiyoloji                                  | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Müge KIRAY                           | Fizyoloji                                            | DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı                          | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER                    | Anesteziyoloji                                       | DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Süleyman SARIOĞLU                    | Patoloji                                             | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.                              | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Bilge KARA                           | Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon                       | DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Sefa KIZILDAG                        | Tıbbi Biyoloji ve Genetik                            | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.                   | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Ayhan ABACI                          | Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.M.Aylin ARICI                         | Tıbbi Farmakoloji                                    | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı                  | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Murat BEKTAŞ                          | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği            | DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Uzm.Dr.Ahmet Can BILGIN                      | Hukuk                                                | DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.                                        | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Mehmet Erhan ÖZKUL                           | Sağlık mensubu olmayan üye                           | D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler                               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |

## KATKI

Bu tez çalışması **YÖK 100/2000 Doktora Bursu** kapsamında Moleküler Patoloji alt alanından kabul almış olup tez çalışmasını yürüten doktora öğrencisi YÖK 100/2000 bursuyla desteklenmiştir.

Tezin deneysel çalışmaları için gerekli bütçe **Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü** tarafından 2019213 numaraları proje ile sağlanmıştır. Bu proje ile aynı zamanda doktora öğrencisi için burs katkısı sağlamıştır.



# ÖZGEÇMİŞ

## NAZ KANIT

### Kişisel Bilgiler

#### İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

#### Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2017 - Şu Anda (3 yıl 11 ay)  
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)  
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.96 / 4.0

01 Eylül 2012 - 01 Haziran 2014 (1 yıl 10 ay)  
Yüksek Lisans, Tezli Program, İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ-GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ  
(YL) (TEZLİ)  
Tez Başlığı: Characterization Of Pathogenicity Traits And Trichothecene Production  
In The Wheat Pathogen Fusarium Culmorum  
Tez Konusu: Fusarium Culmorum'un Buğdaydaki Patojenitesinin, Fonksiyonu  
Bilinmeyen Genlerin Araştırılması İle Anlaşılması Ve Farklı Kimyasallar Varlığında  
Büyüyen F. Culmorum'ların Trichothecene Yol İzindeki Değişikliklerinin Gen  
Ekspresyonu Ve Toksin Analizleriyle Belirlenmesi.  
Tarih: 2014  
Tez Danışmanı: ZEYNEP PETEK ÇAKAR  
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.88 / 4.0

01 Eylül 2007 - 01 Ağustos 2012 (5 yıl)  
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

01 Eylül 2003 - 01 Haziran 2007 (3 yıl 10 ay)  
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI İL MİLLÎ EĞİTİM MÜDÜRLÜKLERİ VE OKULLAR İZMİR  
İLİNDEKİ OKULLAR BORNOVA İLÇESİNDEKİ OKULLAR BORNOVA ANADOLU LİSESİ,  
TÜRKİYE

#### Yabancı Dil Bilgileri

İTALYANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

## Ar-Ge Yetkinlik

### Bildiriler

N. KANIT & E. ÖZER, Molecular Classification of Pediatric Medulloblastoma and its Clinical Importance., Poster Sunumu, 8th Multidisciplinary Cancer Research Congress, 16 Ocak 2021, 17 Ocak 2021.

N. KANIT, H. N. OLGUN & E. ÖZER, Molecular Subclassification of Pediatric Medulloblastomas., Poster Sunumu, VII. Rare Tumors Symposium, 28 Şubat 2020, 01 Mart 2020.

N. KANIT, N. E. DAL, U. KARABAY, G. H. İŞLEKEL & E. ÖZER, Harmonisation Of Orpheus Phd Programme, Cohe 100/2000 Scholarship And Institutional Regulations In Dokuz Eylül University: The Student Perspective, Poster Sunumu, Workshop On Phd Supervision In Biomedicine And Health Sciences: Orpheus Perspective, 21 Haziran 2018, 22 Haziran 2018.

G. TUNA, N. E. DAL, N. KANIT, U. KARABAY & G. H. İŞLEKEL, Molecular Medicine Orpheus-phd Program In Dokuz Eylül University Graduate School Of Health Sciences, Poster Sunumu, Workshop On Phd Supervision In Biomedicine And Health Sciences: Orpheus Perspective, 21 Haziran 2018, 22 Haziran 2018.

## TÜBİTAK Burs ve Destekleri

### BİDEB Destekleri

NAZ KANIT, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2017 - 1, 01.04.2017 - 30.09.2020.

### Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

|                                             |               |          |          |
|---------------------------------------------|---------------|----------|----------|
| Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |
| İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı              | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |
| Raportörlük Sayısı                          | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |