

ELİF NUR BOZDAĞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

GLİAL TÜMÖRLERDE
DNA METİLASYON ANALİZİ VE
GENETİK VARYASYONLARIN BELİRLENMESİ

ELİF NUR BOZDAĞ

DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA SIRMA EKMEKÇİ

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

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

Elif Nur BOZDAĞ

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında “Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi” Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF

Canım kızım Damla'ma...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her zaman ilgi ve sevgiyle yaklaşarak tecrübe ve bilgileri ile bana akademik hayatımda yol gösteren, tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için sağladığı tüm imkânlar için, rehberliğinde çok şey öğrendiğim değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekci'ye çok teşekkür ederim.

Akademik eğitimimde sağladığı katkı ve emeklerinden dolayı değerli hocam ve tez jüri üyem Sayın Prof. Dr. Neslihan Abacı'ya gösterdiği ilgi ve alaka için teşekkür ederim.

Tez çalışmamın temelini oluşturan hasta örneklerini sağlayan, hasta verilerini paylaşan ve tez izleme komitemde bulunan Bezmialem Üniversitesi Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı ikinci tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Aziz Hatipoğlu'na tez çalışmamın ilerlemesine değerli yorumlarıyla sağladığı katkılar için çok teşekkür ederim.

Tecrübeleriyle yanımda olan ve yol gösteren laboratuvarımızdaki değerli hocalarım Doç. Dr. Ferda Paçal'a ve Dr. Aris Çakiris'e bilim insanı kimliği ve deney tecrübesini örnek aldığım Dr. Öğretim Görevlisi Zeliha Emrence ve doktora serüveninde birlikte ilerlediğim her zaman desteğini hissettiğim sevgili MSc. Burcu Salman 'a, Genetik Bölümü Laboratuvar 2'de ailem olarak görüp çok sevdiğim her türlü desteği ve özgüveni bana veren MSc. Şeyma Punar, Msc. Büneyan Tüzün, MSc. Berk İleri, Arş. Gör. Bahadır Kasap, Hümeysra Karaca, MSc. Sümbül Gezer, MSc. Büşra Karaçam'a, doktora başladığım ilk günden bu yana manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim dostum Arş. Gör. Hazal Banu Çelebioğlu'na ve Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik bölümünde görevli olan tüm hocalarıma, eğitime devam eden yolumuzun kesiştiği tüm arkadaşlarıma ve stajyerlerimize

Doktora eğitimim ve tez çalışma süreçlerimde yanımda olan, sevgilerini daima hissettiğim başta hayatımı paylaştığım sevgili eşim Sabri Bozdağ'a ve canım ailem; babam Kudret Özkaya, annem Hacer Özkaya, ikizim Ferhat Yasin ve eşi Fadime Özkaya, kız kardeşim Özge Özlem ve eşi Faruk Özkaya'ya bu süreçte dünyaya gelen prenses kızım Damla'ya, tez döneminin son aylarını aynı bedende geçirdiğim minik oğluma

Sonsuz Teşekkür Ederim...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-38142



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beyin Tümörleri, Glial tümörler ve Epidemiyolojisi.....	3
2.2. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Mekezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflama Kriterleri ..	4
2.2.1. Astrositom, <i>IDH</i> -mutant	5
2.2.2. Oligodendroglioma	6
2.2.3. Glioblastoma, <i>IDH</i> -yabanıl tip.....	6
2.3. Gliomalarda Bulunan Karakteristik Genetik Değişimler.....	6
2.3.1. <i>IDH1/IDH2</i> Mutasyonları	7
2.3.2. <i>TERT</i> Mutasyonları	8
2.3.3. <i>ATRX</i> Mutasyonları.....	9
2.3.4. <i>CIC</i> Mutasyonları.....	9
2.3.5. <i>EFGR</i> Mutasyonları	10
2.3.6. <i>BRAF</i> Mutasyonları.....	10
2.3.7. <i>TP53</i> Mutasyonları.....	11
2.3.8. Diğer Genetik Değişimler	11
2.4. Glial tümörlerde DNA Metilasyonu	12
2.4.1. <i>MGMT</i> Geni Metilasyonu	13
2.5. Glial Tümörlerde Yeni Nesil Dizileme.....	13
2.5.1. Hedefli Gen Panelleri.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15

3.1. Gereç	15
3.1.1. Hasta Gruplarının Oluşturulması	15
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tampon ve Çözeltiler.....	15
3.1.3. Kullanılan Kitler	16
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Periferik Kan Örneklerinden Lökosit Hücrelerin İzolasyonu	18
3.2.2. DNA İzolasyonu	18
3.2.2.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	18
3.2.2.2. Tümör Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	18
3.2.3. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi	19
3.2.4. RNA İzolasyonu.....	20
3.2.5. cDNA sentezi	21
3.2.6. Primer Tasarımı ve Housekeeping Gen Seçimi	21
3.2.7. qRT-PZR Tekniği ile <i>ATRX</i> ve <i>NF1</i> Genlerinin Ekspresyon Analizi	22
3.2.8. <i>CIC</i> Geni Primer Tasarımı ve PZR	23
3.2.9. DNA Metilasyon Analizi	25
3.2.9.1. İn Vitro Metilasyon.....	25
3.2.9.2. Sodyum Bisüfit Modifikasyonu	25
3.2.9.3. <i>MGMT</i> Geni Promotör Bölgesi Geni Primer Tasarımı	26
3.2.9.4. Metilasyon Spesifik RT-PZR.....	27
3.2.10. Yeni Nesil Dizileme Kütüphane Hazırlığı ve Dizileme.....	28
3.2.10.1. Dizileme Öncesi DNA Kalitesinin Belirlenmesi	28
3.2.10.2. Yeni Nesil Dizileme Kütüphane hazırlığı	28
3.2.11. Yeni Nesil Dizileme Verileri Analizi.....	33
3.2.12. Yeni Nesil Dizileme Sonuçlarının Sanger ile Doğrulanması.....	34
3.2.13. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Glial Tümörlü Hastaların Demografik, Patolojik Bilgileri ve Sınıflaması	36
4.2. Düşük ve Yüksek Evreli Hastalarda <i>ATRX</i> ve <i>NF1</i> Gen Ekspresyon Analizi.....	37
4.3. Oligodendroglioma ve Diğer Glial Tümörlerde <i>CIC</i> Geni Mutasyon Analizi	41
4.4. <i>MGMT</i> Geni Promotör Bölge Metilasyon Analizi.....	42
4.5. Düşük ve Yüksek Evreli Hastalarda Yeni Nesil Dizileme Sonuçları	44

4.5.1. YND Analizi Sonucuda Saptanan Patojenik Varyantlar.....	45
4.5.2. YND Analizi Sonucunda Klinik Önemi Bilinmeyen Varyatlar.....	47
4.5.3. YND Analizi İle Saptanan Benign Varyantlar.....	47
4.5.4. YND Analizi İle Saptanan Kopya Sayısı Değişimleri.....	48
4.5.5. YND Sonuçlarının Sanger Dizileme İle Doğrulanması.....	49
4.6. Hastaların Genetik Verileri ile Klinik ve Patolojik Özelliklerin Karşılaştırılması 53	
4.6.1. <i>ATRX</i> Ekspresyon Verileri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması.....	53
4.6.2. <i>NF1</i> Ekspresyon Verileri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması	54
4.6.3. Yaş İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması	55
4.6.4. Mitoz Değeri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması	56
4.6.5. Ki67 Değeri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması.....	57
4.6.6. Evre İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması	59
4.6.7. VEP İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması	60
4.6.8. Nekroz Verileri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması	61
4.7. Sağkalım Analizi.....	62
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	73
HAM VERİLER	86
FORMLAR	88
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	93

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Gliomaların derecelendirilmesi (8)	5
Tablo 2-2: Glial tümörlerin karakteristik genetik değişimleri	6
Tablo 3-1: cDNA reaksiyonu bileşenleri	21
Tablo 3-2: qRT-PZR’de kullanılan primer dizileri	21
Tablo 3-3: qRT-PZR koşulları	22
Tablo 3-4: <i>CIC</i> geni R215W/Q varyasyonunu saptamak için kullanılan primer dizileri	24
Tablo 3-5: PZR bileşenleri	24
Tablo 3-6: PZR koşulları	24
Tablo 3-7: DNA bisülfid dönüşümü koşulları	25
Tablo 3-8: <i>MGMT</i> geni promotör bölgesi primer listesi	27
Tablo 3-9: MS RT-PZR reaksiyon bileşenleri	27
Tablo 3-10: MS RT-PZR reaksiyon koşulları	27
Tablo 3-11: DNA kalite kontrolü için real time PZR bileşenleri	28
Tablo 3-12: RT- PZR Koşulları	28
Tablo 3-13: DNA Fragmentasyonu protokolü	29
Tablo 3-14: Uç tamiri için uygulanan koşullar	29
Tablo 3-15: Ligasyon 1 aşaması termal döngü programı	31
Tablo 3-16: Ligasyon 2 aşaması termal döngü programı	31
Tablo 3-17: Ligasyon temizleme aşaması sırasında uygulanan koşullar	32
Tablo 3-18: İlk PZR programı	32
Tablo 3-19: İkinci PZR programı	33
Tablo 3-20: <i>FOXL2</i> ve <i>FBXW7</i> genleri primerleri	34
Tablo 3-21: PZR bileşenleri	34
Tablo 3-22: Sanger doğrulama için PZR koşulları	34
Tablo 4-1: Glial tümörlü hastaların demografik ve patolojik bilgileri	36
Tablo 4-2: Patojenik varyant bulunan genler	45
Tablo 4-3: VUS varyantların gen listesi	47
Tablo 4-4: Benign varyantların gen listesi	48
Tablo 4-5: Kopya sayısı artışı bulunan genler	48

Tablo 4-6: Tümör dokusunda <i>ATRX</i> ekspresyonu ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması	53
Tablo 4-7: Tümör dokusunda <i>NF1</i> ekspresyonu ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması	54
Tablo 4-8: Hastalarının yaşları ile genetik özelliklerinin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması.....	55
Tablo 4-9: Mitoz ile genetik özelliklerinin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması	57
Tablo 4-10: Ki67 ile genetik özelliklerin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması ...	58
Tablo 4-11: Evre ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması.....	59
Tablo 4-12: VEP ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması.....	60
Tablo 4-13:Nekroz verileri ile genetik özelliklerin Ki-kare testi karşılaştırması	61
Tablo 4-14: Faktöre bağlı Log Rank testi ile sağkalım analizi.....	62
Tablo 4-15: Faktöre göre ortalama sağkalım gün değerleri.....	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: MSS tümörlerinin alt gruplarının dağılımı.....	3
Şekil 2-2: <i>IDH1/2</i> genlerinin yabancıl tip ve mutattı durumlarındaki fonksiyonları	8
Şekil 2-3: <i>EGFR</i> hücrel sinyal yolları	10
Şekil 3-1: Qubit 2.0 cihazı ile DNA konsantrasyon tayini	20
Şekil 3-2: <i>ATRX</i> , <i>NF1</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait melting eğrileri	23
Şekil 3-3: cBioPortal for Cancer Genomics verilerine göre <i>CIC</i> geni mutasyonlarının dağılımı	23
Şekil 3-4: Tüplerin magnetik stant üzerine yerleştirilmesi	30
Şekil 4-1: Cinsiyete göre glial tümör alt sınıf dağılımı	37
Şekil 4-2: <i>ATRX</i> gen ekspresyon analizi	38
Şekil 4-3: <i>NF1</i> gen ekspresyon analizi	39
Şekil 4-4: <i>ATRX</i> ve <i>NF1</i> gen ekspresyonlarının korelasyonu.....	40
Şekil 4-5: <i>CIC</i> geni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	41
Şekil 4-6:Glial 1 nolu hastanın (Oligodendroglioma) <i>CIC</i> geni Sanger dizileme sonucu	41
Şekil 4-7: Glial 1 nolu hastanın tümör dokusunda <i>CIC</i> geni Sanger dizileme sonucu...	42
Şekil 4-8: MS-RT PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 4-9: <i>MGMT</i> metilasyonu ısı haritası.....	43
Şekil 4-10: Evre 2 ve Evre 4 hastalarda <i>MGMT</i> metilasyon düzeylerinin karşılaştırılması	43
Şekil 4-11: Hastalarda yeni nesil dizileme ile saptanan genetik değişimler.....	44
Şekil 4-12: Hastalarda saptanan patojenik varyantlar.....	45
Şekil 4-13: Glial 17 nolu hasta <i>MDM2</i> CNV sonucu	49
Şekil 4-14: Glial 7 nolu hasta <i>EGFR</i> CNV sonucu	49
Şekil 4-15: <i>FOXL2</i> ve <i>FBXW7</i> genlerinin PZR ürünü agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 4-16: <i>FOXL2</i> genindeki varyantın (NM_023067.4 (<i>FOXL2</i>):c.536C>G (p.Ala179Gly)) yeni nesil dizileme görüntüsü	50
Şekil 4-17: <i>FBXW7</i> genindeki varyantın (NM_018315.4:c.345-6_345-5del) yeni nesil dizileme görüntüsü.....	51
Şekil 4-18: <i>FOXL2</i> NM_023067.4 (<i>FOXL2</i>):c.536C>G (p.Ala179Gly) varyantının olduğu bölgenin sanger dizileme sonucu.....	51

Şekil 4-19: <i>FOXL2</i> NM_023067.4 (<i>FOXL2</i>):c.536C>G (p.Ala179Gly) varyantı için sanger dizileme sonucunun Blast analizi	52
Şekil 4-20: <i>FBXW7</i> geni NM_018315.4:c.345-6_345-5del delesyonunun sanger dizileme ile gösterilmesi	52
Şekil 4-21: <i>FBXW7</i> geni NM_018315.4:c.345-6_345-5del delesyonu için yapılan sanger dizileme sonucunun blast analizi	52
Şekil 4-22: <i>HNF1A</i> mutasyonun sağkalım üzerine etkisi	64
Şekil 4-23: Tümör dokusundaki <i>ATRX</i> ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi.....	64
Şekil 4-24: Tümör dokusundaki <i>NF1</i> ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi	65
Şekil 4-25: <i>MGMT</i> metilasyonun sağkalım üzerine etkisi.....	65
Şekil 4-26: <i>CDK4</i> amplifikasyonun sağkalım üzerine etkisi.....	66

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADD	ATRX-DNMT3-DNMT3L
AKT1	Rho ailesi-alfa serin/treonin-protein kinaz
ALT	Alternatif bir telomer uzatma
ATP	Adenozin trifosfat
ATRX	α talasemi/mental retardasyon sendromu X'e bağlı
bç	Baz çifti
BRAF	B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Treonin Kinaz
cDNA	Komplementer DNA
CDK4	Siklin bağımlı kinaz 4
CDKN2A /B	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A/B
CIC	Capicua transkripsiyonel baskılayıcı
CNV	Kopya sayısı değişimi
CpG	Sitozin-fosfat-guanin
Ct	Döngü Eşik Değeri (Cycle threshold)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleosit trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
D-2-HG	D-2-hidroksiglutarat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptör
FGFR3	Fibroblast büyüme faktör reseptör
FUBP1	Uzak yukarı bölge elemanı bağlama protein 1
GFAP	Glial fibriler asidik protein
HCl	Hidroklorik Asit
HNF1A	Hepatosit Nükleer Faktör-1 Alfa
H3K9me3	Histon 3 lizin 9 bölgesi metilasyonu
IDH1/2	İzositrat dehidrogenaz 1/2

İndel	Eklenme/kayıp mutasyonu
μL	mikrolitre
Kİ-67	proliferasyon indeksi
<i>MDM2</i>	E3 ubiquitin protein ligaz homologu
mRNA	Mesajcı RNA
<i>MGMT</i>	O6-Metillguanin-DNA Metiltransferaz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
<i>MYB</i>	Myb proto-onkogen
<i>MYBL1</i>	MYB proto-onkogen benzeri 1
<i>NF1</i>	Nörofibromatozis tip 1
NaOH	Sodyum hidroksit
<i>NOTCH1</i>	Nörojenik lokus çentik homolog protein 1
Olig2	Oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR:	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
<i>PDGFRA</i>	Platelet-türevli büyüme faktörü reseptörü A
<i>PI3K</i>	Fosfatidilinositol 3-kinazlar
<i>PTEN</i>	Fosfataz ve tensin homologu
<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1
SNV	Tek nükleotid değişimi
SWI/SNF	Switch /Sakkaroz Fermente Olmayan
<i>TERT</i>	Telomeraz ters transkriptaz
<i>TP53</i>	Tümör Proteini 53
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEP	Vasküler Endotelyal Proliferasyon
YND	Yeni nesil dizileme
α -KG	α -Ketoglutarat

ÖZET

Bozdağ, E.N. (2023). Glial Tümörlerde DNA Metilasyon Analizi ve Genetik Varyasyonların Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Malign primer beyin tümörlerinin en yaygın alt sınıfı glial tümörlerin sınıflama kriterleri Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2021 yılında güncellenmiştir. Güncel sınıflama kriterlerinde glial tümörler için yetişkin tip difüz gliomlar; *IDH* mutasyonuna sahip astrositoma, oligodendroglioma ve *IDH* mutant olmayan glioblastoma alt sınıfını içermektedir. Evre 2, 3, 4 *IDH* mutant astrositomaların moleküler değişimleri *IDH1/2*, *ATRX*, *TP53*, *CDKN2A*'dır. Oligodendroglioma karakteristik değişimleri; 1p/19q kodelesyonu, *IDH*, *CIC*, *FUBP1*, *NOTCH1* gen mutasyonlarıdır. Evre 4 *IDH* mutant olmayan glioblastomalar için ana moleküler belirteçler; *EGFR* mutasyonları, kromozom 7 ve/veya 10p heterozigotluk kaybı ve *TERT* geni promotör mutasyonudur. Ayrıca 2021 sınıflama kriterlerinde epigenetik değişimlerin de sınıflama için önemi vurgulanmaktadır. Bu çalışmada Türk populasyonunda yüksek ve düşük evreli glial tümörlerdeki somatik varyasyonların yeni nesil dizileme (YND) tabanlı hedefe yönelik solid tümör paneli ile analizi amaçlanmıştır. Panelde bulunmayan *CIC* geninin oligodendrogliomlarda sık mutasyona uğrayan bölgesi Sanger dizileme ile analiz edilmiştir. *MGMT* geni promotör bölgesinin metilasyon analizleri metilasyon spesifik gerçek zamanlı PZR ile gerçekleştirilmiştir. Hastaların beyin tümör dokusu ve periferik kan örneklerinde *ATRX* ve *NF1* genlerinin ekspresyon analizinde qRT-PZR yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre glial tümör alt grupları arasında *ATRX* ve *NF1* gen ekspresyonlarının arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Oligodendroglioma tanılı bir hastada *CIC* geninde daha önce bildirilmeyen üç nükleotitlik bir delesyon (p.W238del) saptanmıştır. YND analizi ile glial tümörlü hastalarda saptanan *HNF1A* genindeki varyasyonunu (p.Pro291fs) taşıyan hastalarda sağkalım daha yüksek bulunmuştur (p=0,022). YND analizi ile saptanan değişimlerden *IDH1*, *TERT*, *BRAF*, *EGFR*, *PTPN11*, *PTEN* ve *TP53* genlerinde glial tümörlerle ilişkili patojenik varyantlar bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda *FBXW7*, *PIK3CA* ve *VHL* genlerinde klinik önemi bilinmeyen gen varyantları tespit edilmiş ve glial tümörler ile ilişkisinin araştırılması gerektiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glial tümör, Glioblastoma, Metilasyon, Yeni Nesil Dizileme, Kanser Paneli

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-38142

ABSTRACT

Bozdag, E.N. (2023). DNA Methylation Analysis and Determination of Genetic Variations in Glial Tumors. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Doctorate Thesis (PhD). İstanbul.

The classification criteria of glial tumors, the most prevalent subtype of malignant primary brain tumors, were updated by the World Health Organization (WHO) in 2021. Current classifications involve adult-type diffuse gliomas, which include *IDH* mutant-astrocytoma, oligodendroglioma, and *IDH* wild-type glioblastoma. Grade 2,3, and 4 *IDH*-mutant astrocytomas involve *IDH1*, *IDH2*, *ATRX*, *TP53*, and *CDKN2A/B* molecular changes. Characteristic changes of oligodendroglioma include; 1p/19q codeletion, *IDH*, *CIC*, *FUBP1*, and *NOTCH1* gene mutations. *TERT* gene promoter mutations, chromosome 7 and/or 10p heterozygosity, and *EGFR* mutations are the primary molecular markers for grade-4 *IDH*-wild type glioblastomas. Moreover, the importance of epigenetic changes in classification has been emphasized in 2021. This study aimed to analyze somatic variations in high- and low-grade glial tumors in the Turkish population by utilizing next-generation sequencing (NGS)-based targeted solid tumor panels. Sanger sequencing is performed for the hotspot mutation included region of the *CIC* gene, which was absent in this panel, in oligodendrogliomas. Methylation analyses were implemented by methylation-specific real-time PCR on the *MGMT* gene promoter region. Quantitative RT-PCR technique was used to analyze the gene expression of *ATRX* and *NF1* genes in brain tumor tissue and peripheral blood samples of patients. In this regard, our results showed no significant difference between *ATRX* and *NF1* gene expressions between glial tumor subgroups. A novel deletion (p.W238del) was detected in the *CIC* gene of an oligodendroglioma-diagnosed patient. Patients with glial tumors who carried the variant (p.Pro291fs) in the *HNF1A* gene detected by NGS analysis showed significantly higher survival rates ($p = 0.022$). NGS analysis revealed glial tumor-associated pathogenic variants in *IDH1*, *TERT*, *BRAF*, *EGFR*, *PTPN11*, *PTEN*, and *TP53* genes. Moreover, genetic variants of uncertain clinical significance (VUS) were found in *FBXW7*, *PIK3CA*, and *VHL* genes, and our study suggests that these VUS variants and their association with glial tumors need further investigation.

Key Words: Glial tumor, Glioblastoma, Methylation, Next Generation Sequencing, Cancer Panel

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2021-38142

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glial tümörler malign primer beyin tümörlerinin %80'ini oluşturan; Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörlerinin alt sınıfıdır ve “Dünya Sağlık Örgütü” (DSÖ) tarafından belirlenen kriterlere göre sınıflanmakta ve derecelendirilmektedir. 2021 yılında güncellenen sınıflama kriterleri ile daha önce 2016 yılında histopatolojik belirteçlerin yanında entegre edilmiş olan moleküler değişimler genişletilmiş ve epigenetik değişimlerin de önemi vurgulanmıştır.

Her yıl kanser kaynaklı ölümlerin %3'ünü oluşturan beyin, MSS tümörlerinin kötü prognoza sahip glioblastoma alt sınıfı 5 yıllık sağ kalımı yaklaşık %5 olmaktadır. Bu nedenle glial tümörlerin oluşum mekanizmasının aydınlatılması, bilinen moleküler değişimlere karşı tedavi geliştirilmesi, yeni pronostik öneme sahip genetik varyasyonların tanımlanması hastalığın anlaşılması açısından çok önemlidir.

Moleküler değişikliklerin hepsinin incelenebilmesi gelişen ve ilerleyen teknoloji olan yeni nesil dizileme (YND) temelli çalışmalarda daha kapsamlı ortaya konmaktadır. YND ile hedefli gen panelleri günümüzde kanser tanısı için kullanılmaktadır. Glial tümörler için de somatik varyantları belirlemek için birkaç tane gen paneli uygulanmış olup yüksek veri çıktıları hastalığın prognozunu anlaması için önemlidir. YND ile hedeflenen genlerdeki tüm moleküler değişiklikler (“Tek nükleotit değişimi”-“SNV”, “Eklenme/kayıp mutasyonu”-“indel”, “Kopya sayısı değişimi”-“CNV”) bulunabilmektedir. Bu sebeple yeni nesil dizileme multigenetik hastalıkların araştırılmasında daha avantajlıdır.

Glial tümörlerdeki genetik değişimler sınıflama kriterlerine eklense de birçok ülke gibi Türkiye’de de rutin tanıda kullanılmamaktadır. YND ile glial tümörlü hastalar için genetik değişimler belirlenerek moleküler alt sınıflama yapılması ve *MGMT* geni metilasyon durumunun bilinmesi tedavi seçimi ve tedaviye cevabı daha iyi öngörmeyi sağlayacağı gibi biyobelirteçlerin öneminin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında yüksek ve düşük evreli glial tümörlerde moleküler değişimler araştırılarak gliomaların sınıflamasında kullanılan genetik değişiklikleri içeren genler YND ile solid tümör gen panelinde analizi yapılmıştır. 2021 yılında

güncellenen genetik değişimler belirlenerek moleküler sınıflama yapılabilirliği, tanı için genetik değişimlerin gösterilebilirliği ortaya konmaya çalışılmıştır. Ayrıca gliomada klinik önemi tam olarak bilinmeyen genlerin hasta grubumuzda prognostik önemi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada yeni moleküler belirteçlerin saptanması ile glial tümörlerin daha iyi sınıflandırılmasına ve prognozun iyileştirilmesine katkıda bulunmak amaçlanmaktadır.

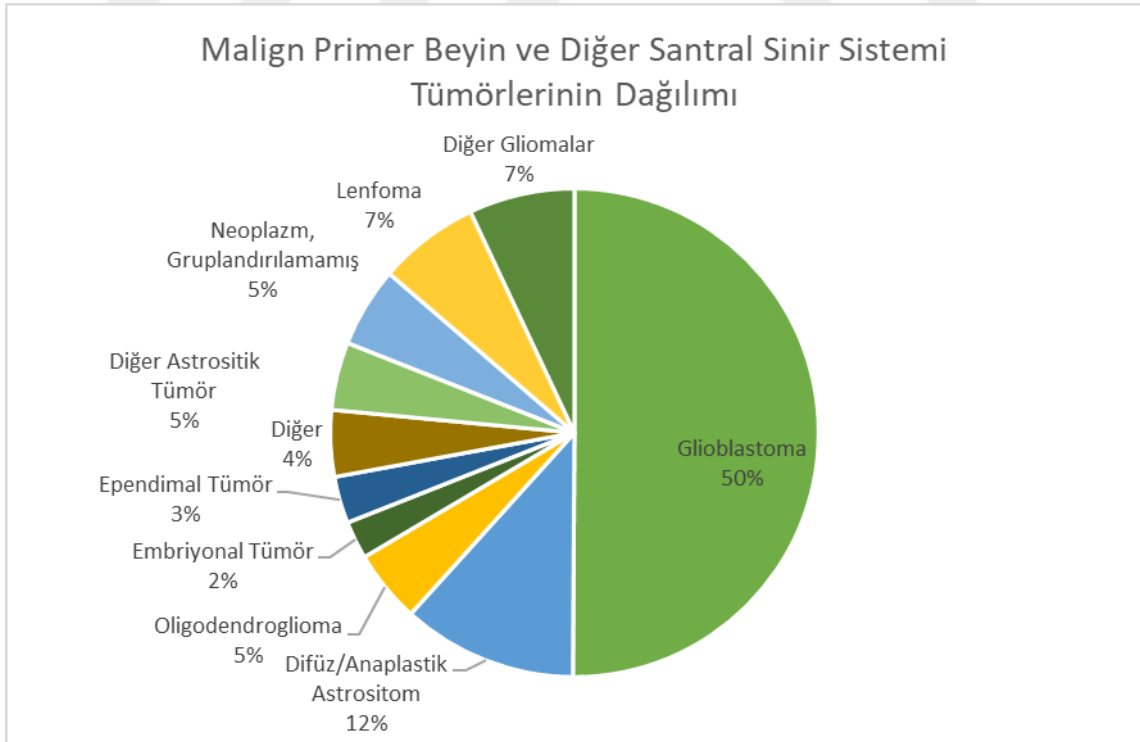
Tez çalışmamızın hedefleri; belirlenen kriterler doğrultusunda Türk popülasyonundaki somatik mutasyonlar solid tümör paneli ile analiz edilerek panelde bulunan patojenik varyant grubundaki varyasyonların prognostik önemleri değerlendirilmiştir. Ayrıca gen panelinde bulunmayan, *IDH* mutant difüz gliomaların alt sınıflamasında kullanılan *ATRX* ve *NF1* genlerinin ekspresyon değişimleri eş zamanlı kantitatif PZR ile belirlenerek astrositoma, oligodendroglioma ve glioblastomanın genetik değişimlerindeki farklılıkları belirlenmiştir. Glial tümörlerde DNA metilasyonun önemini göstermek için *MGMT* geni promoter bölgesi metilasyon spesifik PCR ile DNA metilasyon durumu analiz edilmiştir. *CIC* geni solid tümör gen panelinde bulunmadığı ancak oligodendriogliomada karakteristik moleküler değişim içiren bir gen olduğu için sık görülen mutasyonlar sanger dizileme ile analiz edilmiştir ve diğer gliomalarda sıklığı araştırılmıştır.

Sonuç olarak hastalarda birliktelik gösteren mutasyonlar belirlenerek prognoz üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir ve glial tümörlerin patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ve farklı tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkıda bulunması amaçlanmaktadır. Tanı için moleküler yöntemlerin yaygınlaşması, yüksek ve düşük evreli tümörlere özgü yeni moleküler belirteçlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Tümörleri, Glial tümörler ve Epidemiyolojisi

Beyin tümörleri, merkezi sinir sisteminin (MSS) en yaygın malign primer intrakranial tümörleridir (1). Dünya çapında görülen tüm kanserlerin %1.6'sını oluşturan MSS tümörleri için 2020 yılında belirlenen yeni vaka sayısı 308.102 olarak bildirilmiştir (2). “Globocan 2020” Türkiye verilerine göre 2020 yılında 233.834 yeni kanser vakasının 6102 vakası MSS tümörlerine aittir (2). 2020 yılı Türkiye istatistiklerine göre beyin tümörlerinin ölüm oranı tüm kanser türlerinden ölümün %4'ünü oluşturmaktadır (2). Türkiye'deki yeni kanser vakalarında 12. sırada olan beyin tümörleri ölüm oranı dikkate alındığında 8. sıraya yükselmektedir (2). Glial tümörler ise primer beyin tümörlerinin %80'ini oluşturan alt sınıfıdır (3). Malignant beyin tümörlerinin görülme sıklığı düşük olsa da beyin tümörlerinden özellikle glioblastomada kötü prognoz görülmekte ve yaklaşık 15 aylık bir sağkalım gözlenmektedir (2-4). MSS tümörlerinin dağılım oranları Şekil 2-1'deki gibidir (5). Görülme oranı %50 ile en yüksek paya sahip glioblastomadır (5).



Şekil 2-1: MSS tümörlerinin alt gruplarının dağılımı

Gliyal tümörlerin alt sınıflaması ise kanser hücrelerinin köken aldığı hücreye göre yapılmaktadır (11). Merkezi sinir sistemi gliyal hücreleri; astrositler, oligodendrositler, ependimal hücreler ve mikrogliyalardır. Astrositomalar; uzantı ve bağlantıları ile kan-beyin bariyerini oluşturan, toksik maddelerin kandan beyin dokusuna geçmesini engelleyen astrosit hücrelerden kaynaklanmaktadır. Evre 2, 3 ve 4 gliyal tümörleri; diffüz astrositom, anaplastik astrositom ve glioblastoma alt sınıfı bu hücrelerden köken almaktadır (Tablo 2.1). Oligodendrogliomlar ise aksonlara miyelin kılıf sararak elektrik sinyalinin daha verimli iletilmesine sağlayan oligodendrosit hücrelerinden kaynaklanmaktadır (12).

2.2. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Mekezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflama Kriterleri

MSS tümörleri DSÖ tarafından belirlenen kriterlere göre sınıflanmakta ve derecelendirilmektedir (6-8). DSÖ, gliyal tümörlerin de dahil olduğu MSS tümörleri sınıflama kriterlerini 2021 yılında güncellenmiştir (8). Bu sınıflama histoloji ve immünohistokimyasal teşhise ek olarak entegre tanı ve sıralı raporları vurgulamaktadır. Sıralı rapor yapısı; doku temelli histolojik ve moleküler entegre tanı, histolojik tanı, MSS DSÖ derecelendirmesi, moleküler değişim bilgileri şeklindedir (8). Bu güncelleme ile daha önce 2016 yılında histopatolojik belirteçlerin yanında entegre edilmiş olan moleküler değişimler genişletilmiştir ve epigenetik değişimlerin de önemi vurgulanmaktadır (7-10). 2021 sınıflamasında gliyal tümörler, yetişkin ve pediatrik tip difüz gliomalar olarak ayrılmaktadır. Yetişkin tip difüz gliomalar, “izositrat dehidrojenaz geni” (*IDH*) mutasyonuna sahip astrositoma, oligodendroglioma ve *IDH* mutant olmayan glioblastoma alt sınıfını içermektedir (Tablo 2-1) (8). 2021 DSÖ sınıflama kriterlerinde ayrıca her taksonomik kategorideki spesifik moleküler değişiklikler belirtilmektedir (8).

Gliyal tümörlerin klinik patolojide sınıflaması için mitotik indeks, vasküler endotelial proliferasyon (VEP) ve immünohistokimyasal yöntemlerle saptanan *IDH1*, α talasemi/mental retardasyon sendromu X'e bağlı (*ATRX*), tümör protein p53 (*TP53*), oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2 (*Olig2*), gliyal fibriller asidik protein (*GFAP*) ve proliferasyon indeksi için Ki67 belirteçleri kullanılmaktadır (66, 67). Ki-67 antikoru, tümör hücrelerindeki proliferasyon hücreleri gösterir ve birçok kanserde olduğu gibi gliyal tümörlerde de prognostik belirteç olarak kullanılabilmektedir (68). *Olig2* gliyal

hücrelerden kökenli yaygın primer beyin tümörlerinin belirteci olarak kullanılmaktadır (69). GFAP ise glial neoplastik hücreler ve iyi huylu astrositom hücrelerde güvenilir immünohistokimyasal belirteç olarak değerlendirilmektedir (70). Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), glial hücrelerde fizyolojik ve patolojik anjiogeneizde önemli rol oynamaktadır ve VEP için önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (71).

Tablo 2-1: Gliomaların derecelendirilmesi (8)

Yetişkin tipi difüz gliomalar	
1.1 Astrositom, <i>IDH</i> -mutant	Evre 2, 3, 4
1.2 Oligodendroglioma, <i>IDH</i> mutantı ve 1p/19q kodelesyon	Evre 2, 3
1.3 Glioblastoma, <i>IDH</i> -mutant olmayan	Evre 4
Sınırlı astrositik gliomalar	
2.1 Pleomorfik ksantoastrositom	Evre 2, 3

2.2.1. Astrositom, *IDH*-mutant

Astrositik hücrelerden kaynaklanan; normal hücreler ve tümör hücreleri arasındaki net sınırları koruyan veya infiltratif olabilen beyin tümörlerinin en yaygınıdır (14). Yetişkin tip difüz gliomalardan *IDH* mutant astrositomanın alt tipleri diffüz/anaplastik astrositoma ve glioblastomadır. Bu gliomaların derecelendirmesi 2, 3 veya 4 olabilmektedir (8). Düşük dereceler çocuklarda yaygınken, yüksek dereceler genç erişkinlerde ve yaşlı hastalarda yaygındır (14). *IDH1*, *IDH2*, *ATRX*, *TP53*, *CDKN2A/B* gen mutasyonları karakteristik değişimlerdir (8, 16-18).

Evre 2, anaplastik histolojik özellikler göstermeyen *IDH1/IDH2* gen mutasyonuna sahip diffüz infiltratif bir astrositik gliomadır. Mitotik aktivite düşüktür veya saptanmamaktadır. Evre 3 ise, fokal veya dağınık anaplazi sergileyen ve önemli mitotik aktivitesi olan, *IDH1* veya *IDH2* mutasyonuna sahip diffüz infiltratif bir astrositik gliomadır. Ayrıca mikrovasküler proliferasyon, nekroz ve *CDKN2A/B* homozigot delesyonları bulunmamaktadır (14).

Evre 4, glioblastoma *IDH* mutant olarak da bilinmektedir ve *IDH1/IDH2* gen mutasyonunun yanında mikrovasküler proliferasyon veya nekroz veya *CDKN2A/B* homozigot delesyonu içeren diffüz infiltratif bir astrositik gliomadır. Nadir alt sınıf

olarak “Pleomorfik Ksantoastrositom” ise büyük lipid içeren hücrelere sahiptir ve malign tümörleri taklit edebilmektedir (14, 15).

2.2.2. Oligodendroglioma

Oligodendrosit hücrelerden köken alan kanser hücrelerindeki karakteristik moleküler değişimler; *IDH* mutasyon varlığına ek olarak 1p/19q kodelesyonu, *CIC*, *FUBP1*, *NOTCH1* gen mutasyonlarıdır (8,16-18). Difüz gliomalara göre oligodendrogliomalar daha nadir (%5) görülmektedir. Evre 2 ve 3 olabilmektedir (8). (Tablo 2-1)

2.2.3. Glioblastoma, IDH-yabanıl tip

Beyin tümörleri arasında en sık görülen ve en kötü prognoza sahip alt tümör tipidir. Glioblastoma daha önceki sınıflama kriterlerinde *IDH* mutant ve yabanıl tip olarak ayrılmakta iken 2021 sınıflaması ile *IDH* mutant glioblastoma astrositomaların alt sınıfı olmaktadır. Buna karşı glioblastoma *IDH*- yabanıl tip (*IDH* mutant olmayan) difüz gliomaların alt sınıfıdır.

IDH mutant olmayan glioblastomalar için ana moleküler belirteçler; *EGFR* mutasyonları, kromozom 7 ve/veya 10p heterozigotluk kaybı ve *TERT* geni promoter mutasyon durumudur (8,18).

2.3. Gliomalarda Bulunan Karakteristik Genetik Değişimler

Kanser hücrelerinde oluşan somatik mutasyonların tanımlanması ve karakterize edilmesi kanserin moleküler temellerini anlamamız açısından çok önemlidir (19). 2021 glial tümörler için belirtilen karakteristik moleküler değişimler Tablo 2-2’de özetlenmiştir (8).

Tablo 2-2: Glial tümörlerin karakteristik genetik değişimleri

Tümör Alt tipi	Karakteristik Genetik/Moleküler Değişimler
Astrositoma, <i>IDH</i> -mutant	<i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>ATRX</i> , <i>TP53</i> , <i>CDKN2A/B</i>
Oligodendroglioma, <i>IDH</i> -mutant ve 1p/19q-kodelesyon	<i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , 1p/19q, <i>TERT</i> promoter, <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i> , <i>NOTCH1</i>
Glioblastoma, <i>IDH</i> -mutant olmayan	<i>IDH</i> -mutant olmayan, <i>TERT</i> promotör, 7/10 kromozom, <i>EGFR</i>

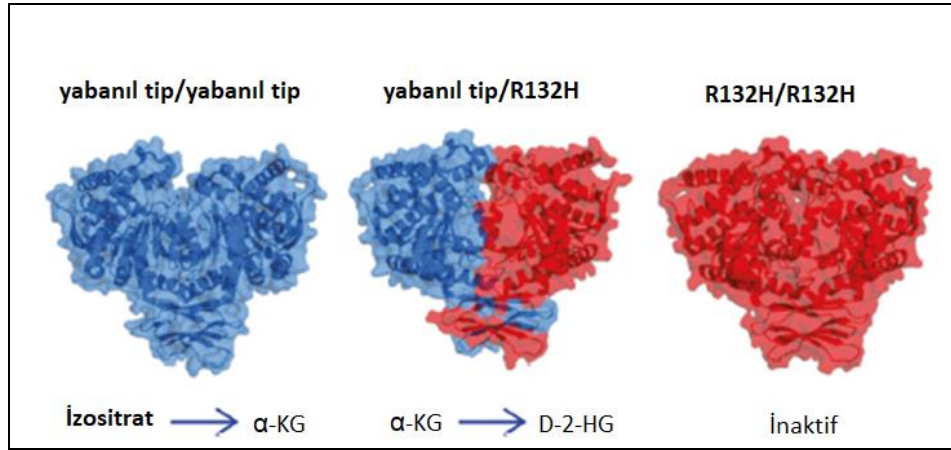
Tümör Altıpti	Karakteristik Genetik/Moleküler Değişimler
Difüz Astrozitoma,, <i>MYB</i> -veya <i>MYBL1</i>	<i>MYB</i> , <i>MYBL1</i>
Difüz düşük evre glioma, MAPK pathway-altered	<i>FGFR1</i> , <i>BRAF</i>
Difüz midline glioma, H3 K27	H3 K27, <i>TP53</i> , <i>ACVR1</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>EGFR</i> , <i>EZH1P</i>
Pleomorfik ksantoastrozitoma	<i>BRAF</i> , <i>CDKN2A/B</i>

2.3.1. *IDH1/IDH2* Mutasyonları

IDH geni, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oluşumunu içeren bir oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonu yoluyla “ α -Ketoglutarat” (α -KG) oluşumunu katalize eden bir NAD(P)⁺ bağımlı izositrat dehidrojenazı enzimini kodlar (20) (Şekil 2-2).

Üç izoformu bulunan *IDH* enzimleri, Krebs döngüsü, glutamin metabolizması, lipogenez ve redoks regülasyonu gibi birkaç ana metabolik süreçte rol alan temel enzimlerdir. *IDH1*, sitoplazmada ve peroksizomlarda bulunurken, *IDH2* ve *IDH3* mitokondriyal matriste bulunmaktadır (20-22).

IDH1 geninde bulunan kanserle ilişkili mutasyonlar, izositratın tanınması için çok önemli olan arginin kalıntısında lokalize olma eğilimindedir (*IDH1* için R132, *IDH2* için R140 veya R172). *IDH1* genindeki yanlış anlamlı mutasyonlar sebebiyle enzim, NADPH için yüksek afinite gösterirken izositrat için düşük afinite sergiler (21, 22). *IDH* genindeki heterozigot mutasyonlar tümör hücrelerinde, *IDH* dimerlerinin ana formlarının, yabancı tip *IDH1*'in bir versiyonunu ve R132H mutasyonlu bir versiyonunu içeren heterodimerler olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle, *IDH* mutant hücrelerde, dimerin *IDH1* yabancı tip bileşeni, NADPH üretmek için izositratı α -KG'ye dönüştürürken, dimerin mutant kısmı neomorfik aktivite sergileyerek NADPH'ye bağımlı bir şekilde α -KG'yi D-2-hidroksiglutarat'a (D-2-HG) dönüştürmektedir (21, 22) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: IDH1/2 genlerinin yabanıl tip ve mutant durumlarındaki fonksiyonları

(α-KG: alfa ketoglutarat, D-2-HG: D-2-hidroksiglutarat)

Onkometabolit olarak D-2 HG glial tümörlü hastaların beyin hücrelerinde birikimi ile gliomagenезin ilerlemesine neden olabilmektedir (20-22). D-2-HG, DNA metilasyonunun yanı sıra, lizin spesifik demetilaz (KDM) gibi histon demetilazları inhibe ederek histon metilasyonunu da arttırmaktadır (20, 22).

Difüz gliomaların genetik olarak sınıflamasında ana biyobelirteç olarak IDH mutasyon durumu değerlendirilmektedir (8). Astrositomalarda, oligodendrogliomalarda yaygın olarak bulunmaktadır (8).

2.3.2. TERT Mutasyonları

“Telomeraz revers transkriptaz” (*TERT*) enzimi kromozomların uçlarında bulunan telomer bölgelerine kendi RNA dizisini kullanarak nükleotid eklemektedir (23). Kanser hücrelerinin karakteristik özelliği, telomerazın sürekli ifadesi ile telomer uzunluğunu koruyarak veya telomerazın yokluğunda, alternatif bir telomer uzatma (ALT) mekanizmasıyla sürekli bölünme yeteneği kazanmasıdır (23).

Glioma ve diğer tümörlerde *TERT* geni promotör bölgesindeki mutasyonların telomeraz aktivitesinin artmasına yol açtığı gösterilmektedir (23). Telomerazın katalitik bir alt birimi olan *TERT*in promotör bölgesindeki C228T ve C250T mutasyonları telomeraz aktivasyonu için gerekli olan *TERT* geninin ekspresyonunu arttırmaktadır (24). Yetişkin gliomalarda yaygın olan bu mutasyonlar sınıflama için genetik belirteç olarak kullanılmaktadır (8, 24).

Oligodendrogliomalar ve *IDH*-mutant olmayan glioblastomalarda bu mutasyon bulunabilmektedir. *TERT* geni promotör mutasyonu MSS tümörleri için prognostik değerinin yanında *IDH1*, *ATRX*, *TP53* gen mutasyonları ile de ilişkilidir (27).

2.3.3. *ATRX* Mutasyonları

“ α talasemi/mental retardasyon sendromu X'e bağlı” (*ATRX*) geni beyin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. DNA rekombinasyonu, onarımı ve transkripsiyonel düzenleme gibi birçok hücrel fonksiyonda yer alan nükleoproteinin eksikliğinde nadir bir hastalık olan ATR-X sendromu görülmektedir (23, 25). *ATRX* proteinleri kromatin yeniden modelleme proteinlerinden SWI/SNF helikaz ailesinin bir üyesidir ve yüksek oranda korunmuş iki bölge içermektedir. Bunlardan *ATRX*-DNMT3-DNMT3L (ADD) bölgesi, Histon 3 lizin 9 bölgesi tri-metilasyonu (H3K9me3) ile değiştirilmiş kromatine bağlanır ve onu düzenler; diğer bir SWI/SNF korunmuş bölgesi ise, *ATRX*'in kromatini yeniden modelleme görevi için ATP'yi kullanmaktadır (25).

ATRX gen mutasyonu, tümör hücrelerinde *ATRX* ekspresyonunun kaybına yol açmaktadır. Farklı tümör tiplerinde, ALT (Alternative lengthening of telomeres-Telomerlerin alternatif olarak uzatılması) aktivasyonu, ATP bağımlı helikaz *ATRX*'in veya onunla etkileşimdeki histon H3.3 fonksiyon kaybı ile ilişkili olmaktadır (23). *TERT* promotör mutasyonlarına benzer şekilde, *ATRX* mutasyonları da *TP53* geni mutasyonlarıyla ilişkilidir (23). *ATRX* mutasyonu astrositomlar için spesifik bir belirteç olmakla birlikte oligodendrogliomalarda bulunmamaktadır (26, 28, 29). Rutin tanıda *ATRX* kaybı immünohistokimyasal olarak belirlenebilmektedir (28, 29).

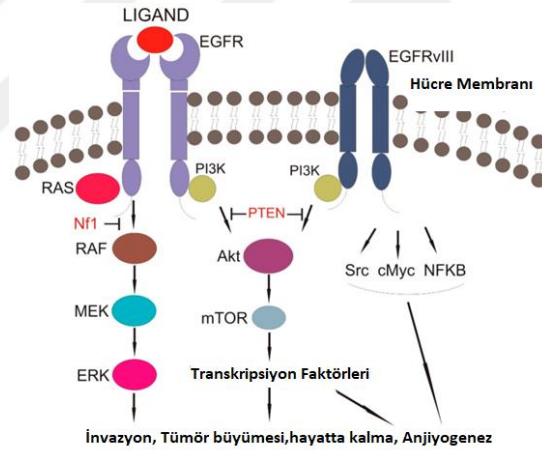
2.3.4. *CIC* Mutasyonları

Oligodendrogliomaların karakteristik değişimlerinden biri 1p/19q kodelesyonudur (8). “Capicua transkripsiyonel baskılayıcı” (*CIC*) geni mutasyonları 19q'da bulunan bir gendir ve *CIC* mutasyonları 1p/19q kaybı olan oligodendrogliomalarda %50-70 oranında bulunduğu belirlenmiştir (30). 1p/19q kodelesyonu gibi *CIC* geni oligodendrogliomaların sınıflamasında kullanılmaktadır (8). Oligodendrogliomalarda belirlenen en sık *CIC* geni mutasyonları yanlış anlamlı ve delesyonları içeren değişimlerdir (30). Oligodendrogliomalarda *CIC*:p.R215W mutasyonu, *CIC* proteini fonksiyon kaybına yol açan yaygın bir mutasyondur (65).

2.3.5. *EGFR* Mutasyonları

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) proliferasyonu indükler ve birçok hücre tipinde hücresel büyümeyi teşvik eden zarda lokalize olan bir reseptördür. erb-b2 reseptörü tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan *EGFR* geninin amplifikasyonu veya mutasyonları çeşitli kanserlerde sıklıkla bulunmaktadır (31).

Glioblastomada *EGFR* gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, karakteristik genetik değişim olarak görülmekte ancak düşük dereceli gliomalarda nadir görülmektedir (31). Glioblastoma patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir. Artan *EGFR* ekspresyonu, kanser hücreleri için hayatta kalma, hücrelerin proliferasyonu, invaziv olma ve tedaviye direnç gibi tümör biyolojisinin birçok yönünü etkileyebilmektedir (31). *EGFR*, PI3K/AKT, RAS/MAPK ve JAK2/STAT gibi birçok hücrel sinyal yolunu ile bağlantılıdır ve bu yolları düzenleyebilmektedir. *EGFR*, Şekil 2-3'te gösterildiği gibi, çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde yer almaktadır (32).



Şekil 2-3: *EGFR* hücrel sinyal yolları

2.3.6. *BRAF* Mutasyonları

B-Raf, büyüme sinyali iletiminde anahtar rol oynayan bir serin/treonin-protein kinazdır ve protoonkogen sınıfındadır. B-Raf, mitojenle aktive olan protein kinazı (MAPK) hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz sinyal yolunu düzenlemede anahtar proteinlerden biridir (33). *BRAF* V600E mutasyonunun düşük dereceli gliomalarda yüksek bir insidansa sahip olduğu gösterilmiştir, gliomaların sınıflandırılmasında ve prognozunda önemli bir rol oynamaktadır (8, 33, 34)

2.3.7. *TP53* Mutasyonları

En çok bilinen tümör süpresör gen *TP53*, bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrede stres sinyallerini entegre eder ve hasarlı hücrelerin çoğalmasını önlemek için hücre döngüsü durmasını, yaşlanmayı ve apoptozu yönlendirmektedir. Ayrıca hücre homeostazın korunmasında merkezi bir rol oynamaktadır; hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını, genom bütünlüğünü ve diğer işlevlerini kontrol eden düzenleyicidir (35).

Gliomaların heterojen genetik alt yapısında *TP53* gen mutasyonları da sıklıkla görülmektedir (36,37). Bu mutasyonlar genellikle DNA bağlanma bölgesindeki yanlış anlamlı mutasyonlardır (35). *TP53* mutasyonları glioblastomanın ilerlemesine neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (35). *CDKN2A* gen mutasyonları Glioblastomada p53 yolu ile ilişkilendirilmiştir (35). Ayrıca glioblastomada *MDM2* ve *MDM4* genlerinin amplifikasyonu ve p53'ü negatif olarak düzenlemektedir (35).

2.3.8. Diğer Genetik Değişimler

“Nörofibromatozis tip 1” (*NF1*) geni, tümör baskılayıcı olarak Ras yolunu inaktive etmektedir (38). *NF1* geni nörofibromini kodlar ve MSS hücrelerinden nöronlarda, Schwann hücrelerinde ve astrositomalarda eksprese edilmektedir. Fonksiyon kaybı mutasyonlar ile nörofibromindeki azalma, merkezi ve periferik sinir sistemindeki tümörlere yatkınlık oluşturmaktadır (38). Kanser veritabanlarındaki bilgilere göre Glioblastoma hastalarının yaklaşık %13-14'ünde *NF1* mutasyonu bulunmaktadır. Bu patojenik varyantların çoğu (%78) çerçeve kayması, tek nükleotid polimorfizimleri (SNP) değişimleridir (39). *NF1* fonksiyon kaybı, kötü prognoza sahip glioblastomanın tanımlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (39).

“Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A” (*CDKN2A*- “cyclin dependent kinase inhibitor 2A”) geni hücre döngüsü düzenleyici olarak rol alan p16 (*INK4*) ve p14 (*ARK*) proteinleri kodlar (40). Tümör süpresör gen olan *CDKN2A/B* geninin *IDH*-mutant gliomadaki homozigot delesyonu gliomada kötü prognozun bir belirtici olarak tanımlanmaktadır (41, 42). *CDKN2A* geni hücre döngüsündeki *TP53* ve *RB1* genlerinin de aktivasyonunu düzenlemekte ve p53 aracılı hücre döngüsü durmasını veya apoptozu tetiklemektedir (41).

“Platelet türevli büyüme faktörü reseptörü, alpha” (*PDGFRA*) geni reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. *PDGFRA* proteini sinyal yolları, hücre büyümesi, bölünmesi ve hücrenin hayatta kalması gibi birçok önemli hücresel süreci kontrol

etmektedir. *PDGFRA*, glioblastomada *EGFR*'den sonra ikinci en sık mutasyona uğramış tirozin kinaz reseptörü kodlayan gendir ve oligodendrosit farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır (43). *PDGFRA* amplifikasyonunun *IDH* mutant olmayan glioblastomada kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (43).

“Fosfataz ve tensin homologu” (*PTEN*), hücre proliferasyonu, adezyon ve invazyon, apoptoz ve DNA hasar onarımında önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir (44). *PTEN* mutasyonları gliomaların %60'ında bulunmakta ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (44, 45). Ayrıca glioblastomada, *PI3K/Akt/mTOR* sinyali, reseptör tirozin kinaz aşırı aktivitesi, mutasyona uğramış onkogenik *PI3K* alt birimleri ve/veya *PTEN* tümör baskılayıcının kaybı ile sıklıkla artmaktadır (46).

Gliyal tümörler oldukça heterojen bir genetik altyapıya sahip tümörlerdir. Bu genetik değişimlerin belirlenmesi hem moleküler alt sınıflama için önemli olmakta hem de tedavi geliştirme süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (46).

2.4. Gliyal tümörlerde DNA Metilasyonu

Epigenetik olarak gen ekspresyonu düzenlemesinin bir yolu DNA'nın metilasyonu aracılığı ile olmaktadır (47). DNA metilasyon mekanizması, bir metil grubunun metiltransferaz enzimleriyle bir sitozin-fosfat-guanin (CpG) dinükleotidinde, sitozin halkasının 5' pozisyonuna kovalent bağlanması sonucunda 5-metilsitozin oluşmaktadır (48). Normal hücresel süreçte, DNA metilasyonu genom bütünlüğünün korunması, dokuya özgü genlerin baskılanması, genomik damgalama ile alelik ifadenin oluşması ve dişilerde X kromozomunun bir kopyasının etkisizleştirilmesi için hayati önem taşımaktadır (49). DNA metilasyonunun düzensizliği, tümör baskılayıcıların susturulmasına veya onkogenlerin ekspresyonuna yol açarak kanserler dahil birçok hastalık gelişimine sebep olabilmektedir (47).

2021 DSÖ sınıflamasında önemi belirtilen DNA metilasyon profilinin kullanılması gliyal tümörleri de kapsayan MSS tümörlerinin karakterizasyonu ve alt sınıflaması için oldukça güçlü bir araçtır (8, 50). Gliomalarda, DNA metilasyonundaki değişiklikler en sık *IDH* mutasyonu tarafından tetiklenmektedir (51). *IDH* mutasyonları, 2-HG onkometabolit üretimi ile histon ve DNA demetilazların aktivitesini inhibe etmekte ve DNA/histonların hipermetilasyonuna neden olmaktadır (52). Ayrıca *ATRX* geninin ekspresyon kaybı ile kromozomların uçlarında değişen DNA metilasyon profili ilişkilendirilmektedir (51).

2.4.1. *MGMT* Geni Metilasyonu

DNA onarım enzimi “O6-metilguanin-DNA metiltransferaz” (*MGMT*) geni promotörünün metilasyonu, glioblastoma hastalarında olumlu bir prognostik faktördür (53-55). Gliomaların %40'ında *MGMT* promotörünün metilasyonu, genin transkripsiyonel baskılanmasına ve kanser hücrelerini alkilleyici maddelere karşı duyarlı hale getirmektedir. Radyoterapi ve eşzamanlı adjuvan temozolomid ile tedavi edilen *MGMT* promoter metilasyonuna sahip glioblastoma hastalarında önemli ölçüde daha uzun hayatta kalma ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (54). *MGMT* promotör metilasyonu, glial tümörlü hastalarda önemli bir moleküler belirteç olarak klinikte tedaviyi etkileyen en önemli parametrelerden biridir (56).

2.5. Glial Tümörlerde Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (YND), dizileme teknolojileri alanında 2007 yılında yılın tekniği olarak seçilmesiyle birlikte hızla yaygınlaşmaya başlamıştır (57). Genetik hastalıklar, kanser araştırmaları gibi klinik uygulamaları olan birçok alanda uygulanan bu teknik hızlı ve yüksek veri çıktıları ile özellikle tıp alanında çok önemlidir. DNA temelli YND'nin çalışma prensibi; DNA'nın enzimatik olarak kesilerek çok sayıda küçük parçaya ayrılarak bir kütüphane oluşturulması ve kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılmasına dayanmaktadır. Elde edilen bu ampikonların paralel olarak dizilenmesi eş zamanlı gerçekleşerek genomdaki her bazın birden çok kez okunması ve varyasyonların tespiti daha doğru yapılmaktadır. Barkod yöntemi ile DNA'nın hangi örneğe ait olduğu güvenli bir şekilde takip edilebilmektedir (58, 59).

Glial tümörler gibi hetrojen bir genetik altyapıya sahip tümörlerde moleküler değişimlerin eş zamanlı değerlendirilmesi hem sınıflama açısından hem de tedavi seçimi açısından çok önemli olmaktadır (46). YND, DNA temelli ve hedefe yönelik genetik değişimlerin gösterilmesiyle spesifik moleküler biyobelirteçleri ve klinikte tedaviye yön veren önemli sonuçları ortaya çıkarmaktadır (60). Tanısal testleri birleştiren ve eşzamanlı tek nükleotid varyantı (SNP), ekleme/silinme (InDel), kopya sayısı varyasyonu (CNV) dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler değişiklikleri tespit ederek verimli ve uygun maliyetli bir moleküler platform olarak yeni nesil dizileme testi birçok avantaj sağlamaktadır (61-63).

2.5.1. Hedefli Gen Panelleri

YND temelli uygulamalar çok çeşitli olabilmektedir. DNA temelli olanlar tüm genom dizileme, tüm ekzom, klinik ekzom dizileme veya hedefli gen panelleri olabilmektedir (57, 59). Kanser ilişkili hedeflenen genlerin dizilenmesi, spesifik olarak hedefe yönelik bir analiz gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (59).

Glial tümörlerin araştırılması için farklı YND tabanlı yaklaşımlar daha önce tanımlanmış olup, genetik değişikliklerin tanımlanmasının tanıda oldukça faydalı olduğu vurgulanmıştır (61-63).

Klinik uygulamada hedefli gen paneli, ekzom dizileme gibi daha yüksek veri çıktısı sağlayan YND temelli dizileme çeşitlerine göre daha avantajlı olmaktadır. Dizileme sonrası analiz ve maliyet göz önüne alındığında klinikte pratik uygulama alanı hedefli gen panelleri için daha avantajlı olmaktadır. Ayrıca hedefli genlere veya gen bölgelerine odaklanmak, ekzom dizilemeden çok daha yüksek bir derinlikte dizilemeye olanak sağlamaktadır (65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Gruplarının Oluşturulması

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'na 2020-2022 yılları arasında başvuran 18-80 yaş aralığındaki glial tümör ön tanısı olan, gönüllü onam formunu imzalayan 16 hastadan operasyon esnasında ~50 mg beyin tümör dokusu ve 10 ml kan alınmıştır. Bu tez çalışması için 'Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' onayı alınmıştır (Tarih ve Sayı: 17.05.2021-E.16314). Olguların %45'ini (n=7) kadın, %55'ini (n=9) erkek olgular oluşturmaktadır. Bu olgular içinde dört hasta Evre 2, oniki hasta Evre 4 olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tampon ve Çözeltiler

“6X DNA Loading Dye” (Thermo Fisher)

“Agaroz” (Sigma)

“DNA Marker” (Thermo Fisher)

“DNA HS Qubit Reagent”

“dNTP” (Thermo Fisher)

“Etidyum Bromür” (Thermo Fisher)

“GEY's Solüsyonu” (NH₄Cl (Amonyum klorid), KHCO₃ (potasyum hidrojen karbonat))

“Kapa Ampure Bead”

“Kloroform” (Merck)

“NaOH” (1 N) (Sigma)

“PBS” 1X (Wisent Multicell)

Primerler (Sentebiolab)

“RNase-free” su

“Tris-HCl”

“Taq DNA Polimeraz ve PZR buffer” (Thermo Fisher)

“Trizol” (TriReagent Sigma BD)

3.1.3. Kullanılan Kitler

“Archer Variant Plex Solid Tumor panel kiti”

“cDNA Sentez Kiti” (Thermo Fisher, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with Rnase Inhibitor)

“DNA İzolasyon kiti” (Invitrogen PureLink Genomic DNA Kiti)

“EpiTect Bisulfite Kits” (QIAGEN)

“SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit” (Bioline, BIO-98020)

“NextSeq Midoutput 300 Cycle Reagent Kit”

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı -80 °C (Thermo Scientific) Buzdolabı +4 °C/-20 °C (Beko)

PZR Cihazı (Eppendorf, Techne 412, BioRad)

Vorteks (Stuart)

Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)

Isıtıcı block (Techne)

Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)

Pipet Seti 0,2-2, 2-20, 20-100, 100-1000 (Gilson, Ependorf)

Real Time PZR Cihazı (Light Cycler 480-II, Roche)

Santrifüj (Hettich, Allegra X22)

Distile Su Cihazı (Milipore)

Buz Makinası (Cornelius)

Hassas Terazî (Kern)

Illumina Nextseq 550

3.2. Yöntem

Çalışmamızda Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'na 16 hastadan operasyon esnasında alınan ~50 mg tümör dokusu ve 10 ml kan örneği kullanıldı. Örnekler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na transfer edilerek DNA ve RNA izolasyonu için uygun şartlarda saklandı. Çalışmaya dahil edilen dört hasta düşük evreli, on iki hasta yüksek evreli olarak belirlendi.

Tümör örnekleri küçük parçalara ayrılarak DNA izolasyonu için -20°C'de, RNA izolasyonu için trizol içinde homojenize edilerek -80°C'de kodlanarak muhafaza edildi. Periferik kan örnekleri, 10mL'lik EDTA'lı tüpe alınarak Gey's solüsyonu protokolüne göre lökosit izolasyonu yapıldı. Elde edilen hücreler kodlanarak DNA izolasyonu için -20°C'de, RNA izolasyonu için trizol içinde homojenize edilerek -80°C'de muhafaza edildi. Yeterli hasta sayısına ulaşıldığında "DNA izolasyon kiti" (Invitrogen) ile DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyon ve kalite değerleri öncelikle Nanodrop ile belirlendi. Yeni nesil dizilemede kullanılacağı için Qubit ile daha hassas DNA konsantrasyon tayini yapıldı.

Oligodendroglimalarda karakteristik değişim gösteren *CIC* geninde sık rastlanan mutasyonun (R215W/Q) incelenmesi için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gerçekleştirildi. PZR ürünleri jel elektroforezi ile yürütüldü ve UV ışık altında jel görüntüsü alındıktan sonra Sanger dizileme yapıldı.

Metilasyon analizi için tümör dokusundan elde edilen DNA'ların bir kısmı bisülfite ile muamele edildikten sonra *MGMT* promotör bölge metilasyon analizi için metilasyon spesifik gerçek zamanlı PZR yapıldı. Kalan DNA örnekleri yeni nesil dizileme kütüphanesi hazırlığı için +4°C'de muhafaza edildi.

Tümör dokuları ve kan örneklerinden RNA izolasyonu Trizol protokolüne göre yapıldı. RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop ile belirlendi. Elde edilen RNA örneklerden ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi yapıldı. *ATRX* ve *NF1* genlerinin ekspresyon analizi gerçek zamanlı kantitatif PZR (qRT-PZR) ile yapıldı.

Kalitesi belirlenen DNA'lardan yeni nesil dizileme için kütüphane hazırlığı "Archer variant plex solid tümör gen paneli kiti" ile yapıldı. Kütüphane kalitesi "Qubit" ile belirlendikten sonra "Illumina Nextseq 550" cihazında dizilendi. Elde edilen "SNV", "CNV" verileri Archer platformu ile analiz edildi. Tespit edilen varyantlar ile

metilasyon, ekspresyon ve sanger dizileme verilerinin istatistiksel analizi gerçekleştirildi.

3.2.1. Periferik Kan Örneklerinden Lökosit Hücrelerin İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin 2 katı kadar GEY's solüsyonu 50 mL'lik falkonda kan üzerine eklendi. 15 dakikalık +4°C'de inkübasyon sonrası 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı; pellet, falkona elle vurularak çözdürüldükten sonra kan miktarı kadar GEY's solüsyonu eklendi. Aynı koşullardaki santrifüj tekrarlandı. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı ve pellet çözdürülerek DNA ve RNA izolasyonları için uygun koşullarda saklandı.

3.2.2. DNA İzolasyonu

3.2.2.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden elde edilen hücreler çözdürüldükten sonra “genomik DNA izolasyon kiti” (“Invitrogen Purelink”) protokolü takip edildi. Protokole göre; 20 µL “Proteinaz K” eklendi. 200 µL “Genomic Lysis/Binding Buffer” eklendi ve homojen bir çözelti elde etmek için pipetaj yapıldı. 55°C'ye ayarlanan ısı bloğunda 3 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra lizata 200 µL %96–100 etanol eklendi. Homojen bir çözelti elde etmek için 5 saniye ters düz edildi. “PureLink spin kolonu” hazırlanarak “Genomic Lysis/Binding” ile hazırlanan lizat (~640 µL) eklendi. Kolon 10.000 × g 'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atıldı ve spin kolonu temiz bir toplama tüpüne yerleştirilerek devam edildi.

DNA kolonunun yıkama aşaması için kolona 500 µL “wash buffer 1” eklendi, oda sıcaklığında 10.000 × g 'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonra 500 µL “wash buffer 2” eklendi ve maksimum hızda 3 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.

Kolona tutunan DNA'yı ayırmak için; spin kolon steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolana 50 µL distile su eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde saflaştırılmış genomik DNA'lar toplandı.

3.2.2.2. Tümör Örneklerinden DNA İzolasyonu

Tümör dokuları ~25 mg olarak hassas terazide tartıldı ve petri içerisinde bistüri yardımıyla parçalandıktan sonra santrifüj tüpüne alındı ve “DNA izolasyon kiti”

("Invitrogen Purelink") protokolü takip edildi. Protokole göre; 20 µL "Proteinaz K" eklendi. 200 µL "Genomic Lysis/Binding Buffer" eklendi ve homojen bir çözelti elde etmek için pipetaj yapıldı. 55°C'ye ayarlanan ısı bloğunda 3 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra lizata 200 µL %96–100 etanol eklendi. Homojen bir çözelti elde etmek için 5 saniye ters düz edildi. "PureLink spin kolonu" hazırlanarak "Genomic Lysis/Binding" ile hazırlanan lizat (~640 µL) eklendi. Kolon $10.000 \times g$ 'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atıldı ve spin kolonu temiz bir toplama tüpüne yerleştirilerek devam edildi.

DNA kolonunun yıkama aşaması için kolona 500 µL "wash buffer 1" eklendi, oda sıcaklığında $10.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonra 500 µL "wash buffer 2" eklendi ve maksimum hızda 3 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.

Kolona tutunan DNA'yı ayırmak için; spin kolon steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolona 50 µL distile su eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde saflaştırılmış genomik DNA'lar toplandı.

3.2.3. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

Öncelikle elde edilen DNA'lar "Nanodrop-2000" cihazı kullanılarak miktarları tayin edildi. Daha sonra dizileme için kullanılacak olan ve tümör dokusundan elde edilen DNA'ların daha hassas miktar tayini Qubit ile belirlendi.

"Qubit dsDNA High Sensivity Assay Kit" protokolüne göre; optimal ölçüm için oda ısısındaki solüsyonlar ve standartlar kullanılarak yapıldı.

Ölçüm yapılacak her örnek için "Working solution" hazırladı. "Working solution" için 199 µL buffer x örnek sayısı (+2 standart) ile 1 µL Flouresan boya x örnek sayısı (+2 standart) olarak hesaplandı ve hazırlandı. Standartlar için; 10 µL STD1 190 µL "Working solution" ile karıştırıldı. 10 µL Standart 2 190 µL "Working solution" ile karıştırıldı. Örnekler için ise 2 µL DNA ile 198 µL "Working solution" karıştırıldı. Tüm örnekler 2 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra ölçüm aşamasına geçildi (Şekil 3-2).

Qubit v2 cihazı açıldı, Protokolde yer alan hesaplama ile DNA örneklerinin konsantrasyon değerleri hesaplandı. Numunenin konsantrasyonu = QF değeri $\times$ 200/x (QF: ekranda çıkan sonuç, x: eklenen DNA miktarı)



Şekil 3-1: Qubit 2.0 cihazı ile DNA konsantrasyon tayini

3.2.4. RNA İzolasyonu

-80°C’de trizol içinde saklanan tümör dokusu ve periferik kandan ayrılan hücrelerden Trizol protokolüne göre RNA izole edildi. Sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

500 µL Trizol içindeki örnekler 2 mL şırınga ile pipetaj yaparak homojenize edildi. Nükleoprotein komplekslerinin tamamının ayrışması için örnekler 10 dakika oda sıcaklığında çözüldü. Ardından sallamalı ısı bloğunda 37°C’de, 10 dakika 1400 rpm’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 0,1 mL kloroform eklendi ve tüpler 5 dakika kısa aralıklarla vortekslendi. 10 dakika 8°C’de 10600 rpm’de santrifüj edildi. Sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı. Örnekler başlangıç homojenizasyonu için kullanılan her 500 µL Trizol için 0,25 mL soğuk (+4°C) %100 etanol eklendi ve vortekslendi. Örnekler 30 dakika -20°C’de inkübasyona bırakıldı, sonrasında 10 dakika 10600 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı. Oluşan RNA peletine başlangıç homojenizasyonu için kullanılan 500 µL Trizol için 500 µL %75 etanol eklenerek vortekslendi ve 5 dakika 8°C’de 8400 rpm’de santrifüj edildi. Tüm sıvı mikropipetle uzaklaştırıldı. RNA pelet ısı bloğunda 37°C ‘de yaklaşık 5 dakika kurutuldu. RNA peleti 25 µL “RNase-

free” su eklenerek çözüldü. Çözülen RNA hemen buza alındı ve -20°C’de yarım saat bekletildikten sonra Nanodrop-2000 cihazında miktar tayini yapıldı. Elde edilen RNA’lar -80°C’de saklandı.

3.2.5. cDNA sentezi

cDNA sentezi için “Thermo High Capacity cDNA Synthesis kit” (“Thermo Fisher Scientific”) kullanıldı. RNA ölçümleri yapılan örnekler 750 ng RNA, H₂O ile 13,2 µL olacak şekilde sulandırıldı.

Kit içeriğine göre cDNA reaksiyonu karışım içeriği Tablo 3-1’deki gibi yapıldı.

Tablo 3-1: cDNA reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
10x RT tampon çözeltisi	2
25X dNTP	0,8
10X Random primer	2
Ters Transkriptaz ((50 U/µL)	1
Rnaz İnhibitör (1.0 U/µL)	1
RNA	13,2
Toplam hacim	20

Tablodaki gibi hazırlanan cDNA sentez reaksiyonu 25°C 10 dakika, 37°C 120 dakika ve 85°C 5 dakika PZR cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hemen buza alınan örnekler -20°C’de saklandı.

3.2.6. Primer Tasarımı ve Housekeeping Gen Seçimi

Referans gen olarak *GAPDH* kullanıldı. *GAPDH*, *ATRX* ve *NF1* genlerine özgü primerler web tabanlı “*NCBI primer designing tool*” kullanılarak belirlendi (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: qRT-PZR’de kullanılan primer dizileri

Gen Sembolü	Primer dizisi	PZR ürün boyutu (bp)
<i>ATRX</i> (F)	5’- GAGCCAGTGCTGAATGAAGA -3’	172
<i>ATRX</i> (R)	5’- CCCATGAAGCCCATCTTCTC -3’	
<i>NF1</i> (F)	5’- TGGTGGCCTAAGATTGATGC-3’	109
<i>NF1</i> (R)	5’- AGCTTCTTGTCTCCAGGTCT-3’	
<i>GAPDH</i> (F)	5’- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3’	257

GAPDH (R) 5'- AGGGCCATCCAGAGTCTTC-3'

3.2.7. qRT-PZR Tekniğı ile ATRX ve NF1 Genlerinin Ekspresyon Analizi

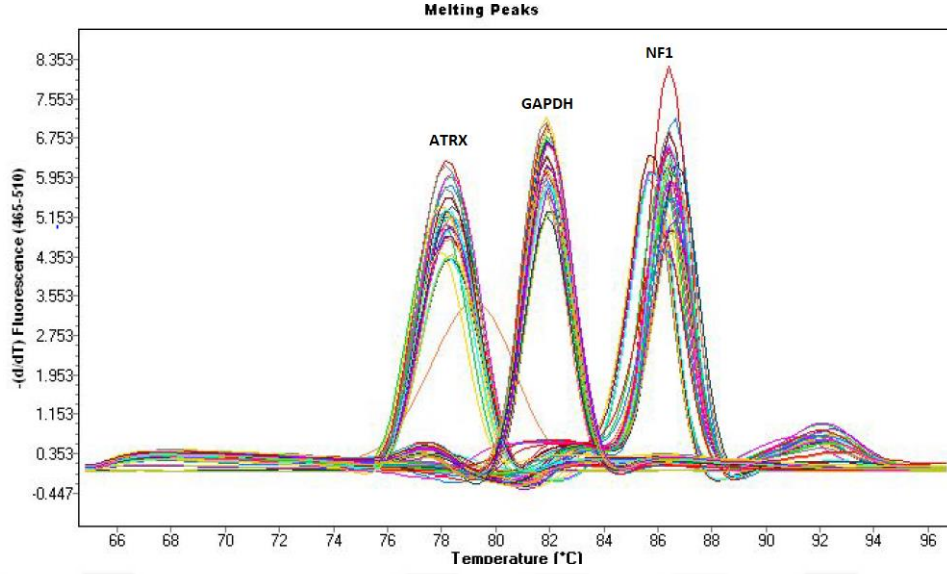
Gliyal tümörlü hastalara ait tümör dokularından ve kan örneklerinden elde edilen cDNA ile qRT-PZR yöntemiyle *ATRX* ve *NF1* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. LightCycler 480 cihazında “Bioline SensiFAST SYBR® No-ROX kiti” kullanılarak qRT-PZR yapıldı.

qRT-PZR reaksiyonu için 5 µL “SYBR Green I”, 10pmol/µL primer, 1 µL H₂O ve 2 µL cDNA kullanılarak hazırlandı. Tablo 3-3’te belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: qRT-PZR koşulları

Basamak	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
Ön Denatürasyon	1	5 dakika	95°C
Amplifikasyon	45	10 saniye	95 °C
		20 saniye	60 ° C
		10 saniye	72 °C
Melting Curve	1	5 saniye	95°C
		1 dakika	65°C
		-	97°C
Soğutma	1	30 saniye	4°C

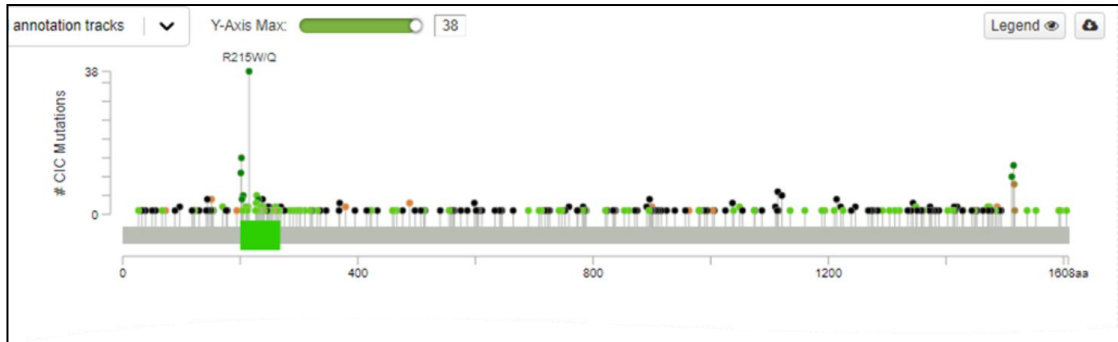
qRT-PZR reaksiyonunda negatif kontrol olarak H₂O kullanıldı. Standartlar için Standart cDNA’sı seri dilüsyonlar ile hazırlandı. Her örnek iki tekrar olarak çalışıldı. Hedef genlerin ekspresyon değerleri referans gen (*GAPDH*) değerlerine bölünerek normalize edildi. *ATRX*, *NF1* ve *GAPDH* genlerine ait melting eğrileri Şekil 3-3’te verilmiştir.



Şekil 3-2: ATRX, NF1 ve GAPDH genlerine ait melting eğrileri

3.2.8. CIC Geni Primer Tasarımı ve PZR

Oligodendrogliomalarda en sık mutasyona uğrayan bölge çeşitli web siteleri (<https://www.cbioportal.org/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, <https://www.mycancergenome.org/>, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) kullanılarak belirlendi (Şekil 3-4). R215W/Q mutasyonunu kapsayacak şekilde bu bölgeye özgü primerler tasarlandı (Tablo 3-4).



Şekil 3-3: cBioPortal for Cancer Genomics verilerine göre *CIC* geni mutasyonlarının dağılımı

Tablo 3-4: CIC geni R215W/Q varyasyonunu saptamak için kullanılan primer dizileri

Gen Sembolü	Primer dizisi	PZR ürün boyutu (bp)
CIC (F)	5' - TACCCAAGGAACGGGACTCA -3'	459
CIC (R)	5'-TGCACCACTTCCAATCTGGG -3'	

PZR karışımı Tablo 3-5’de belirtilen şekilde hazırlandı. PZR cihazı (“Biorad Thermal Cycler”) cihazı kullanılarak Tablo 3-6’da belirtilen koşullarda PZR yapıldı.

Tablo 3-5: PZR bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
10X Taq DNA Polimeraz Buffer+ (NH ₄)SO ₄	4
MgCl ₂ (25 mM)	3,2
dNTP (2,5 mM)	3,2
Forward Primer (10 pmol/µL)	1,6
Reverse Primer (10 pmol/µL)	1,6
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,32
DNA	1
H ₂ O	25,08
Final Hacim	40

Tablo 3-6: PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	34
Amplifikasyon	58°C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	
Uzama	72°C	5 dakika	1
Soğuma	4°C	∞	-

3.2.9. DNA Metilasyon Analizi

3.2.9.1. İn Vitro Metilasyon

DNA metilasyon analizi için pozitif kontrol olarak kullanmak üzere in vitro metilasyon yapıldı. Bunun için DNA örneği (1,5 µg), metiltransferaz (SssI) enzimi (1,5 µL) ve enzim ile birlikte gelen “S-adenozilmetionin” (5 µL), 10X “NEB buffer” (5 µL) ile mix hazırlandı. 37°C’de 70 dakika, 65°C’de 20 dakika inkübe edildi. DNA’daki CpG adalarının metillenmesi sağlandı.

3.2.9.2. Sodyum Bisülfid Modifikasyonu

Metilasyon analizi yapılacak tümör dokusundan elde edilen DNA’ları öncelikle “EpiTect Bisülfid kit” (Qiagen) kullanılarak bisülfid ile muamele edildi. Bisülfid muamelesi sonrası DNA dizisindeki metile sitozinler değişmeden kalırken metile olmayan sitozinler urasile dönüşmektedir. Kitin sağladığı toz haldeki Bisülfid mix’e 800 µL “RNase-free” H₂O eklendi ve 5 dakika çözünmesi beklendi. DNA-Bisülfid karışımına; 1,5 ng için 7,5 µL DNA, 12,5 µL “RNase-free” H₂O, 85 µL çözünmüş “bisülfid mix” ve son olarak 35 µL “DNA protect buffer” eklendi. “Bisülfid mix” eklendikten sonra rengin yeşilden maviye döndüğü gözlemlendi. Bisülfid dönüşümü Tablo 3-7’deki koşullarda PZR cihazında (Biorad) gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası DNA kit protokolüne göre kolonlarla saflaştırıldı.

Tablo 3-7: DNA bisülfid dönüşümü koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	95°C	5 dakika
İnkübasyon	60°C	25 dakika
Denatürasyon	95°C	5 dakika
İnkübasyon	60°C	85 dakika (1 saat 25 dakika)
Denatürasyon	95°C	5 dakika
İnkübasyon	60°C	175 dakika (2 saat 55 dakika)
Denatürasyon	95°C	5 dakika
İnkübasyon	60°C	120 dakika (2 saat)
Soğukta tutma	10°C	∞

Bisülfıt dönüşümü sonrası DNA'nın saflaştırılması için aşağıdaki aşamalar izlendi:

1. Örnekler 1,5 µL'lik santrifüj tüpüne alındı.
2. 560 µL "Buffer BL" eklendi vorteks yapılarak, kısa bir santrifüj yapıldı.
3. Örnekler kolona aktarıldı, max hızda 1 dakika santrifüj sonrası toplama tüpü değiştirildi.
4. 500 µL "buffer BW" eklenip max hızda 1 dakika santrifüj yapıp toplama tüpü değiştirildi.
5. 500 µL "buffer BD" eklenip 15 dakika 20°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.
6. 500 µL "BW" eklendi, 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.
7. Tekrar 500 µL "BW" eklendi, 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.
8. En son olarak yeni toplama tüpüne aktarılan kolondaki kalan tüm sıvıları uzaklaştırmak için en yüksek hızda 1 dakika santrifüj yapıldı.
9. Kolonlar 56°C'de 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
10. Daha sonra kolonlar 1500 µL'lik tüplere alınıp kolon membranına hafif değerek 20 µL "EB buffer" eklendi ve en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi.
11. Elde edilen DNA'lar -20°C'de saklanır.

3.2.9.3. *MGMT* Geni Promotör Bölgesi Geni Primer Tasarımı

Tümör örneklerinde *MGMT* geninin promotör bölgesinin metilasyon analizi yapıldı. *MGMT* promotör bölgesi için genin metile olan ve metile olmayan haline ayrı ayrı primer çifti tasarlandı. "MS Primer Design Tool" kullanılarak öncelikle *MGMT* promotör bölgesindeki CpG adaları tespit edildi. Promotör bölgesinde yoğunlaşan adaları kapsayacak şekilde referans dizi değiştirilmeden ve bisülfıt muamelesi sonrası ortaya çıkacak dizi kullanılarak metile ve metile olmayan primerler tasarlandı. Bisülfıt muamelesi sonrası DNA dizisindeki metile sitozinler değişmeden kalırken metile olmayan sitozinler urasile dönüşmektedir. Tablo 3-8'de *MGMT* geni promotör bölgesi için primerler gösterilmektedir.

Tablo 3-8: MGMT geni promotör bölgesi pimer listesi

Gen Sembolü	Primer dizisi	PZR ürün boyutu (bp)
MGMT Metile F	5'- GGATATGTTGGGATAGTTCGC -3'	170
MGMT Metile R	5'- AACGCCTACAAAACCACTCG-3'	
MGMT metile olmayan F	5'- GGATATGTTGGGATAGTTTGT -3'	170
MGMT metile olmayan R	5'- AACACCTACAAAACCACTCA-3'	

3.2.9.4. Metilasyon Spesifik RT-PZR

Hazırlanan primerler ile *MGMT* promotör bölgesinin hangi oranda metilasyona sahip olduğu gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) ile incelendi. Her örnek için hem metile olmayan primerler ile hem de metile primerler ile ayrı kuyularda RT-PZR yapıldı. Metilasyon spesifik gerçek zamanlı PZR bileşenleri Tablo 3-9'da gösterilmiştir. Tablodaki bileşenler her örnek için iki tekrar olarak yapıldı ve Tablo 3-10'daki MS RT-PZR koşullarında LC480 cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3-9: MS RT-PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
SYBR Green	5
Forward primer (10pmol/µL)	0,75
Revers primer (10pmol/µL)	0,75
Bisülfid uygulanmış DNA	1
H ₂ O	2,5

Tablo 3-10: MS RT-PZR reaksiyon koşulları

Basamak	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
Ön Denatürasyon	1	5 dakika	95°C
Amplifikasyon	45	10 saniye	95 °C
		20 saniye	60 °C
		10 saniye	72 °C
Melting Curve	1	5 saniye	95°C
		1 dakika	65°C
		-	97°C
Soğutma	1	30 saniye	4°C

3.2.10. Yeni Nesil Dizileme Kütüphanesi Hazırlığı ve Dizileme

3.2.10.1. Dizileme Öncesi DNA Kalitesinin Belirlenmesi

“Archer Pre-Seq DNA QC Assay Kiti” ile bileşenleri; 10X “primer mix” ve “PreSeq Assay” standarttır (-20 C’de). Tablo 3-11’deki bileşenler ile RT- PZR yapıldı RT- PZR koşulları aşağıdaki Tablo 3-12’de verilmiştir.

Tablo 3-11: DNA kalite kontrolü için real time PZR bileşenleri

Bileşen	Miktar
2x Bioline Sensifast Syber Green	10 µL
10x Primer	2 µL
Ultrapure H ₂ O	3 µL
DNA (400 ng)	5 µL
Toplam	20 µL

Tablo 3-12: RT- PZR Koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Aktivasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	15 saniye	34
Amplifikasyon/ Uzama	64°C	1 dakika	

RT- PZR sonrası çıkan Ct değerleri ile DNA kalitesinin hesaplanması: her örnek iki tekrar çalışıldığı için ortalama Ct değerlerinden standartların ortalama Ct değerlerinin çıkarılması ile bulunur.

3.2.10.2. Yeni Nesil Dizileme Kütüphanesi hazırlığı

Tez çalışmasında “Archer Solid tümör gen paneli kiti” kullanıldı. Bu panel solid tümörlerle ilişkili 67 gende 660 bölge incelemek için tasarlanmıştır. Bu bölgelerdeki “SNV” ve “CNV” ve “Indel”ler saptandı.

Kütüphane hazırlamadan önce taze olarak 10 mM “Tris-HCl pH:8 (15 µL 1 M Tris-HCl + 1485 µL Ultrapure su ile), 20 mL %70 etanol (14 mL %100 etanol + 6 mL ultrapure su ile) ve 1 mL 5 mM NaOH (5 µL 1 M NaOH + 995 µL ultrapure su ile) hazırlandı.

1.DNA’nın fragmentasyonu için kitin belirttiği tüpler çıkarıldı. İçerisinde bulunan liyofilize haldeki içerik kapaktan uzaklaşması için kısa spin edildikten sonra buza alındı. Tüm çalışmalar buz üzerinde yapıldı. Konsantrasyonu 400 ng olarak ayarlanan 50 µL DNA’nın hepsi sırayla etiketlenmiş tüplere aktarıldı. Pipetle çözüldü. İşlem tamamlandıktan sonra kapak sıcaklığı $\geq 100^{\circ}\text{C}$ koşulu ile Tablo 3-13’teki termal döngü programı uygulandı.

Tablo 3-13: DNA Fragmentasyonu protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	4°C	1 dakika
2	37°C	12 saniye
3	72°C	20 dakika
4	4°C	∞

Fragmentasyon protokolü tamamlandığında tüpler buza alındı ve hemen spin yapıldı.

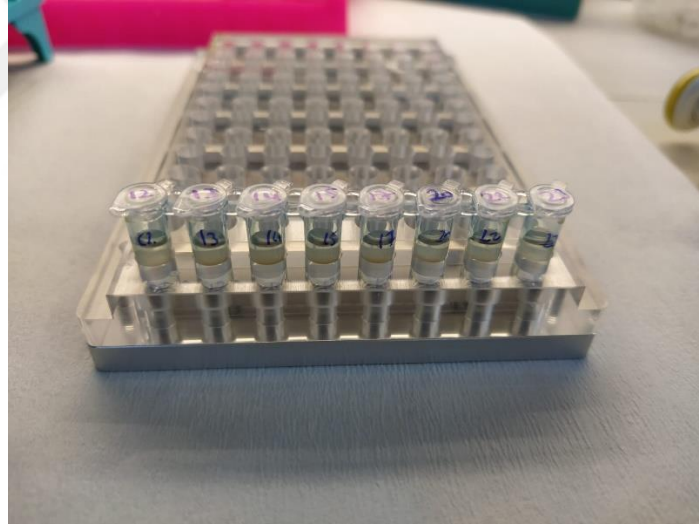
2. Uç tamiri (“End-repair”): Örnekler kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü ve buza alındı. 50 µL DNA fragmentasyon reaksiyonunun hepsi uç tamiri tüplerine eklendi. Çözüldükten sonra tekrar kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü ve buza alındı. Isıtmalı kapak kapalı bir şekilde Tablo 3-14’teki uç tamiri koşulları uygulandı.

Tablo 3-14: Uç tamiri için uygulanan koşullar

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	25°C	30 dakika
2	4°C	∞

Tüpler 4°C’ye gelince buz üzerine alındı ve kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü. Uç tamiri aşamasının “Kapa Ampure Magnetik boncuklar” ile temizlenmesi aşamasına geçildi.

Oda ısındaki “Kapa Ampure boncuklar” vortexlenerek homojenize edildi. Her tüpe 125 μ L (2,5x hacim) “Kapa Ampure boncuklarından” eklendi. Pipetlendi ve vortex yapıldı. Kapağa yapışanlar için kısa süreli santrifüj yapıldı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü ve manyetik boncukların belli bir alanda toplanması için magnetik stand üzerine yerleştirildi (Şekil 3-5). 4 dakika stand üzerinde tüm boncukların toplanması sağlandı. Dikkatli bir şekilde boncuklara değmeden üst sıvı atıldı. Eğer boncuklara değdirildiyse örnek tüpe geri verildi ve tekrar kısa bir inkübasyon yapıldıktan sonra üst sıvı çekildi. 2 kez ile 200 μ L %70 etanol yıkandı. Alkol tüp duvarından verildi ve 30 saniyenin sonunda boncuk pelletinin karşı duvarından doğru boncuklara değmeden etanol uzaklaştırıldı. Tüpler magnetik standdan uzaklaştırıldı. DNA’yı elde etmek için 20 μ L 10 mM Tris-HCl eklendi ve magnetik stand üzerine geri kaldırıldı. 2 dakika inkübe edildi, sonra diğer aşamadaki ligasyon 1 tüplerine aktarıldı.



Şekil 3-4: Tüplerin magnetik stant üzerine yerleştirilmesi

3. Ligasyon 1 aşaması için tüpler kısa süreli santrifüj edildi ve buza alındı. 20 μ L saflaştırılmış DNA Ligasyon 1 tüplerine aktarıldı. Çözdürüldükten sonra ligasyon 1 için Tablo 3-15’te belirlenen protokol uygulandı.

Termal döngü cihazında kapak $\geq 100^{\circ}\text{C}$ ’de kullanıldı.

Tablo 3-15: Ligasyon 1 aşaması termal döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	37°C	15 dakika
2	4°C	∞

Reaksiyon tamamlandıktan sonra cihazdan alınan tüpler kısa süreli santrifüj yapılarak buza alındı. Ligasyon 1 yıkama basmağı için tüplere homojen haldeki 2,5x hacimde (50 µL) “Kapa Ampure boncukları” eklendi ve çözündürüldü. 5 dakika oda ısısında inkübe edildi ve magnetik stand üzerine alındı. 4 dakika magnetik standta tutuldu, üst sıvı uzaklaştırıldı. Boncuklar 200 µL %70 etanol ile iki kez yıkandı. 2. yıkama sonrasında alkol tamamen uzaklaştırıldı. Standtan uzaklaştırılan tüplere 42 µL 10 mM Tris-HCl eklendi ve boncuklar çözüldü. Çözdükten sonra tekrar magnetik standta alındı ve 2 dakika bekledikten sonra diğer aşamanın tüplerine temizlenen DNA aktarıldı.

4.MBC adaptör bağlanması aşaması kütüphane hazırlığının en önemli aşamasıdır. Her örnek için kodu belli olan özgün bir adaptör bağlandı. Tüpler A17-A24 olarak soldan sağa sıralı bir şekilde geldiği için hangi tüpe hangi hasta örneği eklendiği dikkatli bir şekilde takip edildi ve yazıldı. Önceki aşamada temizlenmiş DNA’dan 40 µL MBC adaptör tüplerine eklendi. Çözündürüldükten sonra diğer aşamaya geçildi.

5. Ligasyon 2 aşaması için belirtilen tüpler buza alındı. MBC adaptör bağlama tüplerindeki 40 µL DNA ligasyon 2 tüplerine eklendi. Çözündürüldü ve kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü. PZR cihazında Tablo 3-6’da belirtilen program uygulandı.

Tablo 3-16: Ligasyon 2 aşaması termal döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	22°C	5 dakika
2	4°C	∞

Program bittiğinde ligasyon 2 tüplerindeki DNA’yı yıkama aşamasına geçildi. Bu aşamada kitin sağladığı magnetik boncuklar ve solüsyonlar kullanıldı. Ligasyon 2 yıkama aşaması için yeni tüplere 50 µL ligasyon temizleme boncukları eklendi. 1 dakika magnetik stand üzerinde temizleme boncukları pellet halinde çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldı, Ligasyon 2 aşamasındaki DNA temizleme boncukların üzerine eklendi.

Vortexlendikten sonra 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Stanta alınan tüpler 1 dakika inkübe edildi. 2 kez 200 µL temizleme solüsyonu ile yıkandı. 2 yıkamadan sonra temizleme solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı. 200 µL Ultrapure (Nukleaz-Free) su ile çözülen boncuklar vortex ve spin yapıldıktan sonra 1 dakika magnetik standta tutuldu. Tüm üst sıvı uzaklaştırıldı ve 36 µL 5 mM NaOH ile temizlenen DNA çözdürüldü ve boncuklara bağlı DNA'lar ile Tablo 3-17'deki termal döngü programı uygulandı. PZR cihazında kapak $\geq 100^{\circ}\text{C}$ 'de kullanıldı.

Tablo 3-17: Ligasyon temizleme aşaması sırasında uygulanan koşullar

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	75°C	10 dakika
2	4°C	∞

Program tamamlandığında örnekler kısa süreli santrifüj edildi ve buza alındı ve bir sonraki aşamaya geçildi.

6. İlk PZR için belirtilen tüpler buza alındı. Kitin belirttiği “gen spesifik primer 1” (GSP1) tüpü de buza alındı ve protokole göre 4 µL GSP1 primeri ilk PZR tüplerindeki boncuklara dokunmadan eklendi. Magnetik stand üzerinde bulunan Ligasyon 2 yıkama aşaması tamamlanan DNA 10 mM Tris-HCl çözeltisinde 36 µL alınarak çözüldü ve ilk PZR strip tüplerine aktarıldı. Tamamen çözdürüldükten sonra Tablo 3-18'deki PZR programı uygulandı.

Tablo 3-18: İlk PZR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	95°C	3 dakika	18
2	95°C	30 saniye	
3	65°C	3 dakika	
4	72°C	3 dakika	
5	4°C	∞	

İlk PZR yıkama aşaması tekrar “Kapa Ampure boncukları” ile gerçekleştirildi. Temizlenen DNA 10 mM Tris-HCl çözeltisinden 38 µL alınarak çözdürüldü. 2 dakika magnetik stand üzerinde bekletildi ve 36 µL bir sonraki aşama için alındı.

7. İkinci PZR için belirtilen tüpler tüplerini çıkarıldı ve buza alındı. 36 µL ilk PZR aşamasından temizlenen DNA örnekleri alınarak ikinci PZR tüplerine eklendi. Kitin belirttiği “gen spesifik primer 2” (GSP2) tüpü de buza alındı ve protokole göre 4 µL GSP2 primeri ikinci PZR tüplerine eklendi ve çözüldü. Tamamen çözdürüldükten sonra Tablo 3-19’deki PZR programı uygulandı.

Tablo 3-19: İkinci PZR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	95°C	3 dakika	
2	95°C	30 saniye	20
3	65°C	3 dakika	
4	72°C	3 dakika	
5	4°C	∞	

Program tamamlandığında elde edilen kütüphane son kez “Kapa Ampure boncuklar” ile temizlendikten sonra MBC barkod kodları ve hasta numaralarının belirtildiği DNA bağlanmayan özel tüplere aktarıldı. Tüplere toplam 18 µL kütüphane ürünü aktarıldı. 1 µL örnek kütüphane kalite kontrolü için Qubit ölçümünde kullanıldı. Kalitesi belirlenen kütüphaneler son basamakta cihaz için belirlenen miktarlarda birleştirildi. DNA miktarlarına göre 2 µL her örnekten alınarak tek bir tüpte birleştirildi ve “Illumina NextSeq 550” cihazında koşum (run) protokolü uygulandı. “Archer Analysis” platformunda dizileme sonuçlarının analizi yapıldı.

3.2.11. Yeni Nesil Dizileme Verileri Analizi

Nextseq 550 cihazında koşum tamamlandıktan sonra dizileme verileri okunabilir format Fastq'lara dönüştürüldü. Fastq uzantılı dosyalar “Archer Analysis” (v7.0 veya üstü) platformuna yüklendi. “VariantPlex Solid Tümör” kütüphanesinin veri analizi için hedef bölge dosyası yüklendi. İkincil analizler (okuma kırpma/temizleme, tekilleştirme, hata düzeltme, hizalama ve mutasyon arama) ve bazı üçüncül analizler (örneğin, ek açıklamalar ve protein etkisi tahminleri) yapıldı. “VariantPlex Solid Tümör” kütüphanesi kopya sayısı varyasyonu, “SNP/InDel” analizi yapılarak raporlandı.

Archer analiz programından ortaya çıkan “SNP”, “Indel” ve “CNV” sonuçları “MyCancer Genome”, “cBioportal”, “Clinvar” gibi internet sitelerinden araştırılarak patojenite durumları ve görülme yüzdeleri belirlendi.

3.2.12. Yeni Nesil Dizileme Sonuçlarının Sanger ile Doğrulanması

Archer platformu ile analiz edilen verilerden çıkan sonuçlarda *FOXL2* ve *FBXW7* genlerin dizilerindeki tekrarlı bölgeler ve okuma sayısının yeterli olmaması nedeniyle yanlış pozitif sonuç ortaya çıkabilmektedir. Bu mutasyonların varlığı Sanger dizileme ile doğrulandı. Hastalarda bulunan mutasyonları kapsayacak şekilde *FOXL2* ve *FBXW7* genleri için primer tasarlandı (Tablo 3-20). Tablo 3-21’de verilen bileşenler ile Tablo 3-22’deki PZR koşullarında gerçekleştirildikten sonra Sanger hizmet alımı yapıldı.

Tablo 3-20: *FOXL2* ve *FBXW7* genleri primerleri

Gen Sembolü	Primer dizisi	PZR ürün boyutu (bp)
<i>FOXL2</i> (F)	CTTCCTCAACAACCTCGTGGC	239
<i>FOXL2</i> (R)	CCAGGCCATTGTACGAGTTC	
<i>FBXW7</i> (F)	AAGACCAGTCATAGGAGAAGTGG	446
<i>FBXW7</i> (R)	TGTAATTCGGCGTCGTTGTTG	

Tablo 3-21: PZR bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
10X Taq DNA Polimeraz Buffer+ (NH ₄)SO ₄	4
25 mM MgCl ₂	3,2
2,5 mM dNTP	3,2
Forward/ Revers Primer (10 pmol/µL)	1,6
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,32
DNA	1
H ₂ O	25,08
Toplam Hacim	40

Tablo 3-22: Sanger doğrulama için PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	34
Amplifikasyon	58°C	30 saniye	

Uzama	72 °C	30 saniye	
Uzama	72°C	5 dakika	1
Soğuma	4°C	∞	-

3.2.13. İstatistiksel Analiz

Yeni nesil dizileme analizi sonucunda elde edilen veriler, hastaların yaş, cinsiyet ve klinik bulguları ile birlikte değerlendirilerek SPSS 25 (IBM corp.) programı ile istatistik analizleri yapıldı. P değeri $\leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hastaların klinik verileri; DSÖ sınıflandırması, tümör yeri, immünohistokimyasal sonuçları ile tez çalışmasında elde edilen moleküler genetik varasyonlar, *ATRX*, *NF1* genlerinin ekspresyon değerleri, *CIC* geni mutasyon durumu ve *MGMT* geni metilasyon durumu birlikte değerlendirildi.

İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U test, Ki-kare testi ve korelasyon testi; ikiden çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Hastaların sağkalım analizleri için Kaplan Meier yöntemi uygulandı.

4. BULGULAR

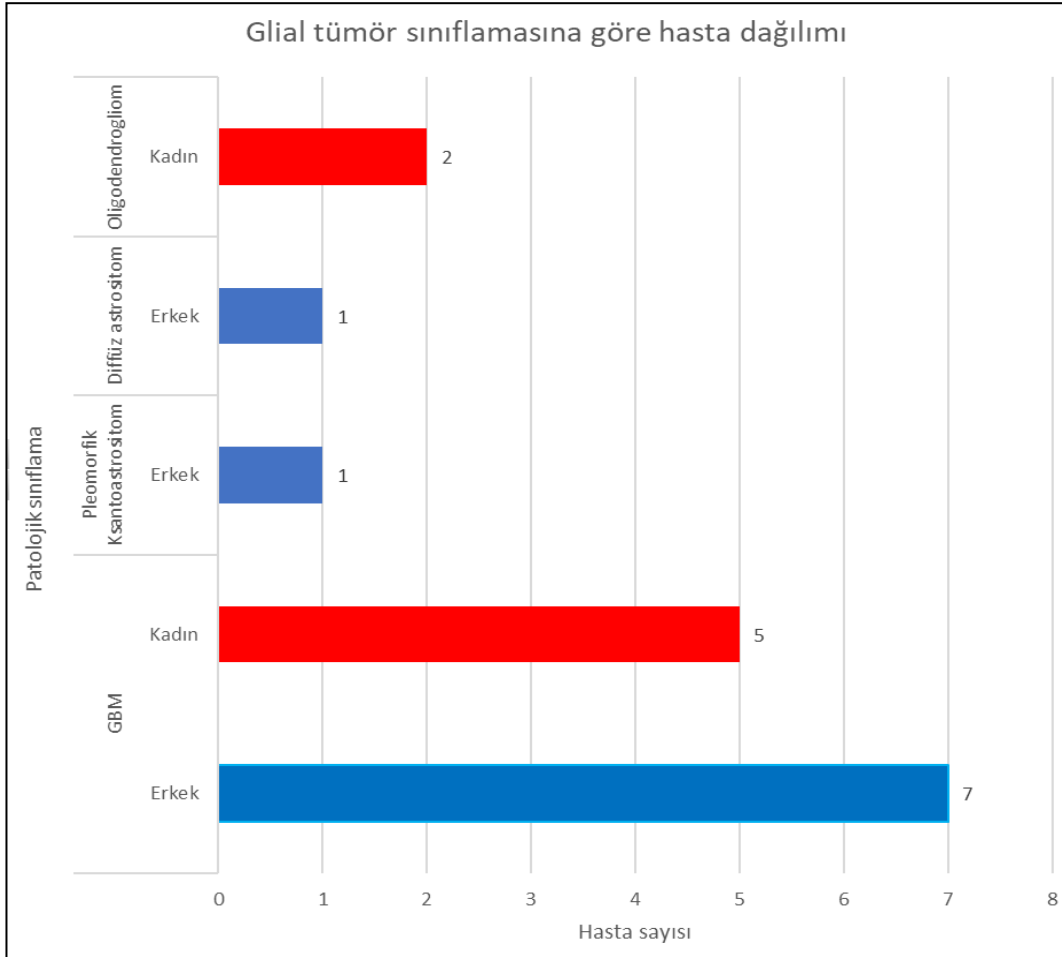
4.1. Glial Tümörlü Hastaların Demografik, Patolojik Bilgileri ve Sınıflaması

2020-2022 yılları arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran 18-80 yaş aralığındaki glial tümör tanısı ile ameliyat olarak çalışmaya dahil edilen 16 hastadan 7'si kadın 9'u erkektir. Hastalar patoloji raporlarına göre yüksek evre (12) ve düşük evre (4) olarak gruplanmıştır. Glial tümörlü hastaların demografik ve patolojik bilgileri Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Glial tümörlü hastaların demografik ve patolojik bilgileri

Özellik	Sayı (n)
Cinsiyet (ortalama yaş)	Kadın
	7 (52)
	Erkek
	9 (53)
	Toplam (Yaş aralığı)
	16 (53) (19-79)
DSÖ Sınıflama Derecesi (%)	Evre 2
	4 (25)
	Evre 4
	12 (75)
Histolojik Alt Grup	Oligodendroglioma
	2
	Difüz astrositom
	1
	Pleomorfik Ksantoastrositom
	1
	Glioblastoma
	12
Tümör Lokalizasyonu	Frontal
	2
	Temporal
	6
	Parietal
	5
	Oksipital
	3
Uygulanan Tedavi (%)	Ameliyat
	16 (100)
	Kemoterapi
	4 (25)
	Radyoterapi
	7 (43.7)
	Gamma Knife
	2 (12.5)

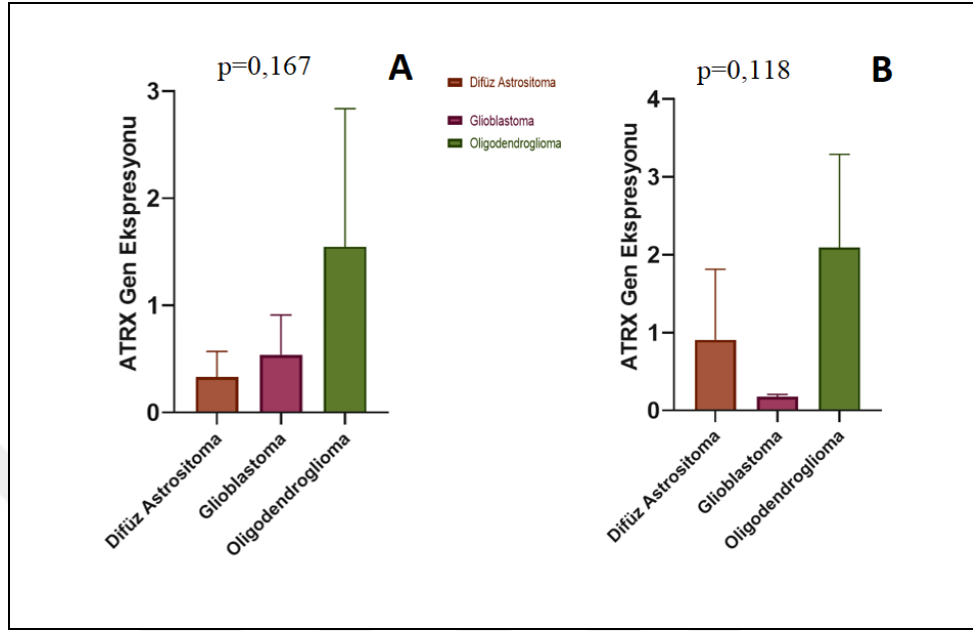
Cinsiyete göre hastaların glial tümör alt sınıflaması Şekil 4-1’de gösterilmiştir. 12 glioblastoma (Evre 4) hastasının yedisi erkek, beşi kadındır. Düşük evre (Evre 2) glial tümörlü dört hastanın ikisi oligodendoglioma tanılı kadın, diğer ikisi ise difüz astrositom ve pleomorfik ksantoastrositom tanılı erkek olgulardır.



Şekil 4-1: Cinsiyete göre glial tümör alt sınıf dağılımı

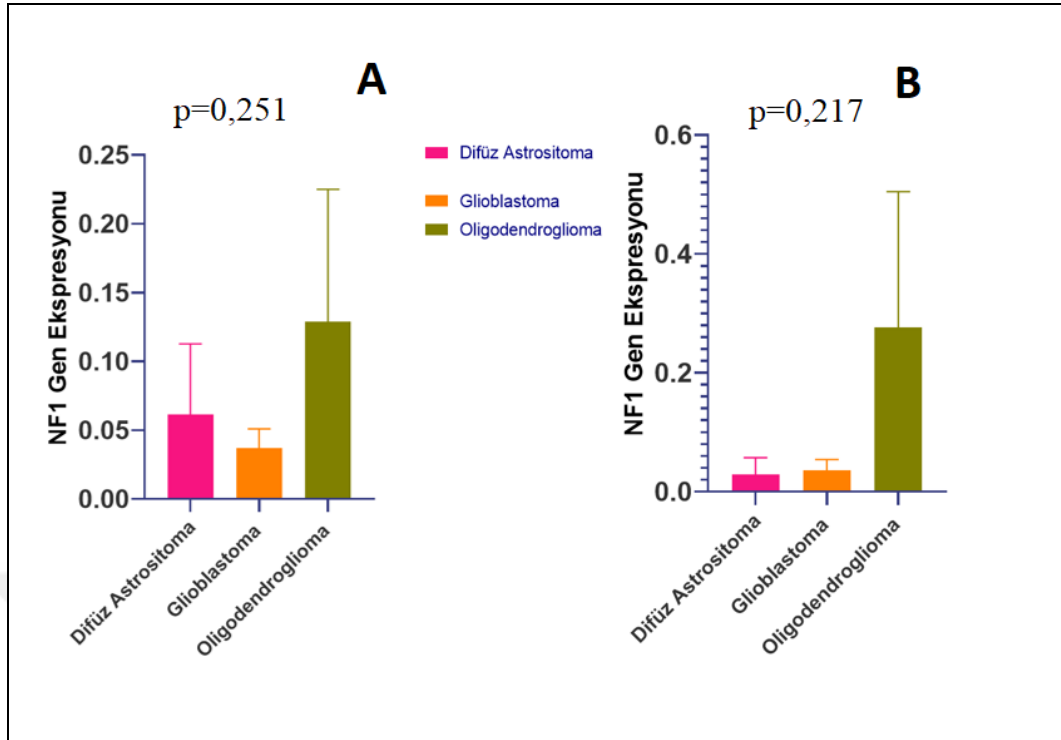
4.2. Düşük ve Yüksek Evreli Hastalarda ATRX ve NF1 Gen Ekspresyon Analizi

ATRX ekspresyonunun kaybı astrositomlar için spesifik bir belirteç olmakla birlikte oligodendrogliomalarda bulunmamaktadır. Glial tümörlü hastalarının tümör dokularında ve kan örneklerinden qRT-PZR yöntemiyle *ATRX* geninin ekspresyon seviyesi belirlendi. Oligodendrogliomalara göre astrositomalarda ve glioblastomalarda gen ifadesinin azaldığı görüldü (Tümör dokusu $p=0,167$, Periferik kan $p=0,118$) (Şekil 4-2).



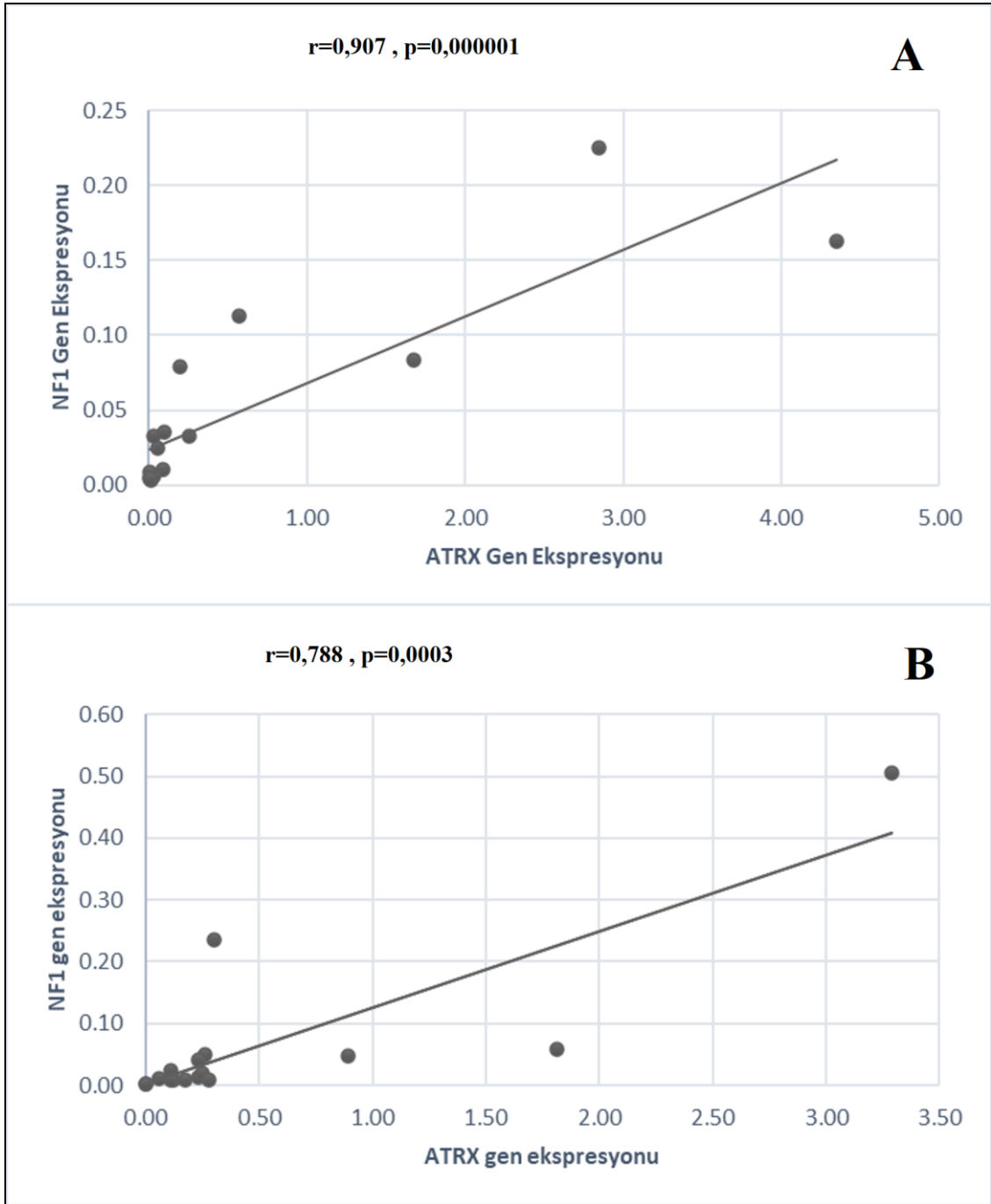
Şekil 4-2: ATRX gen ekspresyon analizi (A: Tümör dokusu örnekleri, B: Kan örnekleri)

NF1 geni fonksiyon kaybı, kötü prognoza sahip glioblastomalarda sıklıkla görülmektedir. Glial tümörlü hastaların tümör dokularında ve kan örneklerinde qRT-PZR yöntemiyle *NF1* geninin ekspresyon seviyesi belirlendi. Kan ve tümör dokularında oligodendrogliomalara göre astrositomalarda ve glioblastomalarda gen ifadesinin azaldığı görüldü (tümör dokusu için $p=0,251$, periferik kan için $p=0,217$) (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: *NF1* gen ekspresyon analizi (A: Tümör dokusu örnekleri, B: Kan örnekleri)

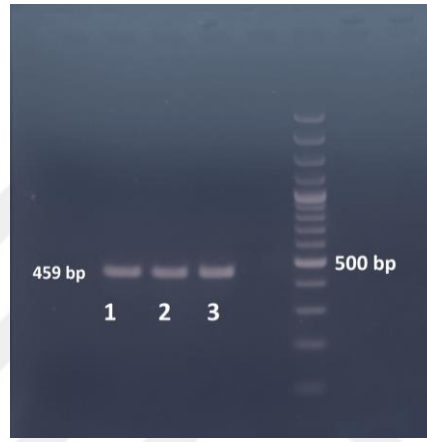
Korelasyon analizi yapıldığında hem tümör hem de kan örneklerinde *ATRX* ve *NF1* gen ifadeleri arasında pozitif korelasyon bulundu (sırasıyla $p=0,000001$, $r=0,907$ ve $p=0,0003$, $r=0,788$) (Şekil 4-4A ve Şekil 4-4B).



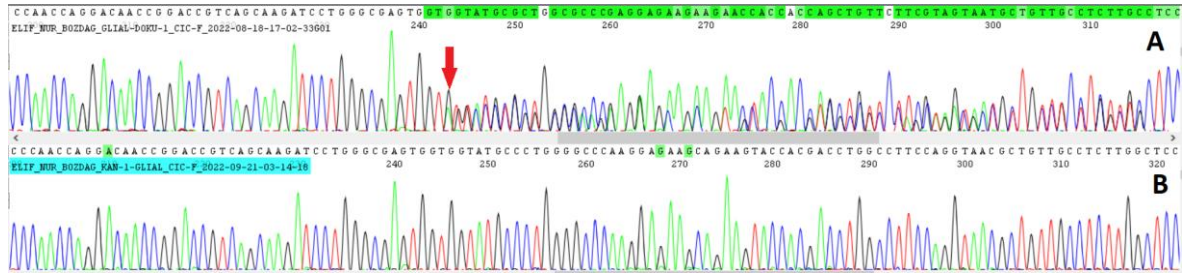
**Şekil 4-4: ATRX ve NF1 gen ekspresyonlarının korelasyonu (A: Tümör dokusu örnekleri
B: Periferik kan örnekleri)**

4.3. Oligodendroglioma ve Diğer Glial Tümörlerde *CIC* Geni Mutasyon Analizi

Oligodendrogliomalarda sıklıkla görülen *CIC* geni mutasyonu (p.R215W) açısından hastaların tümör dokusu ve kan örnekleri analiz edilmiştir. En sık gözlenen bu mutasyonu içerecek şekilde yapılan PZR, Sanger dizileme ile analiz edilmiştir. PZR sonrası %2'lik agaroz jelde yaklaşık 500 baz çifti boyutundaki bantlar görüntülendi ve Sanger dizileme hizmet alımı ile dizileme yapıldı (Şekil 4-5). Sanger dizileme sonuçlarına göre oligodendroglioma tanılı bir hastada 5. eksonda GGT 3 nükleotitik delesyon saptandı (p.W238del).

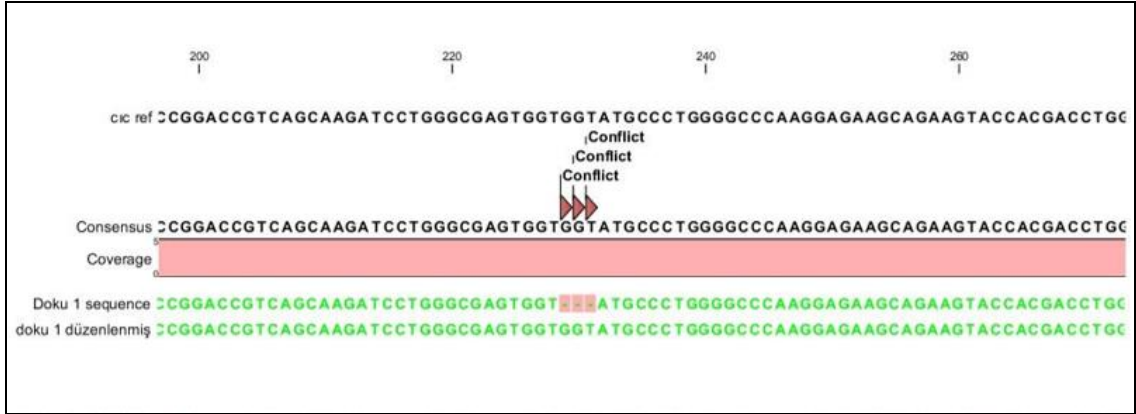


Şekil 4-5: *CIC* geni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (1-3: Tümör dokusu örnekleri)



Şekil 4-6: Glial 1 nolu hastanın (Oligodendroglioma) *CIC* geni Sanger dizileme sonucu (A: Tümör dokusu örneği, B: Kan örneği)

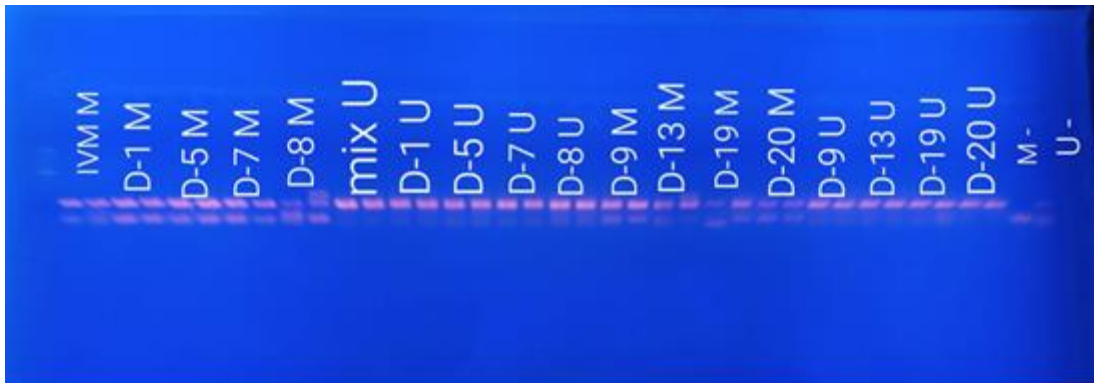
Glial 1 kodlu oligodendroglioma alt sınıfına ait hastanın Sanger dizileme sonucu Şekil 4-6'da gösterilmiştir. Delesyon olan bölgenin dizileme sonucu Şekil 4-7'de gösterilmiştir.



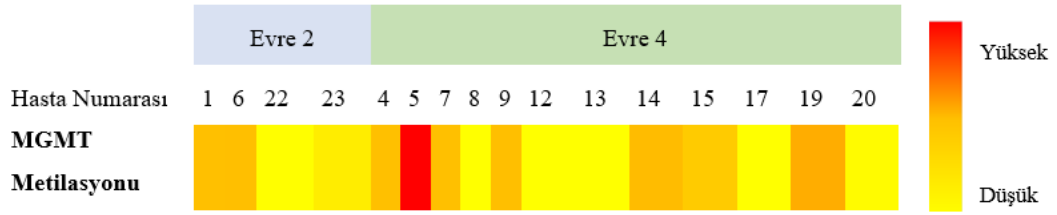
Şekil 4-7: Gliyal 1 nolu hastanın tümör dokusunda *CIC* geni Sanger dizileme sonucu

4.4. *MGMT* Geni Promotör Bölge Metilasyon Analizi

MGMT geni promotör bölgesi metilasyon durumu RT-PZR ile analiz edildi. MS-PZR için negatif kontrol olarak H₂O kullanıldı. Pozitif kontrol olarak in vitro metilasyon yapılan örnekler kullanıldı. MS-RT PZR sonrası örneklerin amplifikasyon kontrolü jelde görüntüleme ile yapıldı ve Ct değerleri ile analiz edildi. Şekil 4-8’de MS RT-PZR sonrası *MGMT* geni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizi ile yorumlanmıştır. *MGMT* metilasyon yoğunluğunu gösteren ısı haritası Şekil 4-8’de gösterilmiştir.

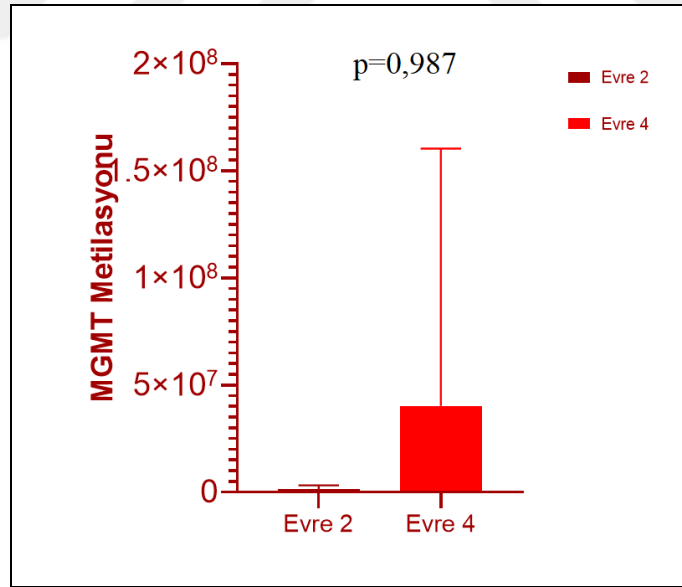


Şekil 4-8: MS-RT PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (D: Tümör dokusu, M: Metile primerler ile yapılan PZR, U: metile olmayan primerler ile yapılan PZR, Not: Altta bantlar primer dimerlerini göstermektedir.)



Şekil 4-9: *MGMT* metilasyonu ısı haritası

MGMT metilasyonu düşük evreli hastalarda daha düşük bulunurken yüksek evreli glioblastoma hastalarında metilasyon daha yüksek düzeyde bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,987$) (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Evre 2 ve Evre 4 hastalarda *MGMT* metilasyon düzeylerinin karşılaştırılması

4.5. Düşük ve Yüksek Evreli Hastalarda Yeni Nesil Dizileme Sonuçları

“Archer Variant Plex solid tümör gen paneli” ile yapılan hedefli genlerin analizleri sonucunda somatik filtre (gnomAD Allel Frekansı $\leq 0,05$, Allel Frekansı $\geq 0,027$, Okuma Sayısı ≥ 100 , Varyant alelin yüzde oranı $\geq \%5$, varyant alelin yüzde oranı (bilinen patojenik varyant ise) $\geq \%2$ (varyant allel için en az 7 okuma)) uygulaması ile yüksek ve düşük evreli hastalarda ortaya çıkan genetik değişimler Şekil 4-11’de özetlendi.

	EVRE 2				EVRE 4											
Hasta kodu /Gen Adı	1	23	6	22	4	5	7	8	9	12	13	14	15	17	19	20
<i>BRAF</i>																
<i>CDK4</i>																
<i>EGFR</i>																
<i>EGFR</i>																
<i>FBXW7</i>																
<i>HNF1A</i>																
<i>IDH1</i>																
<i>MDM2</i>																
<i>MLH1</i>																
<i>NOTCH1</i>																
<i>NRAS</i>																
<i>PIK3CA</i>																
<i>PIK3R1</i>																
<i>PTEN</i>																
<i>PTPN11</i>																
<i>RB1</i>																
<i>TERT</i>																
<i>TP53</i>																
<i>VHL</i>																

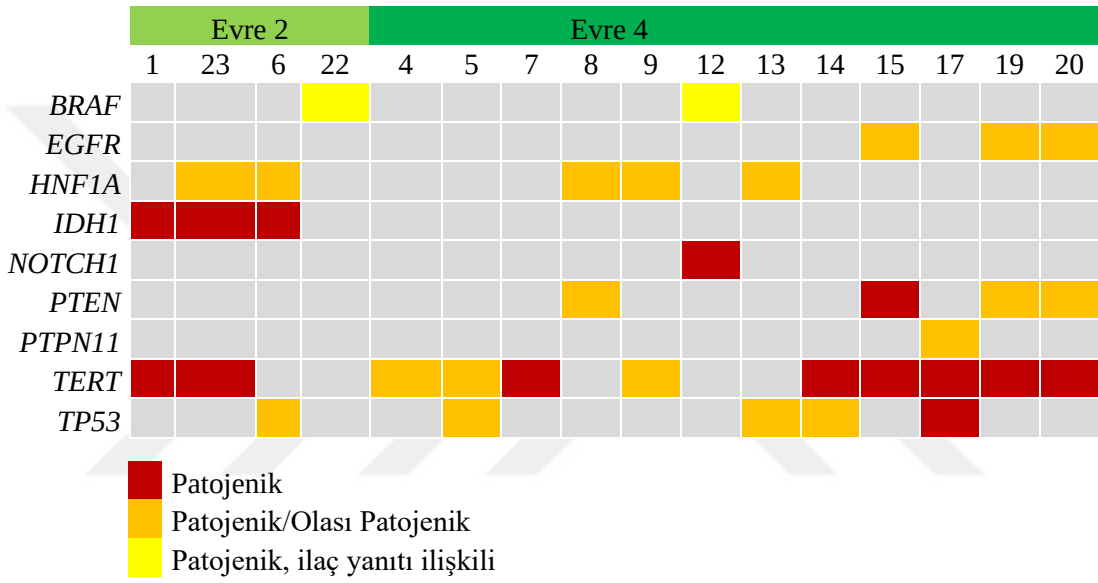
	Yanlış anlamlı mutasyon	Splice bölge varyantı
	Çerçeve kayması mutasyonu	Anlamsız Mutasyon
	Delesyon	Regülatör bölge varyantı
	Kopya sayısı kazanımı	

Şekil 4-11: Hastalarda yeni nesil dizileme ile saptanan genetik değişimler

Archer analiz platformu tarafından uygulanan somatik filtre sonuçlarına göre YND analizi sonucunda toplam 67 genin 25 tanesinde SNV, Indel ve CNV saptandı.

4.5.1. YND Analizi Sonucuda Saptanan Patojenik Varyantlar

Hastalığın patogenezi etkileyen patolojik varyantlardır. Somatik mutasyon sonucu oluşan bu patojenik varyantlar glial tümörlerde alt sınıflamada önemli olmaktadır. Saptanan varyantların bir kısmı glial tümörlerle ilişkili bulundu. Ancak bazı varyantlar glial tümörlerle ilişkili değildir. İlişkili olmayan varyantlar çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Patojenik varyant saptanan genler Şekil 4-12’de gösterildi.



Şekil 4-12: Hastalarda saptanan patojenik varyantlar

Patojenik varyantların ayrıntılı bilgileri Tablo 4-2’de özetlendi. *BRAF*, *EGFR*, *IDH1* ve *PTPN11* genetik varyantları glial tümörlerle ilişkili varyantlar olarak hastalarda bulundu.

Tablo 4-2: Patojenik varyant bulunan genler

Gen sembolü	rs number	Varyasyon bilgisi	Patojenite	İlişkili hastalık	Varyant bulunan hastalar
<i>BRAF</i>	rs113488022	NM_004333.6(<i>BRAF</i>): c.1799T>A (p.Val600Glu)	Patojenik, Olası patojenik	Astrositoma, Glioblastoma, Beyin sapı gliomu, Beyin neoplazmı	22, 12
<i>EGFR</i>	rs105751982 9 rs149840192 rs769696078	NM_005228.5(<i>EGFR</i>): c.787A>C (p.Thr263Pro) NM_005228.5(<i>EGFR</i>): c.866C>T (p.Ala289Val) NM_005228.5(<i>EGFR</i>): c.865G>A (p.Ala289Thr)	Olası patojenik	Beyin neoplazmı, Glioblastoma, Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu	15,19,20
<i>HNF1A</i>	rs762703502	NM_000545.8(<i>HNF1A</i>): c.864del (p.Pro291fsTer51)	Olası patojenik	Monojenik diyabet, gençlerde olgunluk başlangıçlı diyabet	6,8,9,13,23
<i>IDH1</i>	rs121913500	NM_005896.4(<i>IDH1</i>): c.395G>A (p.Arg132His)	Patojenik, Olası patojenik	Glioblastoma, Beyin Neoplazmı, Medulloblastoma, Akut miyeloid lösemi, Multipl miyelom	1,6,23
<i>NOTCH1</i>	rs61751542	NM_017617.5(<i>NOTCH1</i>): c.4129C>T (p.Pro1377Ser)	Patojenik	Miyeloproliferatif neoplazm, sınıflandırılmayan	12
<i>PTEN</i>	rs125712471 9	NM_000314.8(<i>PTEN</i>): c.802-1G>A	Patojenik, Olası patojenik	PTEN hamartom tümör sendromu, Makrosefali-otizm sendromu, Kalıtsal kansere yatkınlık sendromu, Cowden sendromu	8,15,19,20, 17
	rs587782360	NM_000314.8(<i>PTEN</i>): c.403A>G (p.Ile135Val)	Patojenik		
	rs869312776	NM_000314.8(<i>PTEN</i>): c.408T>G (p.Cys136Trp)	Olası patojenik		
	rs121913294	NM_000314.8(<i>PTEN</i>): c.518G>A (p.Arg173His)	Patojenik, Olası patojenik		
	rs786204862	NM_000314.8(<i>PTEN</i>): c.493-1G>A	Patojenik, Olası patojenik		
<i>PTPN11</i>	rs121918464	NM_002834.5(<i>PTPN11</i>): c.226G>A (p.Glu76Lys)	Patojenik, Olası patojenik	Astrositom, Nöroblastom, Juvenil miyelomonositik lösemi, Rasopati, Noonan sendromu	17
<i>TERT</i>	rs124253581 5	NM_198253.2(<i>TERT</i>): c.-124C>T	Patojenik, Olası patojenik	Melanom, kutanöz malign, Glial tümör	1,4,5,7,9,1 4, 15, 17,19,20,2 3
<i>TP53</i>	rs730881999	NM_000546.6(<i>TP53</i>):	Patojenik	Glioblastoma, Glial	

		c.380C>A (p.Ser127Tyr)		tümör, Li-Fraumeni sendromu, Kalıtsal kansere yatkınlık sendromu	
	rs876659675	NM_000546.6(<i>TP53</i>): c.764T>C (p.Ile255Thr)	Olası patojenik		
	rs1057517840	NM_000546.6(<i>TP53</i>): c.626_627del (p.Arg209fs)	Patojenik		

4.5.2. YND Analizi Sonucunda Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantlar

Archer analiz platformu tarafından uygulanan somatik filtre sonuçlarına göre YND analizi sonucunda tüm hastalarda ortalama 12 somatik varyant belirlenmiş olup bunlardan iki genin dizileme hatası olduğu belirlendi. Gerçek varyantların “COSMIC”, “ClinVar”, “NCBI” ve “ENSEMBL” sitelerinde varyant analizi yapıldı. İleri analiz sonucunda patojenik olmayan varyantlar iyi huylu (benign) veya klinik önemi bilinmeyen (VUS) olarak gruplandırıldı. Tablo 4-3’te VUS varyantların gen listesi gösterildi.

Tablo 4-3: VUS varyantların gen listesi

Gen sembolü	Varyant ismi	rs numarası	Varyant bulunan hastalar
<i>FBXW7</i>	NM_018315.4:c.345-6_345-5del	rs745908066	Tüm hastalar
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4(<i>PIK3CA</i>):c.1571G>A (p.Arg524Lys)	rs104885999	7
<i>VHL</i>	NM_000551.4(<i>VHL</i>):c.86_87delinsTT (p.Gly29Val)	rs879254115	23

4.5.3. YND Analizi İle Saptanan Benign Varyantlar

İleri analiz sonucunda patojenik olmayan iyi huylu (benign) varyantların gen listesi Tablo 4-4’te gösterildi.

Tablo 4-4: Benign varyantların gen listesi

Gen sembolü	Varyant ismi	rs numarası	Varyant bulunan hastalar
APC	NM_000038.6(APC):c.2586C>G (p.Asn862Lys), NM_000038.6(APC):c.7504G>A (p.Gly2502Ser), NM_000038.6(APC):c.3949G>C (p.Glu1317Gln)	rs147972247, rs2229995, rs1801166	1,4,22
CDH1	NM_004360.5(CDH1):c.2440-6C>G	rs139757930	4
CDKN2A	NM_000077.5(CDKN2A):c.442G>A (p.Ala148Thr)	rs3731249	7,13,19
FGFR3	NM_000142.5(FGFR3):c.1075+5C>T	rs3135885	6
ERBB4	NM_005235.3(ERBB4):c.884-7del, NM_005235.3(ERBB4):c.884-8_884-7del, NM_005235.3(ERBB4):c.884-20dup	rs67894136	Tüm hastalar
MET	NM_000245.4(MET):c.1124A>G (p.Asn375Ser)	rs33917957	5
MLH1	NM_000249.3:c.1217G>A	rs41294980	12
MPL	NM_005373.3(MPL):c.1565+5C>T	rs41269541	8
NRAS	NM_002524.4:c.46A>G	rs142739534	20

4.5.4. YND Analizi İle Saptanan Kopya Sayısı Değişimleri

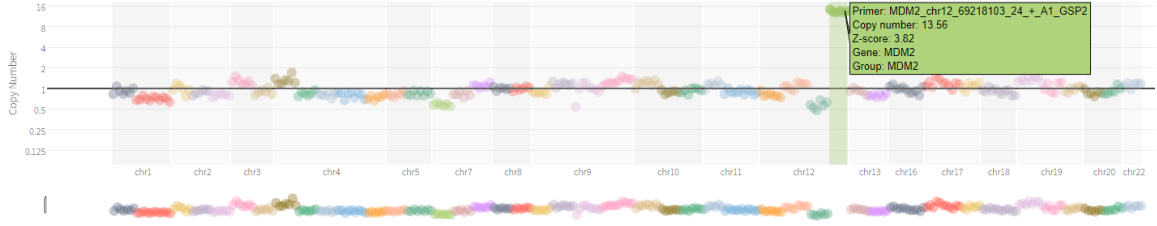
Hedefli gen panelinde analiz edilen genlerden *EGFR*, *CDK4* ve *MDM2* genlerinde kopya sayısı artışı tespit edildi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Kopya sayısı artışı bulunan genler

Gen Sembolü	Kopya Sayısı Artışı	Varyant bulunan hastalar
<i>CDK4</i>	4,62	14
	4,57	20
<i>EGFR</i>	3,25	4
	8,67	7

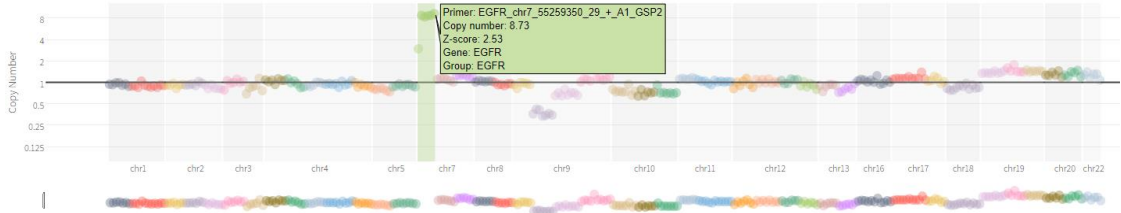
	3,11	15
	5,38	20
<i>MDM2</i>	13,18	17

En yüksek CNV artışı Glial 17 nolu hastada *MDM2* geninde 13,18 katlık bir artış bulundu (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Glial 17 nolu hasta *MDM2* CNV sonucu

EGFR geni amplifikasyonu, glioblastomada karakteristik genetik değişim olarak gösterilmektedir ancak düşük dereceli gliomalarda nadir görülmektedir. *EGFR* kopya sayısı artışı değişimleri 12 glioblastoma hastasının 4'ünde görülmektedir (Tablo 4-5). Glial 7 nolu hastaya ait *EGFR* geni CNV sonucu Şekil 4-14'de gösterilmektedir.

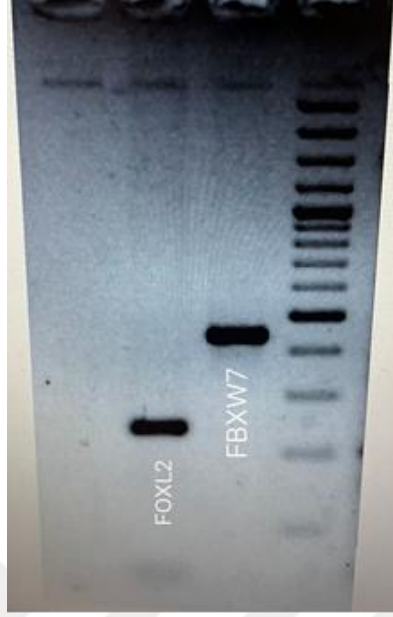


Şekil 4-14: Glial 7 nolu hasta *EGFR* CNV sonucu

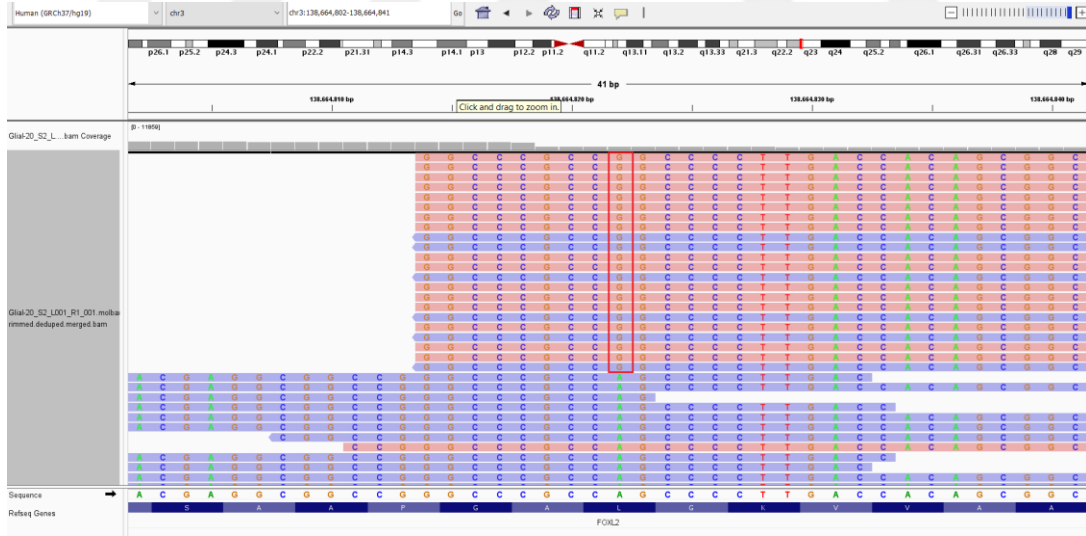
4.5.5. YND Sonuçlarının Sanger Dizileme İle Doğrulanması

YND analizi sonucunda hastalarda belirlene ancak IGV ("Integrative Genomics Viewer") dizileme görüntüleme aracı ile kontrol edildiğinde *FOXL2* ve *FBXW7* genlerinde görülen varyantların (NM_023067.4 (*FOXL2*):c.536C>G (p.Ala179Gly), *FBXW7* NM_018315.4:c.345-6_345-5del) dizileme hatası olabileceği düşünülerek

Sanger dizileme ile kontrol edildi. PZR sonrası agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4-15). *FOXL2* ve *FBXW7* yeni nesil dizileme görüntüsü Şekil 4-16 ve 4-17’de gösterildi.



Şekil 4-15: *FOXL2* ve *FBXW7* genlerinin PZR ürünü agaroz jel görüntüsü

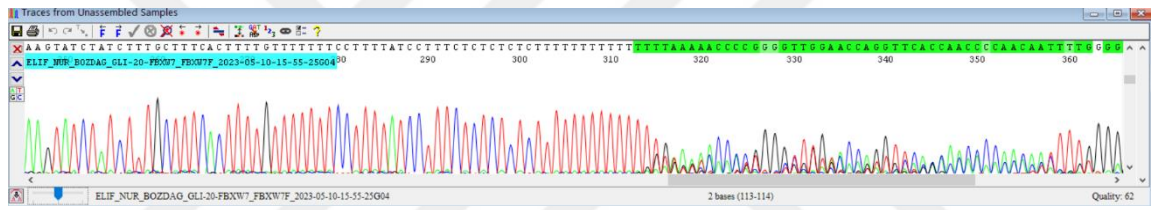


Şekil 4-16: *FOXL2* genindeki varyantın (NM_023067.4 (*FOXL2*):c.536C>G (p.Ala179Gly)) yeni nesil dizileme görüntüsü

FBXW7 geni delesyon bölgesi homopolimer bölgede (tekrarlı A) yer aldığından dolayı dizilemede bazen hatalı olarak okunabilmektedir. Bu nedenle doğrulama yapılarak varyantın varlığı tespit edildi.

Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA					
Sequence ID: NM_023067.4 Length: 2914 Number of Matches: 1					
Range 1: 1009 to 1200 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
348 bits(188)	3e-91	191/192(99%)	1/192(0%)	Plus/Minus	
Query 20	TGCACGCGTGTGTACGGCCCGTACGAGGCGGCCGGGCCCGCCAGCCCCCTTGACCACAGCG	79			
Sbjct 1200	TGCACGCGTGTGTACGGCCCGTACGAGGCGGCCGGGCCCGCCAGCCCCCTTGACCACAGCG	1141			
Query 80	GCCGCGCCAGGGCTACCGGGGCCCGCGGCTGCAGCCGCAGCTGCTGCAGCCGCTGCGGCT	139			
Sbjct 1140	GCCGCGCCAGGGCTACCGGGGCCCGCGGCTGCAGCCGCAGCTGCTGCAGCCGCTGCGGCT	1081			
Query 140	GCCGCCATCTGGCAGGAGGCATAGGGCATGGGTGAGGGAGGCTGCGGTAGCGGCCACGA-	198			
Sbjct 1080	GCCGCCATCTGGCAGGAGGCATAGGGCATGGGTGAGGGAGGCTGCGGTAGCGGCCACGAG	1021			
Query 199	TTGTTGAGGAAG	210			
Sbjct 1020	TTGTTGAGGAAG	1009			

Şekil 4-19: *FOXL2* NM_023067.4 (*FOXL2*):c.536C>G (p.Ala179Gly) varyantı için Sanger dizileme sonucunun Blast analizi



Şekil 4-20: *FBXW7* geni NM_018315.4:c.345-6_345-5del delesyonunun Sanger dizileme ile gösterilmesi

Homo sapiens F-box and WD repeat domain containing 7 (FBXW7), RefSeqGene					
Sequence ID: NG_029466.2 Length: 223330 Number of Matches: 1					
Range 1: 194494 to 194882 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
614 bits(332)	6e-171	370/389(95%)	0/389(0%)	Plus/Plus	
Query 11	ATATTTTAACTTTATTTGTATATATTAACAACCTTGCACTTTGTGCATGGAGATTCTGTTA	70			
Sbjct 194494	ATATTTTAACTTTATTTGTATATATTAACAACCTTGCACTTTGTGCATGGAGATTCTGTTA	194553			
Query 71	TTTGGTTGCAATTAGCATTCTGGGATAAACAAGGCTTATATAGGAGGGAGGAAACTT	130			
Sbjct 194554	TTTGGTTGCAATTAGCATTCTGGGATAAACAAGGCTTATATAGGAGGGAGGAAACTT	194613			
Query 131	ACTGTAAGAATAGCAAAATAGGTTTGTGTACCTGTGATCTCTGGGAAGAAAGGTAATTAA	190			
Sbjct 194614	ACTGTAAGAATAGCAAAATAGGTTTGTGTACCTGTGATCTCTGGGAAGAAAGGTAATTAA	194673			
Query 191	TTGATGTTTGAATATGCCAGATCATCTTTGTACTAGAATCTATTATTAATAAGTA	250			
Sbjct 194674	TTGATGTTTGAATATGCCAGATCATCTTTGTACTAGAATCTATTATTAATAAGTA	194733			
Query 251	TCTATctttgctttcacttttctttttctttttctttttctttttctttttcttttttttt	310			
Sbjct 194734	TCTATCTTTGCTTTTCACTTTTGTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTCTCTCTCTTTT	194793			
Query 311	tttttTAAAAACCCCGGGTTGGAACCAAGTTTCAACCAACCAACCAATTTGGGGACCT	370			
Sbjct 194794	TTTTTTGTAGTACCACGGGCTGTACCATGTTGAGCAACCAACCAACCTTTGGGGACCT	194853			
Query 371	CAAAACACCAAGGGCCAGGGGCAACAAC	399			
Sbjct 194854	CAGAGCAGCCAATGGCCAGGGGCAACAAC	194882			

Şekil 4-21: *FBXW7* geni NM_018315.4:c.345-6_345-5del delesyonu için yapılan Sanger dizileme sonucunun blast analizi

4.6. Hastaların Genetik Verileri ile Klinik ve Patolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Hastaların *ATRX*, *NF1* tümör dokusu ekspresyon değerleri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *TERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon verileri, *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyon analizi sonuçları ile patoloji rapor bilgilerinde yer alan yaş, mitoz, immünohistokimyasal test sonuçları (Ki67, GFAP), VEP ve nekroz verileri karşılaştırıldı.

ATRX ve *NF1* gen ekspresyon analizi sonuçları kategorize edilerek; bunun için *ATRX* ve *NF1* ekspresyonu ortanca ekspresyon değerine (sırasıyla 0,07 ve 0,03) göre yüksek ve düşük eksprese eden olmak üzere iki gruba ayrıldı.

4.6.1. *ATRX* Ekspresyon Verileri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Tümör dokusunda *ATRX* ekspresyon analizi sonuçları ile YND analizinde saptanan *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *TERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı. *ATRX* geninin tümör dokusunda ekspresyonun azalması *NF1* ekspresyonun azalması ile anlamlı bulundu ($p=0,003$). *ATRX* ekspresyonun azalması *IDH* mutasyon durumu ile anlamlı bulundu ($p=0,055$) (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Tümör dokusunda *ATRX* ekspresyonu ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması

ATRX Ekspresyonu ile Karşılaştırılan Gruplar	p	Kategori	Ekspresyon azalmış	Ekspresyon artmış
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,003	Düşük	7	1
		Yüksek	1	7
<i>IDH1</i>	0.055	Mutant	0	3
		Yabanıl tip	8	5
<i>BRAF</i>	1.000	Mutant	1	1
		Yabanıl tip	7	7
<i>HNF1A</i>	0.590	Mutant	2	3
		Yabanıl tip	6	5
<i>PTEN</i>	0.522	Mutant	1	2
		Yabanıl tip	7	6
<i>PTPN11</i>	0.302	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	7	8

<i>EGFR</i>	0.522	Mutant	1	2
		Yabanıl tip	7	6
<i>TERT</i>	0.590	Mutant	6	5
		Yabanıl tip	2	3
<i>TP53</i>	0.590	Mutant	2	3
		Yabanıl tip	6	5
<i>NOTCH1</i>	0.302	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	7	8
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,302	Var	1	0
		Yok	7	8
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,248	Var	3	1
		Yok	5	7
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	1.000	Var	1	1
		Yok	7	7
<i>MGMT</i> Metilasyonu	1.000	Düşük	4	4
		Yüksek	4	4

4.6.2. NF1 Ekspresyon Verileri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Tümör dokusunda *NF1* ekspresyon analizi sonuçları ile YND analizinde saptanan *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *TERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı. *NF1* geninin tümör dokusunda ekspresyonun azalması ile *ATR*X ekspresyonunun azalması anlamlı bulundu ($p=0,003$). *NF1* ekspresyonunun azalması *IDH* mutasyon durumu ile anlamlı bulundu ($p=0,055$) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: Tümör dokusunda NF1 ekspresyonu ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması

NF1 Ekspresyonu ile Karşılaştırılan Gruplar	p	Kategori	Ekspresyon azalmış	Ekspresyon artmış
<i>ATR</i> X Ekspresyonu	0,003	Düşük	7	1
		Yüksek	1	7
<i>IDH1</i>	0,055	Mutant	0	3
		Yabanıl tip	8	5
<i>BRAF</i>	0,131	Mutant	2	0
		Yabanıl tip	6	8
<i>HNF1A</i>	0,106	Mutant	1	4
		Yabanıl tip	7	4
<i>PTEN</i>	0,522	Mutant	1	2
		Yabanıl tip	7	6

<i>PTPN11</i>	0,302	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	7	8
<i>EGFR</i>	0,522	Mutant	1	2
		Yabanıl tip	7	6
<i>TERT</i>	0,590	Mutant	5	6
		Yabanıl tip	3	2
<i>TP53</i>	0,590	Mutant	2	3
		Yabanıl tip	6	5
<i>NOTCH1</i>	0,302	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	7	8
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,302	Var	1	0
		Yok	7	8
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,248	Var	3	1
		Yok	5	7
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	1,000	Var	1	1
		Yok	7	7
<i>MGMT</i> Metilasyonu	0,317	Düşük	5	3
		Yüksek	3	5

4.6.3. Yaş İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Yaş ile *ATRX*, *NF1* gen ekspresyon verileri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *TERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Yaşa göre *IDH* mutasyon durumu, *TERT* promotör mutasyon durumu anlamlı derecede ilişkili bulundu (Tablo 4-8). *IDH* mutant olan hastaların yaş ortalaması 32 iken, mutasyon bulunmayan hastaların yaş ortalaması 58 bulundu ($p=0,025$). *TERT* promotör mutant olan hastaların yaş ortalaması 61 iken, mutasyon bulunmayan hastaların yaş ortalaması 36 bulundu ($p=0,005$).

Tablo 4-8: Hastalarının yaşları ile genetik özelliklerinin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması

Yaş ile Karşılaştırılan Gruplar	P	Kategori	Ortalama yaş (σ)
<i>ATRX</i> Ekspresyonu	0,161	Düşük	60 (4,56)
		Yüksek	46 (6,82)
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,645	Düşük	55 (6,87)
		Yüksek	51 (5,75)
<i>IDH1</i>	0,025	Mutant	32 (2,60)
		Yabanıl tip	58 (4,36)

<i>BRAF</i>	0,200	Mutant	37 (18)
		Yabanıl tip	55 (4,26)
<i>HNF1A</i>	0,145	Mutant	44 (6,23)
		Yabanıl tip	57 (5,39)
<i>PTEN</i>	0,296	Mutant	63 (3,21)
		Yabanıl tip	50 (5,14)
<i>PTPN11</i>	0,125	Mutant	-
		Yabanıl tip	51 (4,27)
<i>EGFR</i>	0,800	Mutant	56 (7,53)
		Yabanıl tip	52 (5,17)
<i>TERT</i>	0,005	Mutant	61 (3,80)
		Yabanıl tip	36 (6,27)
<i>NOTCH1</i>	0,875	Mutant	-
		Yabanıl tip	53 (4,65)
<i>TP53</i>	1,000	Mutant	53 (6,49)
		Yabanıl tip	53 (5,81)
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,125	Var	-
		Yok	51 (4,27)
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,446	Var	60 (6,62)
		Yok	51 (5,36)
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	0,700	Var	60 (2,00)
		Yok	52 (4,94)
<i>MGMT</i> Metilasyonu	0,161	Düşük	48 (6,62)
		Yüksek	58 (5,41)

(σ: Standart sapma değeri, p:İstatistiksel anlamlılık değeri ($p \leq 0,05$))

4.6.4. Mitoz Değeri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Kanser hücrelerinin belli bir alanda taranan mitoz verileri ile *ATRX*, *NF1* gen ekspresyon verileri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *TERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Mitoz ile *ATRX* gen ekspresyonu ve *IDH* mutasyon durumu anlamlı derecede ilişkili bulundu (Tablo 4-9). *ATRX* gen ekspresyonu düşük hastaların mitoz değeri 12 iken ekspresyonu yüksek hastaların mitoz değeri 7 bulundu ($p=0,038$). *IDH* mutant olan hastaların mitoz değeri 1 iken, mutasyon bulunmayan hastaların mitoz değeri 12 bulundu ($p=0,004$).

Tablo 4-9: Mitoz ile genetik özelliklerinin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması

Mitoz ile Karşılaştırılan Gruplar	p	Kategori	Mitoz değeri(σ)
<i>ATR</i> X Ekspresyonu	0,038	Düşük	12 (1,41)
		Yüksek	7 (2,17)
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,328	Düşük	11 (1,79)
		Yüksek	8 (2,26)
<i>IDH1</i>	0,004	Mutant	1 (0,88)
		Yabanıl tip	12 (1,14)
<i>BRAF</i>	0,817	Mutant	8 (5,5)
		Yabanıl tip	10 (1,52)
<i>HNF1A</i>	0,743	Mutant	9 (2,89)
		Yabanıl tip	10 (1,68)
<i>PTEN</i>	0,521	Mutant	13 (1,33)
		Yabanıl tip	9 (1,67)
<i>PTPN11</i>	0,125	Mutant	-
		Yabanıl tip	9 (1,46)
<i>EGFR</i>	1,000	Mutant	12 (0,33)
		Yabanıl tip	9 (1,73)
<i>TERT</i>	0,221	Mutant	11 (1,54)
		Yabanıl tip	6 (2,76)
<i>NOTCH1</i>	0,625	Mutant	-
		Yabanıl tip	9 (1,49)
<i>TP53</i>	0,510	Mutant	11 (2,69)
		Yabanıl tip	9 (1,72)
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,125	Var	-
		Yok	9 (1,46)
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,521	Var	9 (2,01)
		Yok	10 (1,82)
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	0,417	Var	14 (2)
		Yok	9 (1,56)
<i>MGMT</i> Metilasyonu	0,721	Düşük	11 (1,76)
		Yüksek	9 (2,31)

(σ : Standart sapma değeri, p:İstatistiksel anlamlılık değeri ($p \leq 0,05$))

4.6.5. Ki67 Değeri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Hastaların Ki67 değerleri ile *ATR*X, *NF1* gen ekspresyon verileri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *pTERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Ki67 değerleri ile *IDH* mutasyon durumu anlamlı derecede ilişkili

bulundu (Tablo 4-10). *IDH* mutant olan hastaların Ki67 değeri %3 iken, mutasyon bulunmayan hastaların Ki67 değeri %31 bulundu ($p=0,004$).

Tablo 4-10: Ki67 ile genetik özelliklerin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması

Ki67 ile Karşılaştırılan Gruplar	p	Kategori	Ki67 (σ)
<i>ATRX</i> Ekspresyonu	0,328	Düşük	%28 (4,70)
		Yüksek	%23 (8,74)
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,959	Düşük	%24 (5,08)
		Yüksek	%27 (8,64)
<i>IDH1</i>	0,004	Mutant	%3 (0,88)
		Yabanıl tip	%31 (4,96)
<i>BRAF</i>	0,817	Mutant	%28 (21,5)
		Yabanıl tip	%25 (5,09)
<i>HNF1A</i>	0,510	Mutant	%19 (6,82)
		Yabanıl tip	%28 (6,37)
<i>PTEN</i>	0,611	Mutant	%28 (4,41)
		Yabanıl tip	%25 (5,94)
<i>PTPN11</i>	0,375	Mutant	-
		Yabanıl tip	%24 (5,09)
<i>EGFR</i>	0,800	Mutant	%25 (7,63)
		Yabanıl tip	%26 (5,83)
<i>TERT</i>	0,320	Mutant	%29 (5,78)
		Yabanıl tip	%18 (8,28)
<i>NOTCH1</i>	0,250	Mutant	-
		Yabanıl tip	%24 (4,89)
<i>TP53</i>	0,743	Mutant	%31 (11,76)
		Yabanıl tip	%23 (4,94)
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,375	Var	-
		Yok	%24 (5,09)
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,770	Var	%21 (4,27)
		Yok	%27 (6,35)
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	1,000	Var	%25 (5,00)
		Yok	%25 (5,55)
<i>MGMT</i> Metilasyonu	0,959	Düşük	%23 (5,75)
		Yüksek	%27 (8,17)

(σ : Standart sapma değeri, p: İstatistiksel anlamlılık değeri ($p \leq 0,05$))

4.6.6. Evre İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Hastaların tümör evre sınıflaması ile *ATRX*, *NF1* gen ekspresyon verileri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *pTERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı. Yüksek ve düşük evre kategorisi ile *ATRX* gen ekspresyonu, *IDH* ve *TERT* mutasyon durumu anlamlı derecede ilişkili bulundu (Tablo 4-11). *ATRX* gen ekspresyonu düşük hastaların yüksek evreli olduğu bulundu ($p=0,021$). 4 düşük evreli hastanın 3'ü *IDH* mutant bulundu ve tüm yüksek evreli glioblastoma hastaları ve 1 düşük evreli hasta *IDH* yabanıl tip olarak bulundu ($p=0,001$). *TERT* promotör mutasyonu olan 11 hastanın 10'u yüksek evreli bulundu ($p=0,029$).

Tablo 4-11: Evre ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması

Evre ile Karşılaştırılan Gruplar	p	Kategori	Düşük evre (n)	Yüksek evre(n)
<i>ATRX</i> Ekspresyonu	0,021	Düşük	0	8
		Yüksek	4	4
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,248	Düşük	1	7
		Yüksek	3	5
<i>IDH1</i>	0,001	Mutant	3	0
		Yabanıl tip	1	12
<i>BRAF</i>	0,383	Mutant	1	1
		Yabanıl tip	3	11
<i>HNF1A</i>	0,350	Mutant	2	3
		Yabanıl tip	2	9
<i>PTEN</i>	0,267	Mutant	0	3
		Yabanıl tip	4	9
<i>PTPN11</i>	0,551	Mutant	0	1
		Yabanıl tip	4	11
<i>EGFR</i>	0,267	Mutant	0	3
		Yabanıl tip	4	9
<i>TERT</i>	0,029	Mutant	1	10
		Yabanıl tip	3	2
<i>NOTCH1</i>	0,551	Mutant	0	1
		Yabanıl tip	4	11
<i>TP53</i>	0,755	Mutant	1	1
		Yabanıl tip	3	8
<i>MDM2</i> (amplifikasyonu)	0,551	Var	0	1
		Yok	4	11
<i>EGFR</i> (amplifikasyonu)	0,182	Var	0	4
		Yok	4	8

CDK4(amplifikasyonu)	0,383	Var	0	2
		Yok	4	10
MGMT Metilasyonu	1,000	Düşük	2	6
		Yüksek	2	6

(n: hasta sayısı, p:İstatistiksel anlamlılık değeri ($p \leq 0.05$))

4.6.7. VEP İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Hastaların vasküler endotelyal proliferasyon verileri ile *ATRX*, *NF1* gen ekspresyon verileri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *pTERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı. VEP ile *ATRX* gen ekspresyonu, *IDH* ve *TERT* mutasyon durumu anlamlı derecede ilişkili bulundu (Tablo 4-12). VEP varlığı, düşük *ATRX* ekspresyonu ile ilişkili bulundu ($p=0,021$). VEP varlığı ve *IDH1* negatifliği ile ilişkili bulundu ($p=0,001$). *TERT* mutasyonu VEP varlığı ile ilişkili bulundu ($p=0,029$).

Tablo 4-12: VEP ile genetik özelliklerin Ki-kare testi ile karşılaştırması

VEP ile Karşılaştırılan Gruplar	p	Kategori	Var	Yok
<i>ATRX</i> Ekspresyonu	0,021	Düşük	8	0
		Yüksek	4	4
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,248	Düşük	7	1
		Yüksek	5	3
<i>IDH1</i>	0,001	Mutant	0	3
		Yabanıl tip	12	1
<i>BRAF</i>	0,383	Mutant	1	1
		Yabanıl tip	11	3
<i>HNF1A</i>	0,350	Mutant	3	2
		Yabanıl tip	9	2
<i>PTEN</i>	0,267	Mutant	3	0
		Yabanıl tip	9	4
<i>PTPN11</i>	0,551	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	11	4
<i>EGFR</i>	0,267	Mutant	3	0
		Yabanıl tip	9	4
<i>TERT</i>	0,029	Mutant	10	1
		Yabanıl tip	2	3

<i>NOTCH1</i>	0,755	Mutant	4	1
		Yabanıl tip	8	3
<i>TP53</i>	0,551	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	11	4
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,551	Var	1	0
		Yok	1	4
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,182	Var	4	0
		Yok	8	4
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	0,383	Var	2	0
		Yok	10	4
<i>MGMT</i> Metilasyonu	1,000	Düşük	6	2
		Yüksek	6	2

4.6.8. Nekroz Verileri İle Genetik Özelliklerin Karşılaştırması

Hastaların nekroz verileri ile *ATRX*, *NF1* gen ekspresyon verileri, YND analizinde saptanan patojenik varyantlar *IDH1*, *BRAF*, *HNF1A*, *PTEN*, *PTPN11*, *EGFR*, *pTERT*, *NOTCH1*, *TP53* mutasyon varlığı ve *MDM2*, *CDK4* ve *EGFR* amplifikasyonları, *MGMT* metilasyonu analizi sonuçları Ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı. Nekroz ile *IDH* mutasyon durumu anlamlı derecede ilişkili bulundu (Tablo 4-13). Nekroz varlığı *IDH1* negatifliği ile ilişkili bulundu ($p=0,004$).

Tablo 4-13:Nekroz verileri ile genetik özelliklerin Ki-kare testi karşılaştırması

Nekroz ile karşılaştırılan gruplar	P	Kategori	Var	Yok
<i>ATRX</i> Ekspresyonu	0,106	Düşük	7	1
		Yüksek	4	4
<i>NF1</i> Ekspresyonu	0,590	Düşük	6	2
		Yüksek	5	3
<i>IDH1</i>	0,004	Mutant	0	3
		Yabanıl tip	11	2
<i>BRAF</i>	0,541	Mutant	1	1
		Yabanıl tip	10	4
<i>HNF1A</i>	0,611	Mutant	3	2
		Yabanıl tip	8	3
<i>PTEN</i>	0,195	Mutant	3	0
		Yabanıl tip	8	5
<i>PTPN11</i>	0,486	Mutant	1	0

		Yabanıl tip	10	5
<i>EGFR</i>	0,195	Mutant	3	0
		Yabanıl tip	8	5
<i>TERT</i>	0,094	Mutant	9	2
		Yabanıl tip	2	3
<i>NOTCH1</i>	0,486	Mutant	1	0
		Yabanıl tip	10	5
<i>TP53</i>	0,513	Mutant	4	1
		Yabanıl tip	7	4
<i>MDM2</i> amplifikasyonu	0,486	Var	1	0
		Yok	10	5
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	0,755	Var	3	1
		Yok	8	4
<i>CDK4</i> amplifikasyonu	0,308	Var	5	0
		Yok	9	2
<i>MGMT</i> Metilasyonu	0,590	Düşük	6	2
		Yüksek	5	3

MGMT metilasyon verileri kategorize edilerek genetik veriler ile Ki-kare testi karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

4.7. Sağkalım Analizi

Hastaların sağkalım analizi ameliyat tarihi itibarı ile vefat eden hastaların ölüm tarihleri arasındaki süre gün olarak hesaplandı. Hastalarda saptanan patojenik varyantların sağkalıma etkisinin analizi Kaplan Meier yöntemiyle analiz edildi. Faktöre bağlı Log Rank testi ile *HNF1A* gen mutasyonu olan hastaların sağkalımı, negatif hastalara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,022$) (Tablo 4-14). Diğer genetik değişikliklerin sağkalım üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4-14: Faktöre bağlı Log Rank testi ile sağkalım analizi

Faktör	p değeri (Log Rank)
<i>ATRX</i> ekspresyonu	0,313
<i>NF1</i> ekspresyonu	0,174
<i>IDH1</i>	0,129
<i>BRAF</i>	0,420
<i>HNF1A</i>	0,022
<i>PTEN</i>	0,225

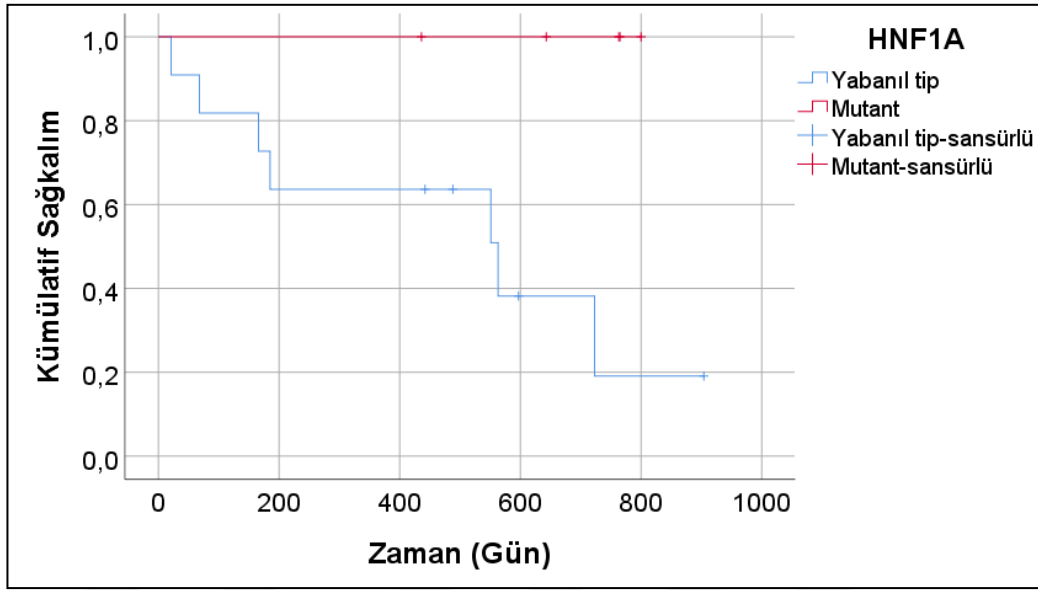
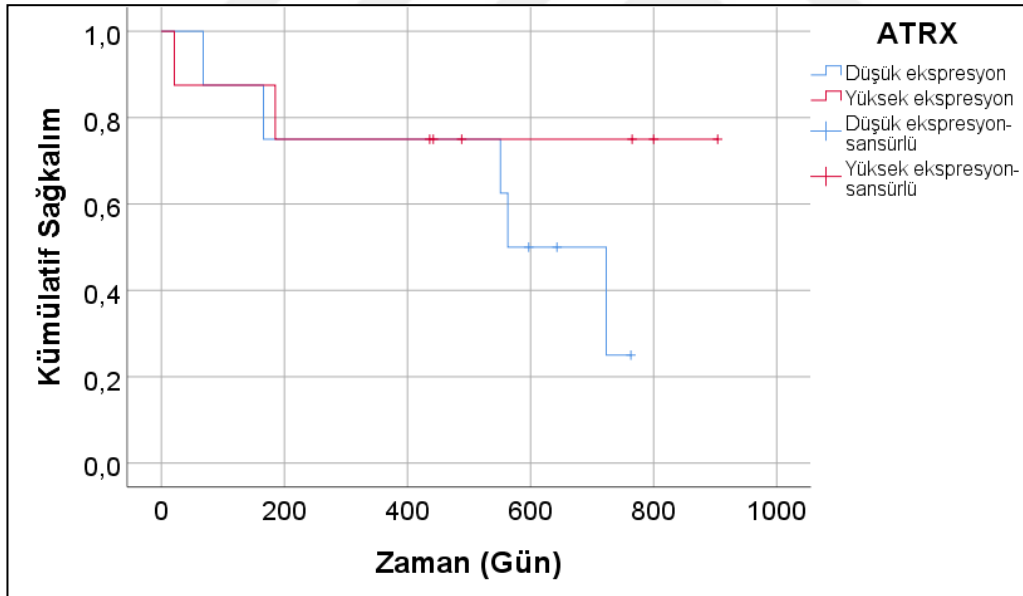
<i>TERT</i>	0,406
<i>EGFR</i>	0,941
<i>NOTCH1</i>	0,065
<i>TP53</i>	0,377
<i>MDM2</i> amplifikasyon	0,012
<i>EGFR</i> amplifikasyon	0,410
<i>CDK4</i> amplifikasyon	0,079
<i>MGMT</i> Metilasyonu	0,939

Sağkalım analizi yapılan genetik değişimlerin mutasyon durumuna göre ortalama sağkalım gün değerleri Tablo 4-15’de gösterildi.

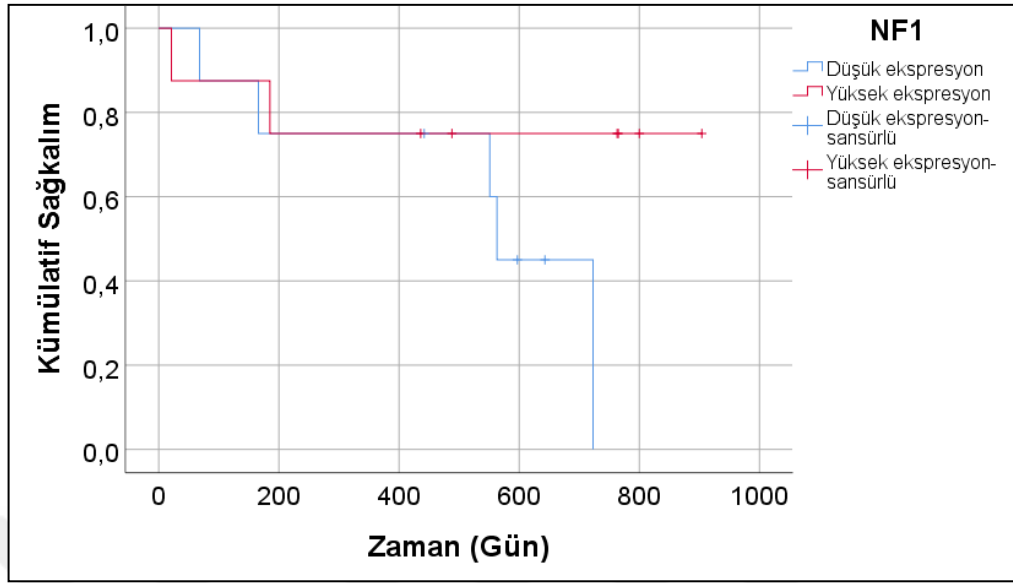
Tablo 4-15: Faktöre göre ortalama sağkalım gün değerleri

Faktör	P değeri	Mutasyon durumu	Gün (%95 Güven Aralığı)
<i>BRAF</i>	0,420	Yabanıl tip	647 (475-818)
		Mutant	304 (112-495)
<i>PTEN</i>	0,225	Yabanıl tip	657 (473-842)
		Mutant	429 (152-705)
<i>TERT</i>	0,406	Yabanıl tip	673 (450-895)
		Mutant	586 (387-785)
<i>EGFR</i>	0,941	Yabanıl tip	627 (446-808)
		Mutant	459 (239-679)
<i>NOTCH1</i>	0,065	Yabanıl tip	657 (493-821)
		Mutant	166 (166-166)
<i>TP53</i>	0,377	Yabanıl tip	683 (501-865)
		Mutant	471 (192-750)
<i>ATRX</i>	0,313	Düşük ekspresyon	540 (361-718)
		Yüksek ekspresyon	703 (461-945)
<i>NF1</i>	0,174	Yabanıl tip	521 (330-713)
		Mutant	703 (461-945)
<i>MGMT</i> (metilasyon)	0,939	Yabanıl tip	530 (319-741)
		Mutant	666 (464-867)
<i>EGFR</i> (amplifikasyon)	0,410	Yok	655 (452-858)
		Var	548 (284-812)
<i>CDK4</i> (amplifikasyon)	0,079	Yok	670 (494-845)
		Var	368 (9-726)

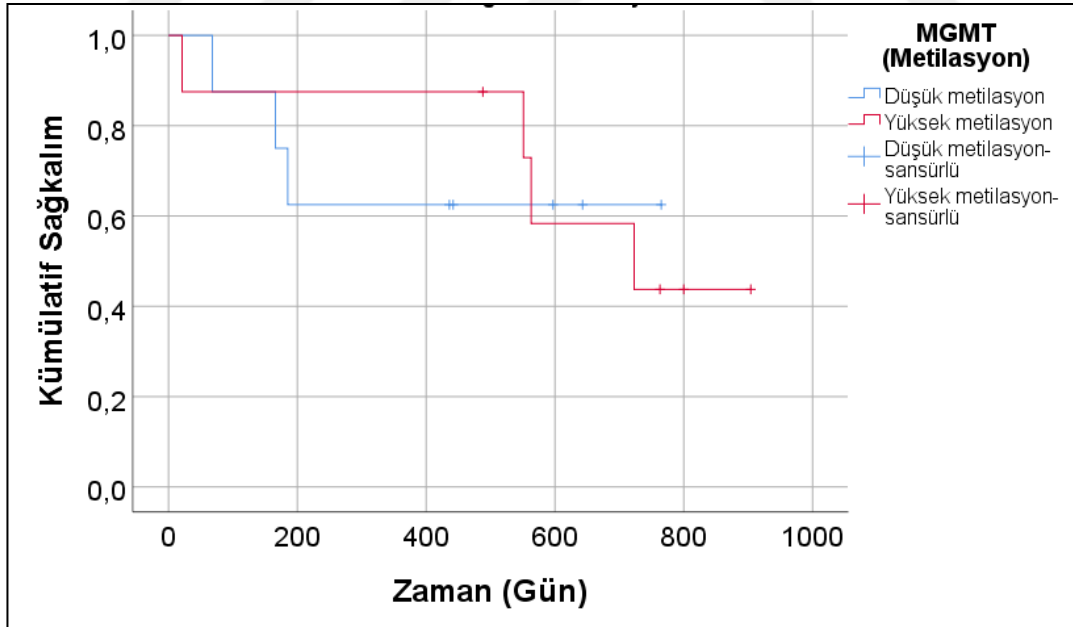
Sağkalım fonksiyon grafiği kümülatif sağkalım ve gün arasında *HNF1A* mutasyon durumu, *ATRX* ve *NF1* ekspresyonu, *MGMT* metilasyonu ve *CDK4* amplifikasyonu için gösterildi.

Şekil 4-22: *HNF1A* mutasyonunun sağkalım üzerine etkisiŞekil 4-23: Tümör dokusundaki *ATRX* ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi

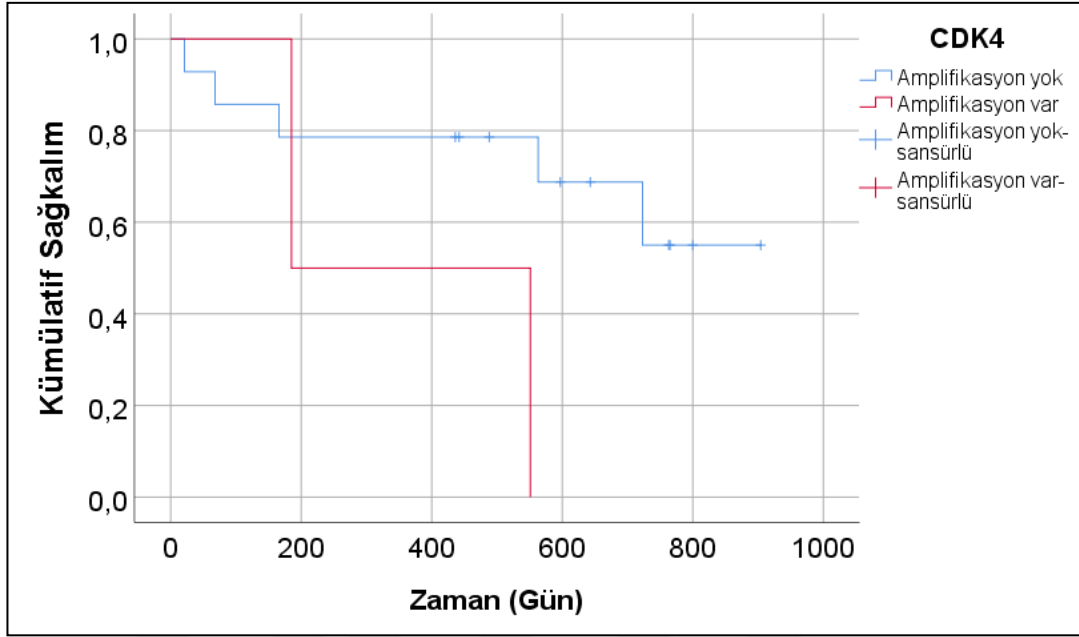
Şekil 4-24: Tümör dokusundaki *NF1* ekspresyonunun sağkalım üzerine etkisi



Şekil 4-25: *MGMT* metilasyonunun sağkalım üzerine etkisi



Şekil 4-26: CDK4 amplifikasyonunun sağkalım üzerine etkisi



5. TARTIŞMA

“Dünya Sağlık Örgütü” (DSÖ) tarafından Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörlerine yönelik sınıflama kriterleri 2021 yılında güncelledi. Güncellenen sınıflama kriterleri ile moleküler değişimler genişletilmiş ve epigenetik değişimlerin de önemi vurgulanmıştır (8). MSS tümörlerinden glial tümörlerin heterojen moleküler değişimlerinin ortaya konması tanı ve prognozun daha doğru tahminini sağladığı gibi klinik tedavide de yönlendirici olabilmektedir (16, 72, 73, 74). Bu genetik değişimlerin ortaya konması yeni nesil dizileme (YND) ile hedefli gen paneli kullanımı kapsamlı bir şekilde genlerin analiziyle yüksek veri çıktıları sağlayarak hastalığın prognozunun anlaşılmasında önemlidir (62, 63). YND ile hedeflenen genlerdeki tüm moleküler değişiklikler; tek nükleotid değişimi (“Single Nucleotide Variation”-“SNV”), delesyon/duplikasyon mutasyonu (İndel), kopya sayısı değişimi (“Copy Number Variation”-“CNV”) saptanabilmektedir (61, 62, 63).

Çalışma kapsamında gen paneli ile YND analizi, *ATRX* ve *NF1* genleri için ekspresyon seviyelerinin analizi, oligodendroglioma için *CIC* geni mutasyon analizi ve *MGMT* geni metilasyon analizi yapıldı. Glial tümörlere özgü ticari bir gen paneli olmadığından çalışmamızda kullandığımız panel solid tümörlerde sık görülen moleküler değişimleri içeren oldukça kapsamlı bir paneldir. Sonuçlarımız somatik genetik değişimlerin düşük/yüksek evre karşılaştırması ve gliomagenezde rol alan varyasyonları anlamamız açısından çok değerli bilgiler sunmaktadır. Kullanılacak solid tümör gen paneli bu tümörlerde bulunan 67 geni (660 bölge) içeren ticari bir paneldir (EK1 hedefe yönelik gen panelindeki genler ve bölgelerin listesi). Çalışmamızda dizileme analizi ve *ATRX* ve *NF1* ekspresyonu ve *MGMT* metilasyon durumu analaiz edilerek glial tümörlerin alt tiplerinde moleküler değişimlerin belirlenmesi, tanıda sınıflama için kullanılabilirliğinin anlaşılması ve henüz klinik önemi bilinmeyen varyasyonların tespiti ve sağkalım üzerine etkisi ile YND teknolojisinin klinikte uygulanabilirliğine katkı sağlanması amaçlandı. Türkiye’de *ATRX* ve *IDH1* genleri için rutin patoloji biriminde uygulanan immunohistokimyasal testler ile moleküler tesler karşılaştırıldı.

ATRX ekspresyon kaybının Nandakumar ve arkadaşları (29) ile Wiestler ve arkadaşlarının (75) yaptığı çalışmalarda astrositomaların sınıflamasında önemli olduğu belirtilmiştir. *NF1* ekspresyon kaybına *ATRX* mutasyonlarının eşlik ettiği literatürde

belirtilmiştir (76). Çalışmamızda *ATRX* ve *NF1* gen ekspresyon seviyelerinin, analiz sonucunda astrositoma ve glioblastomada azaldığı oligodendrogliomalarda daha yüksek olduğu görüldü. Hem tümör dokusunda ve hem de periferik kan örneklerinde *ATRX* ve *NF1* ekspresyonu arasında pozitif yönde korelasyon bulundu. Ancak immünohistokimyasal *ATRX* sonuçları ile uyumlu sonuçlar bulunamadı. Bunun nedenlerinden biri kullanılan yöntemlerin farklılık göstermesidir. İmmünohistokimyasal boyama hasta örneklerinde spesifik antikor kullanılarak *ATRX* proteininin tespitine dayanmaktadır. Ancak tez çalışmamızda kullandığımız qRT-PZR yönteminde mRNA düzeyinde analiz yapılmaktadır. qRT-PZR yöntemi daha niceliksel, immünohistokimyasal boyama sonuçları deneyim gerektirebilir ve subjektif yorumlanabilir (91). Bu sebeple immünohistokimyasal sonuçları ile qRT-PZR ekspresyon analizinde farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir.

CIC geni mutasyonları oligodendroglioma sınıflamasındaki karakteristik değişimlerdendir (8, 30, 64, 76). Oligodendrogliomalarda birçok *CIC* geni mutasyonları tanımlanmış olmasına karşın p.R215W mutasyonu en sık görülen varyasyon olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda oligodendroglioma tanılı hastalarda p.R215W mutasyonun olduğu *CIC* gen bölgesi Sanger dizileme ile analiz edilmiştir. Oligodendrogliomalı bir hastanın sadece tümör doku örneğinde 5. eksonda üç nükleotitlik GGT delesyon (NM_015125.5 c.712_714del, p.Trp238del) saptandı. Bu varyasyon daha önce bildirilmemiştir. Literatürde bu bölgede daha önce oligoastrositomalarda ve gliomalarda tek nükleotitlik bir delesyon (p.W238fs) veya anlamsız mutasyon (p.W238*) raporlanmıştır (96). Bu varyasyonun periferik kan örneğinde bulunmaması ve somatik mutasyon olarak tümör dokusunda saptanması oligodendroglioma oluşumunda önemli olduğunu göstermektedir. *CIC* geninde bulduğumuz bu yeni mutasyonun daha geniş hasta popülasyonunda taranması gerekmektedir. Hasta sayısının daha fazla olduğu çalışmalarda bu delesyon bölgesini içeren analizlerin yapılması bu varyasyonun glial tümörlerden oligodendrogliomada öneminin anlaşılmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada Türk popülasyonudaki somatik mutasyonlar solid tümör paneli ile analiz edilerek patojenik ve klinik önemi henüz bilinmeyen (VUS) varyantların prognostik önemleri değerlendirildi. YND analizi sonucunda tüm hastalarda en az bir tane patojenik varyant saptandı. YND analizi ile saptanan patojenik varyantlar: *IDH1*, *BRAF*, *TERT*, *TP53*, *EGFR*, *HNF1A*, *NOTCH1*, *PTPN11*, *PTEN* gen değişimleri ile

MDM2, *CDK4* ve *EGFR* gen amplifikasyonlarıdır. Saptanan *IDH1* mutasyonu glial tümörlerle ilişkili bulunan R132H değişimidir. *IDH1* mutasyon durumu MSS sınıflama kriterleri içerisinde en önemli olanıdır (8, 20). Hasta grubumuzda üç düşük evreli hastada *IDH1* mutasyonu bulunmuştur. Oligodendroglioma tanılı iki hastada *IDH1* mutasyonu literatürdeki gibi *TERT* geni promotör mutasyonu ile birlikte bulunmuştur (78). Hasta grubumuzdaki yüksek evre glioblastoma tanılı hastaların hiçbirinde *IDH1* mutasyonu bulunmamaktadır. Hastaların mitoz, proliferasyon indeksi Ki-67, vasküler endotelial proliferasyon ve nekroz değerleri *IDH1* mutasyon olmayan yüksek evreli hastalarda *IDH1* mutant düşük evreli hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

BRAF geninde saptanan patojenik varyantın (NM_004333.6 c.1799T>A, p.Val600Glu) glial tümörlerde görülen karakteristik değişimlerden (33, 34) biri olduğu bulundu. Bu varyasyon bir düşük evreli ve bir yüksek evreli hastada saptandı. Literatürde *BRAF* V600E mutasyonu bu genin yapısal aktivasyonuna sebep olup ERK/MAPK yolağını aktive ederek tümör oluşumunda rol almaktadır (92). Tedavi yanıtı ile ilişkisi ise çeşitli kanserlerde *BRAF*; tirozin kinaz inhibitörleriyle hedeflenerek tedavide başarı gözlenmiştir. Bu strateji ile *BRAF* aktive olan gliomalarda tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi yanıtları elde edilmiştir (92).

Glial tümörlerde önemli olduğu belirtilen *TERT* geni promotör bölge varyasyonları (23, 24, 27) (c.-124C>T, c.-146C>T) toplam 12 hastada saptandı. Literatürde glial tümörlerle ilişkili olduğu belirtilen (79) *TERT* promotör c.-124C>T varyasyonu (NM_198253.3 c.-124C>T) dokuz hastada bulundu. Üç yüksek evreli hastada ise klinik önemi belirli olmayan *TERT* c.-146C>T varyasyonu bulundu. Literatürde *TERT* promotör mutasyonları, *IDH1* mutant gliomalarda hayatta kalma faydaları sağlarken, *IDH1* mutant olmayan hastalarda negatif prognostik belirleyici olduğu bildirilmiştir (93). Ancak glioblastomada *TERT* mutasyonunun prognostik önemi, tüm glioma türlerinde *IDH* mutasyonu ve *MGMT* metilasyonu kadar güçlü olmadığı belirtilmiştir (93).

Glial tümörlerin sınıflama kriterlerinde olan ve klinik önemi glial tümörle ilişkili bulunan (8, 80) *EGFR* geninde bulunan patojenik varyasyonlar (NM_005228.5: c.787A>C, p.Thr263Pro); NM_005228.5: c.866C>T, p.Ala289Val; NM_005228.5: c.865 G>A, p.Ala289Thr) üç yüksek evreli glioblastoma tanılı hastada saptandı. Lee ve

arkadaşlarının (80) yaptığı çalışmada yeni belirlenen *EGFR* yanlış anlamlı mutasyonlarının beyin tümörleri ile ilişkisi ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda da saptanan *EGFR* kinaz aktivitesini artıran bu varyasyonlar literatürde glioblastomada olası patojenik olarak bildirilmiştir (80).

Astrositomalarda patojenik olduğu literatürde bildirilen (81) *PTPN11* varyasyonu (NM_002834.5 c.226G>A, p.Glu76Lys) bir yüksek evreli glioblastoma tanılı hastada saptandı. Literatürde glioblastomada ERK/MAPK sinyal yolağını aktive eden mutasyonlardan olduğu bildirilen *PTPN11* gen varyasyonu (94) astrositom hücre kökenli glioblastoma oluşumunda önemli olabileceği düşünülmüştür. Fonksiyonel çalışmaların yapılması ve daha yüksek sayıda hasta grubunda bu varyasyonun bulunması ile rolü daha anlaşılabilir olacaktır.

Kanser araştırma platformlarında raporlanan miyeloproliferatif neoplazmda patojenik olduğu belirtilen (82, 83) *NOTCH1* varyasyonu (NM_017617.5 c.4129C>T, p.Pro1377Ser) bir yüksek evreli glioblastoma tanılı hastada saptandı. Oligodendrogliomalardaki sınıflama kriterlerinde bulununan (8) *NOTCH1* gen değişimlerinin hasta grubumuzdaki iki oligodendrogliomada bulunmaması hedefli gen paneli bu genin dört ekzonik bölgesini içermesinden kaynaklanabilir. Tüm genin analizi bu varyasyonların ortaya çıkma olasılığını artırabilir.

HNF1A geninde saptanan varyasyonun (NM_000545.8 c.864del, p.Pro291fsTer51) ise monogenik diyabet ile ilişkili patojenik bir varyant olduğu bildirilmiştir (84). *HNF1A*, kolon adenokarsinomu, akciğer adenokarsinomu, endometrial adenokarsinomu gibi birçok kanserle ilişkisi literatürde belirtilmiştir (95). Tez çalışmamızda bulunan varyantın “ExAC” veritabanında varyant alel frekansı 0.00112 olarak bildirilmiştir. *HNF1A* varyasyonu saptanan iki düşük evreli ve üç yüksek evreli hastada sağkalım oranının bu hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (Log-rank testi p=0,022)

PTEN geninde saptanan beş farklı varyanttan ikisi (NM_000314.8 c.403A>G p.Ile135Val; NM_000314.8 c.518G>A p.Arg173His) glioblastoma ve düğüz gliomalarda gösterilmiştir (96). Diğer saptanan üç varyant (NM_000314.8 c.802-1G>A; NM_000314.8 c.408T>G p.Cys136Trp; NM_000314.8 c.493-1G>A) patojenik ve olası patojenik olarak (85, 86) PTEN hamartom tümör sendromunda, makrosefali-otizm sendromunda, kalıtsal kansere yatkınlık sendromunda ve Cowden sendromunda

tanımlanmış olup glial tümörlerdeki patojenite durumu ortaya konmamıştır. Hasta grubumuzda beş yüksek evreli glioblastoma tanılı hastada bu beş farklı *PTEN* varyasyonu saptandı. Bulunan bu varyantlar sınıflama kriterlerine dahil olmayan *PTEN* gen değişimlerinin glial tümörlerdeki moleküler değişimlerin analiz edilmesinde önemini ortaya çıkarmaktadır.

YND analizi sonucunda saptanan *TP53* varyasyonları (NM_000546.6 c.380C>A p.Ser127Tyr; NM_000546.6 c.764T>C p.Ile255Thr; NM_000546.6 c.626_627del p.Arg209fs) patojenite durumları glial tümörlerde bildirilmiştir. Sınıflama kriterlerindeki moleküler değişimlerden biri olan *TP53* gen varyasyonları (8, 35, 36, 37) diğer tümörlerde olduğu gibi glial tümörlerde de gen boyu oldukça heterojen dağılım göstermektedir.

YND analizi ile tüm hastalarda bulunan *VUS* varyantlardan *FBXW7* geninde saptanan delesyonun (NM_018315.4:c.345-6_345-5del) patojenite durumu bildirilmemiştir. Ancak Yang ve arkadaşlarının (97) yaptığı hücre kültürü çalışması ile glioma hücrelerinde *FBXW7*'nin silinmesinin *IDH1* ekspresyonunu negatif olarak düzenlediği ve *IDH1*-mutant kanser hücresinin radyasyona duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir.

YND analizi ile yüksek evreli glioblastoma tanılı hastada 13 katlık *MDM2* kopya sayısı artışı saptandı. *MDM2*'nin görevi; *TP53*'e bağlanarak yıkımına neden olmaktadır (87). Bu hastada *MDM2* kopya sayısı artışının *TP53* üzerinden gliomageneze neden olduğu düşünülmektedir. *MDM2* kopya sayısı artışı ile *TP53* mutasyonun birlikte bulunması *TP53* fonksiyon kaybına neden olduğu ve eşlik eden *TERT* ve *PTPN11* varyasyonları ile birlikte glioblastoma gelişimine yol açtığı düşünülmektedir.

CDK4 kopya sayısı artışı saptanan iki yüksek evreli glioblastoma tanılı hastadan birinde eşlik eden varyasyonlar *TERT*, *TP53*; diğerinde ise *TERT*, *PTEN* ve *EGFR* gen varyasyonlarıdır. CNV saptanan diğer bir gen *EGFR* geni amplifikasyonu toplam dört yüksek evreli hastada saptanmıştır. *EGFR* gen amplifikasyonları çeşitli kanserlerle olduğu gibi glial tümörlerle de ilişkilendirilmiştir (88, 89, 90). *EGFR* gen artışı bulunan bir hastada *EGFR* gen varyasyonları da saptanmıştır ve *PTEN*, *TERT* varyasyonları da bu hastada birlikte bulunmuştur. *EGFR* geninin gliomagenezde etkileşimli genlerden oluşan büyük bir merkezdeki bir gen olduğu ve prognostik önemini dikkate değer

olduğu vurgulanmaktadır (88). *EGFR* amplifikasyonuna yönelik tirozin kinaz inhibitör tedavilerinde kan-beyin bariyeri, tümör heterojenitesi ve ikincil mutasyonların varlığı dirence sebep olduğu bildirilmiştir (98). *EGFR* amplifikasyonun diğer genetik değişimlerle ve gendeki SNV ve CNV'lerin birlikte gösterilmesi gliomagenезin anlaşılması açısından çok büyük avantajlar sunmaktadır. *EGFR* geni hem mutasyonları hem amplifikasyonları glial tümörlerde patojenite ile ilişkili olduğu için bu kanserlerde YND analizi ile genetik değişimlerin kapsamlı şekilde ortaya konması önemli olmaktadır.

Çalışmamızda *MGMT* geni metilasyonu analizinin değerlendirilmesi 2021 yılında güncellenen sınıflama kriterlerinde epigenetik değişimlerin önemi açısından bize önemli bilgiler sunmaktadır. Yüksek evreli hastalarda metilasyonun daha yüksek bulunması ile birlikte hastaların takip süreleri ve tedaviye yanıt bilgilerinin eksik olması sebebiyle tedaviyi yönlendirici etkisi analiz edilememiştir.

Düşük evreli hasta sayısının yüksek evreli hasta sayısına oranla daha az bulunması istatistik sonuçlarında sapmayı etkileyen bir durum oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışma ile glial tümörlerde düşük/yüksek evre karşılaştırması yapılmakla birlikte çalışmamızı özgün yapan taze beyin tümör dokusu ile gen ekspresyonu, DNA metilasyonu ve somatik mutasyonların birlikte analiz edilmesidir. Sonuçlarımızda klinik önemi tam olarak bilinmeyen VUS varyantların (*FBXW7*, *PIK3CA*, *VHL*) daha ayrıntılı araştırılması gerektiği ortaya konmuştur. Patojenite durumlarının glial tümörlerde belirli olmayan genetik değişimlerin (*FBXW7*, *PIK3CA*, *VHL*, *PTEN* ve *HNF1A*), tümör oluşumunda önemli olduğu ancak henüz glial tümörlerdeki bilgilerinin yetersiz olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar hem gliomagenезi anlamamız açısından hem de sınıflamanın moleküler değişimler üzerinden yapılması ve prognozun değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Pichaivel, M., Anbumani, G., Theivendren, P., & Gopal, M. (2022). An Overview of Brain Tumor. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.100806
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [15.04.2023].
3. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-oncology*, 21(Suppl 5), v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>
4. Pace, A., Tanzilli, A., & Benincasa, D. (2022). Prognostication in brain tumors. *Handbook of clinical neurology*, 190, 149–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85029-2.00001-4>
5. Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro-oncology*, 24(Suppl 5), v1–v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>
6. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
7. Louis, D. N., Wesseling, P., Aldape, K., Brat, D. J., Capper, D., Cree, I. A., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fouladi, M., Fuller, G. N., Giannini, C., Haberler, C., Hawkins, C., Komori, T., Kros, J. M., Ng, H. K., Orr, B. A., Park, S. H., Paulus, W., Perry, A., ... Ellison, D. W. (2020). cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain*

- pathology (Zurich, Switzerland), 30(4), 844–856. <https://doi.org/10.1111/bpa.12832>
8. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
 9. Molinaro, A. M., Taylor, J. W., Wiencke, J. K., & Wrensch, M. R. (2019). Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 405–417. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0220-2>
 10. van den Bent, M. J., & Chang, S. M. (2018). Grade II and III Oligodendroglioma and Astrocytoma. *Neurologic clinics*, 36(3), 467–484. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.04.005>
 11. Arcella, A., Limanaqi, F., Ferese, R., Biagioni, F., Oliva, M. A., Storto, M., Fanelli, M., Gambardella, S., & Fornai, F. (2020). Dissecting Molecular Features of Gliomas: Genetic Loci and Validated Biomarkers. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 685. <https://doi.org/10.3390/ijms21020685>
 12. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Adult Central Nervous System Tumors Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated <20.01.2023>. Available at: <https://www.cancer.gov/types/brain/hp/adult-brain-treatment-pdq>. Accessed <24.04.2023>. [PMID: 26389419]
 13. Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., Holland, E. C., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J. M., Louis, D. N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., van den Bent, M. J., von Deimling, A., & Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for *IDH*-mutant astrocytomas. *Acta neuropathologica*, 139(3), 603–608. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02127-9>
 14. Mesfin FB, Al-Dhahir MA. Gliomas. [Updated 2022 Jun 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441874/>

15. Kapoor M, Gupta V. Astrocytoma. [Updated 2022 Oct 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559042/>
16. Mair, M. J., Geurts, M., van den Bent, M. J., & Berghoff, A. S. (2021). A basic review on systemic treatment options in WHO grade II-III gliomas. *Cancer Treatment Reviews*, 92, 102124. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102124>
17. Bai, J., Varghese, J., & Jain, R. (2020). Adult glioma WHO classification update, genomics, and imaging: What the radiologists need to know. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 29(2), 71–82. <https://doi.org/10.1097/RMR.0000000000000234>
18. Park, S. H., Won, J., Kim, S. I., Lee, Y., Park, C. K., Kim, S. K., & Choi, S. H. (2017). Molecular testing of brain tumor. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 51(3), 205–223. <https://doi.org/10.4132/jptm.2017.03.08>
19. Olafsson, S., & Anderson, C. A. (2021). Somatic mutations provide important and unique insights into the biology of complex diseases. *Trends in genetics : TIG*, 37(10), 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.06.01>
20. Bhavya, B., Anand, C.R., Madhusoodanan, U.K. et al. To be Wild or Mutant: Role of Isocitrate Dehydrogenase 1 (*IDH1*) and 2-Hydroxy Glutarate (2-HG) in Gliomagenesis and Treatment Outcome in Glioma. *Cell Mol Neurobiol* 40, 53–63 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00730-3>
21. Unruh, D., Zewde, M., Buss, A., Drumm, M. R., Tran, A. N., Scholtens, D. M., & Horbinski, C. (2019). Methylation and transcription patterns are distinct in *IDH* mutant gliomas compared to other *IDH* mutant cancers. *Scientific reports*, 9(1), 8946. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45346-1>
22. Dang, L., White, D., Gross, S. et al. Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739–744 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature08617>
23. Liu, J., Zhang, X., Yan, X., Sun, M., Fan, Y., & Huang, Y. (2019). Significance of *TERT* and *ATRX* mutations in glioma. *Oncology letters*, 17(1), 95–102. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9634>
24. Arita, H., Narita, Y., Takami, H., Fukushima, S., Matsushita, Y., Yoshida, A., Miyakita, Y., Ohno, M., Shibui, S., & Ichimura, K. (2013). *TERT* promoter mutations rather than methylation are the main mechanism for *TERT*

- upregulation in adult gliomas. *Acta neuropathologica*, 126(6), 939–941.
<https://doi.org/10.1007/s00401-013-1203-9>
25. Qin, T., Mullan, B., Ravindran, R., Messinger, D., Siada, R., Cummings, J. R., Harris, M., Muruganand, A., Pyaram, K., Miklja, Z., Reiber, M., Garcia, T., Tran, D., Danussi, C., Brosnan-Cashman, J., Pratt, D., Zhao, X., Rehemtulla, A., Sartor, M. A., Venneti, S., ... Koschmann, C. (2022). *ATRX* loss in glioma results in dysregulation of cell-cycle phase transition and ATM inhibitor radiosensitization. *Cell reports*, 38(2), 110216.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110216>
 26. Haase, S., Garcia-Fabiani, M. B., Carney, S., Altshuler, D., Núñez, F. J., Méndez, F. M., Núñez, F., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2018). Mutant *ATRX*: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(7), 599–613.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1487953>
 27. Hasanau, T., Pisarev, E., Kisil, O., Nonoguchi, N., Le Calvez-Kelm, F., & Zvereva, M. (2022). Detection of *TERT* Promoter Mutations as a Prognostic Biomarker in Gliomas: Methodology, Prospects, and Advances. *Biomedicines*, 10(3), 728. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030728>
 28. Sarma, Susmita¹; Khonglah, Yookarin¹; Mishra, Jaya¹; Kakati, Arindom²; Phukan, Pranjal³. Gliomas - An experience based on molecular markers. *Journal of Family Medicine and Primary Care* 10(3):p 1341-1346, March 2021. | DOI: 10.4103/jfmpc.jfmpc_1963_20
 29. Nandakumar, P., Mansouri, A., & Das, S. (2017). The Role of *ATRX* in Glioma Biology. *Frontiers in oncology*, 7, 236. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00236>
 30. Wesseling, P., van den Bent, M., & Perry, A. (2015). Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta neuropathologica*, 129(6), 809–827. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1424-1>
 31. Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D., & Habib, A. A. (2010). Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 12(9), 675–684.
<https://doi.org/10.1593/neo.10688>
 32. Oprita A, Baloi S-C, Staicu G-A, Alexandru O, Tache DE, Danoiu S, Micu ES, Sevastre A-S. Updated Insights on *EGFR* Signaling Pathways in Glioma.

- International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(2):587.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020587>
33. Kai, Z., Dingyang, L., & Zhuanyi, Y. (2021). Prognostic Role of *BRAF* Mutation in Low-Grade Gliomas: Meta-analysis. *World neurosurgery*, 147, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.12.029>
 34. Gandham, E. J., Goyal-Honavar, A., Beno, D., Pai, R., Balakrishnan, R., Jasper, A., Gowri, M., Moorthy, R. K., Chacko, A. G., & Chacko, G. (2022). Impact of Grade on Survival in Pleomorphic Xanthoastrocytoma and Low Prevalence of *BRAF* V600E Mutation. *World neurosurgery*, 164, e922–e928. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2022.05.066>
 35. Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Jr, Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10(9), 297. <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>
 36. Galbraith, K., & Snuderl, M. (2021). Molecular Pathology of Gliomas. *Surgical pathology clinics*, 14(3), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.path.2021.05.003>
 37. Kristensen, B. W., Priesterbach-Ackley, L. P., Petersen, J. K., & Wesseling, P. (2019). Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(8), 1265–1278. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz164>
 38. Lobbous, M., Bernstock, J. D., Coffee, E., Friedman, G. K., Metrock, L. K., Chagoya, G., Elsayed, G., Nakano, I., Hackney, J. R., Korf, B. R., & Nabors, L. B. (2020). An Update on Neurofibromatosis Type 1-Associated Gliomas. *Cancers*, 12(1), 114. <https://doi.org/10.3390/cancers12010114>
 39. Scheer, M., Leisz, S., Sorge, E., Storozhuk, O., Prell, J., Ho, I., & Harder, A. (2021). Neurofibromatosis Type 1 Gene Alterations Define Specific Features of a Subset of Glioblastomas. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 352. <https://doi.org/10.3390/ijms23010352>
 40. Foulkes, W.D., Flanders, T.Y., Pollock, P.M. *et al.* The *CDKN2A* (*p16*) Gene and Human Cancer. *Mol Med* 3, 5–20 (1997). <https://doi.org/10.1007/BF03401664>

41. Huang L. E. (2022). Impact of *CDKN2A/B* Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of *IDH*-Mutant Glioma. *Biomedicines*, 10(2), 246. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020246>
42. Lu, V. M., O'Connor, K. P., Shah, A. H., Eichberg, D. G., Luther, E. M., Komotar, R. J., & Ivan, M. E. (2020). The prognostic significance of *CDKN2A* homozygous deletion in *IDH*-mutant lower-grade glioma and glioblastoma: a systematic review of the contemporary literature. *Journal of neuro-oncology*, 148(2), 221–229. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03528-2>
43. Higa, N., Akahane, T., Yokoyama, S., Yonezawa, H., Uchida, H., Takajo, T., Otsuji, R., Hamada, T., Matsuo, K., Kirishima, M., Hata, N., Hanaya, R., Tanimoto, A., & Yoshimoto, K. (2022). Prognostic impact of *PDGFRA* gain/amplification and *MGMT* promoter methylation status in patients with *IDH* wild-type glioblastoma. *Neuro-oncology advances*, 4(1), vdac097. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac097>
44. Han, F., Hu, R., Yang, H., Liu, J., Sui, J., Xiang, X., Wang, F., Chu, L., & Song, S. (2016). *PTEN* gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 9, 3485–3492. <https://doi.org/10.2147/OTT.S99942>
45. Haque, A., Banik, N. L., & Ray, S. K. (2011). Molecular alterations in glioblastoma: potential targets for immunotherapy. *Progress in molecular biology and translational science*, 98, 187–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385506-0.00005-3>
46. Haque, A., Banik, N. L., & Ray, S. K. (2011). Molecular alterations in glioblastoma: potential targets for immunotherapy. *Progress in molecular biology and translational science*, 98, 187–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385506-0.00005-3>
47. Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, 70, 27–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>
48. Aoki, K., Natsume, A. Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol* 36, 84–91 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10014-019-00339-w>

49. Lakshminarasimhan, R., & Liang, G. (2016). The Role of DNA Methylation in Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 945, 151–172. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_7
50. Wenger A, Carén H. Methylation Profiling in Diffuse Gliomas: Diagnostic Value and Considerations. *Cancers*. 2022; 14(22):5679. <https://doi.org/10.3390/cancers14225679>
51. J Dabrowski, M., & Wojtas, B. (2019). Global DNA Methylation Patterns in Human Gliomas and Their Interplay with Other Epigenetic Modifications. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3478. <https://doi.org/10.3390/ijms20143478>
52. Aoki, K., Natsume, A. Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol* 36, 84–91 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10014-019-00339-w>
53. Rivera, A. L., Pelloski, C. E., Gilbert, M. R., Colman, H., De La Cruz, C., Sulman, E. P., Bekele, B. N., & Aldape, K. D. (2010). *MGMT* promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro-oncology*, 12(2), 116–121. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop020>
54. Jovanović N, Lazarević M, Cvetković VJ, Nikolov V, Kostić Perić J, Ugrin M, Pavlović S, Mitrović T. The Significance of *MGMT* Promoter Methylation Status in Diffuse Glioma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21):13034. <https://doi.org/10.3390/ijms232113034>
55. Håvik, A.B., Brandal, P., Honne, H. et al. *MGMT* promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med* 10, 36 (2012). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-36>
56. Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G. et al. *MGMT* promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?. *Nat Rev Neurol* 6, 39–51 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.197>
57. Mardis E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>

58. Qin D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology & medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
59. Luthra, R., Chen, H., Roy-Chowdhuri, S., & Singh, R. R. (2015). Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers*, 7(4), 2023–2036. <https://doi.org/10.3390/cancers7040874>
60. Zhang, J., Späth, S. S., Marjani, S. L., Zhang, W., & Pan, X. (2018). Characterization of cancer genomic heterogeneity by next-generation sequencing advances precision medicine in cancer treatment. *Precision clinical medicine*, 1(1), 29–48. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pby007>
61. Carter, J. H., McNulty, S. N., Cimino, P. J., Cottrell, C. E., Heusel, J. W., Vigh-Conrad, K. A., & Duncavage, E. J. (2017). Targeted Next-Generation Sequencing in Molecular Subtyping of Lower-Grade Diffuse Gliomas: Application of the World Health Organization's 2016 Revised Criteria for Central Nervous System Tumors. *Journal of Molecular Diagnostics*, 19(2), 328–337
62. Shin, H., Sa, J. K., Bae, J. S., Koo, H., Jin, S., Cho, H. J., Choi, S. W., Kyoung, J. M., Kim, J. Y., Seo, Y. J., Joung, J. G., Kim, N. K. D., Son, D. S., Chung, J., Lee, T., Kong, D. S., Choi, J. W., Seol, H. J., Lee, J. Il, Nam, D. H. (2020). Clinical targeted next-generation sequencing panels for detection of somatic variants in gliomas. *Cancer Research and Treatment*, 52(1), 41–50. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.036>
63. Zacher, A., Kaulich, K., Stepanow, S., Wolter, M., Köhrer, K., Felsberg, J., Malzkorn, B., & Reifenberger, G. (2017). Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel. *Brain Pathology*, 27(2), 146–159. <https://doi.org/10.1111/bpa.12367>
64. Gleize, V., Alentorn, A., Connen de Kérillis, L., Labussière, M., Nadaradjane, A. A., Mundwiller, E., Ottolenghi, C., Mangesius, S., Rahimian, A., Ducray, F., POLA network, Mokhtari, K., Villa, C., & Sanson, M. (2015). *CIC* inactivating mutations identify aggressive subset of 1p19q codeleted gliomas. *Annals of neurology*, 78(3), 355–374. <https://doi.org/10.1002/ana.24443>

65. Pei, X. M., Yeung, M. H. Y., Wong, A. N. N., Tsang, H. F., Yu, A. C. S., Yim, A. K. Y., & Wong, S. C. C. (2023). Targeted Sequencing Approach and Its Clinical Applications for the Molecular Diagnosis of Human Diseases. *Cells*, 12(3), 493. <https://doi.org/10.3390/cells12030493>
66. Dahuja, G., Gupta, A., Jindal, A., Jain, G., Sharma, S., & Kumar, A. (2021). Clinicopathological Correlation of Glioma Patients with respect to Immunohistochemistry Markers: A Prospective Study of 115 Patients in a TERTiary Care Hospital in North India. *Asian journal of neurosurgery*, 16(4), 732–737. https://doi.org/10.4103/ajns.AJNS_377_20
67. Belghali, M., Rais, H., Ba-M'hamed, S., Hazmiri, F., El Khoudri, N., Fakhri, A., Belbachir, A., Elkhiraoui, H., & Hakmaoui, A. (2017). Glial fibrillary acidic protein, CD34, Ki-67, and p53 immunohistochemistry expression study to estimate the concordance between the morphology and the awarded grades of the brain gliomas. *Clinical Cancer Investigation Journal*, 6(1), 44-50. https://doi.org/10.4103/ccij.ccij_148_16
68. Wong, E., Nahar, N., Hau, E., Varikatt, W., Gebiski, V., Ng, T., Jayamohan, J., & Sundaresan, P. (2019). Cut-point for Ki-67 proliferation index as a prognostic marker for glioblastoma. *Asia-Pacific journal of clinical oncology*, 15(1), 5–9. <https://doi.org/10.1111/ajco.12826>
69. Yokoo, H., Nobusawa, S., Takebayashi, H., Ikenaka, K., Isoda, K., Kamiya, M., Sasaki, A., Hirato, J., & Nakazato, Y. (2004). Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *The American journal of pathology*, 164(5), 1717–1725. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63730-](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63730-)
70. Goyal, R., Mathur, S. K., Gupta, S., Goyal, R., Kumar, S., Batra, A., Hasija, S., & Sen, R. (2015). Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system. *Journal of neurosciences in rural practice*, 6(4), 499–503. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.168426>
71. Machein, M.R., et al., VEGF in brain tumors. *J Neuro-Oncol*. 2000;50:p.109-120.
72. Torp, S. H., Solheim, O., & Skjulsvik, A. J. (2022). The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what

- neurosurgeons need to know-a minireview. *Acta neurochirurgica*, 164(9), 2453–2464. <https://doi.org/10.1007/s00701-022-05301-y>
73. Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., & Colman, H. (2017, April 1). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*. Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>
 74. Sasmita, A. O., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2018, February 1). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ajco.12756>
 75. Wiestler, B., Capper, D., Holland-Letz, T., Korshunov, A., von Deimling, A., Pfister, S. M., Platten, M., Weller, M., & Wick, W. (2013). *ATRX* loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of *IDH* mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta neuropathologica*, 126(3), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1156-z>
 76. Packer, R. J., Iavarone, A., Jones, D. T. W., Blakeley, J. O., Bouffet, E., Fisher, M. J., Hwang, E., Hawkins, C., Kilburn, L., MacDonald, T., Pfister, S. M., Rood, B., Rodriguez, F. J., Tabori, U., Ramaswamy, V., Zhu, Y., Fangusaro, J., Johnston, S. A., & Gutmann, D. H. (2020). Implications of new understandings of gliomas in children and adults with *NF1*: report of a consensus conference. *Neuro-oncology*, 22(6), 773–784. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa036>
 77. Bettegowda, C., Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Wood, L. D., Hruban, R. H., Rodriguez, F. J., Cahill, D. P., McLendon, R., Riggins, G., Velculescu, V. E., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Vogelstein, B., Bigner, D., Yan, H., Papadopoulos, N., & Kinzler, K. W. (2011). Mutations in *CIC* and *FUBP1* contribute to human oligodendroglioma. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1453–1455. <https://doi.org/10.1126/science.1210557>
 78. Arita, H., Matsushita, Y., Machida, R., Yamasaki, K., Hata, N., Ohno, M., Yamaguchi, S., Sasayama, T., Tanaka, S., Higuchi, F., Iuchi, T., Saito, K., Kanamori, M., Matsuda, K. I., Miyake, Y., Tamura, K., Tamai, S., Nakamura, T., Uda, T., Okita, Y., ... Ichimura, K. (2020). *TERT* promoter mutation confers favorable prognosis regardless of 1p/19q status in adult diffuse gliomas with *IDH1/2* mutations. *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01078-2>

79. Olympios, N., Gilard, V., Marguet, F., Clatot, F., Di Fiore, F., & Fontanilles, M. (2021). *TERT* Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. *Cancers*, 13(5), 1147. <https://doi.org/10.3390/cancers13051147>
80. Lee, J. C., Vivanco, I., Beroukhi, R., Huang, J. H., Feng, W. L., DeBiasi, R. M., Yoshimoto, K., King, J. C., Nghiemphu, P., Yuza, Y., Xu, Q., Greulich, H., Thomas, R. K., Paez, J. G., Peck, T. C., Linhart, D. J., Glatt, K. A., Getz, G., Onofrio, R., Ziaugra, L., ... Mellinghoff, I. K. (2006). Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS medicine*, 3(12), e485. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030485>
81. Chang, M. T., Asthana, S., Gao, S. P., Lee, B. H., Chapman, J. S., Kandoth, C., Gao, J., Socci, N. D., Solit, D. B., Olshen, A. B., Schultz, N., & Taylor, B. S. (2016). Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nature biotechnology*, 34(2), 155–163. <https://doi.org/10.1038/nbt.3391>
82. Yun, J., Kim, J. A., Park, J., Im, K., Lee, Y. E., Jeong, D., Ryu, S., Lim, K. M., Kim, S. M., Ahn, Y. O., & Lee, D. S. (2020). Reclassification of subtypes in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasm by 2016 WHO diagnostic criteria: focus on the cases classified as myeloproliferative neoplasm, unclassifiable by the 2008 version. *Leukemia & lymphoma*, 61(14), 3498–3502. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1808212>
83. Gianelli, U., Cattaneo, D., Bossi, A., Cortinovis, I., Boiocchi, L., Liu, Y. C., Augello, C., Bonometti, A., Fiori, S., Orofino, N., Guidotti, F., Orazi, A., & Iurlo, A. (2017). The myeloproliferative neoplasms, unclassifiable: clinical and pathological considerations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 30(2), 169–179. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.182>
84. Bellanné-Chantelot, C., Carette, C., Riveline, J. P., Valéro, R., Gautier, J. F., Larger, E., Reznik, Y., Ducluzeau, P. H., Sola, A., Hartemann-Heurtier, A., Lecomte, P., Chaillous, L., Laloi-Michelin, M., Wilhem, J. M., Cuny, P., Duron, F., Guerci, B., Jeandidier, N., Mosnier-Pudar, H., Assayag, M., ... Timsit, J. (2008). The type and the position of *HNF1A* mutation modulate age

- at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes*, 57(2), 503–508. <https://doi.org/10.2337/db07-0859>
85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/827401/> (Erişim tarihi: 30.10.2023)
 86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/224543/> (Erişim tarihi: 30.10.2023)
 87. Shi, D., & Gu, W. (2012). Dual Roles of *MDM2* in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of *MDM2* Repression of p53 Activity. *Genes & cancer*, 3(3-4), 240–248. <https://doi.org/10.1177/1947601912455199>
 88. Saadeh, F. S., Mahfouz, R., & Assi, H. I. (2018). *EGFR* as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *The International journal of biological markers*, 33(1), 22–32. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000301>
 89. Kordek, R., Biernat, W., Alwasiak, J., Maculewicz, R., Yanagihara, R., & Liberski, P. P. (1995). p53 protein and epidermal growth factor receptor expression in human astrocytomas. *Journal of neuro-oncology*, 26(1), 11–16. <https://doi.org/10.1007/BF01054764>
 90. Reifenberger, J., Reifenberger, G., Ichimura, K., Schmidt, E. E., Wechsler, W., & Collins, V. P. (1996). Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *The American journal of pathology*, 149(1), 29–35.
 91. Purkait, S., Miller, C. A., Kumar, A., Sharma, V., Pathak, P., Jha, P., Sharma, M. C., Suri, V., Suri, A., Sharma, B. S., Fulton, R. S., Kale, S. S., Dahiya, S., & Sarkar, C. (2017). *ATRX* in Diffuse Gliomas With its Mosaic/Heterogeneous Expression in a Subset. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 27(2), 138–145. <https://doi.org/10.1111/bpa.12364>
 92. Karsy, M., Guan, J., Cohen, A. L., Jensen, R. L., & Colman, H. (2017). New Molecular Considerations for Glioma: *IDH*, *ATRX*, *BRAF*, *TERT*, H3 K27M. *Current neurology and neuroscience reports*, 17(2), 19. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0722-5>
 93. Arita, H., & Ichimura, K. (2022). Prognostic significance of *TERT* promoter mutations in adult-type diffuse gliomas. *Brain tumor pathology*, 39(3), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s10014-021-00424-z>

94. Arrieta, V. A., Chen, A. X., Kane, J. R., Kang, S. J., Kassab, C., Dmello, C., Zhao, J., Burdett, K. B., Upadhyayula, P. S., Lee-Chang, C., Shilati, J., Jaishankar, D., Chen, L., Gould, A., Zhang, D., Yuan, J., Zhao, W., Ling, X., Burks, J. K., Laffleur, B., ... Sonabend, A. M. (2021). ERK1/2 phosphorylation predicts survival following anti-PD-1 immunotherapy in recurrent glioblastoma. *Nature cancer*, 2(12), 1372–1386. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00260-2>
95. Zhang, E., Huang, X., & He, J. (2021). Integrated bioinformatic analysis of *HNF1A* in human cancers. *The Journal of international medical research*, 49(3), 300060521997326. <https://doi.org/10.1177/0300060521997326>
96. de Bruijn, I., Kundra, R., Mastrogiacomio, B., Tran, T. N., Sikina, L., Mazor, T., Li, X., Ochoa, A., Zhao, G., Lai, B., Abeshouse, A., Baiceanu, D., Ciftci, E., Dogrusoz, U., Dufilie, A., Erkoc, Z., Garcia Lara, E., Fu, Z., Gross, B. E., Haynes, C. D., ... Schultz, N. (2023). Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer research*, 10.1158/0008-5472.CAN-23-0816. Advance online publication. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0816>
97. Yang, Z., Hu, N., Wang, W., Hu, W., Zhou, S., Shi, J., Li, M., Jing, Z., Chen, C., Zhang, X., Yang, R., Fu, X., & Wang, X. (2022). Loss of *FBXW7* Correlates with Increased *IDH1* Expression in Glioma and Enhances *IDH1*-Mutant Cancer Cell Sensitivity to Radiation. *Cancer research*, 82(3), 497–509. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0384>
98. An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W., & Weiss, W. A. (2018). Epidermal growth factor receptor and *EGFRvIII* in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37(12), 1561–1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>

HAM VERİLER

Solid tümör gen paneli genleri ve dizileme yapılan ekzon bilgileri

Gen Sembolü	Dizilenen ekzon numarası	Genetik değişiklik
<i>AKT1</i>	3,6	SNV/Indel
<i>ALK</i>	21,22,23,25	SNV/Indel/CNV
<i>APC</i>	16	SNV/Indel/CNV
<i>ATM</i>	8,9,12,17,26,34,35,36,39,50,54,55,56,59,61,63	SNV/Indel/CNV
<i>AURKA</i>	2,5,6,7,8	SNV/Indel/CNV
<i>BRAF</i>	11,15	SNV/Indel
<i>CCND1</i>	-	CNV
<i>CCNE1</i>	3,4,5,6,7,8,10,12	SNV/Indel/CNV
<i>CDH1</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16	SNV/Indel/CNV
<i>CDK4</i>	2,3,4,5,6,7	SNV/Indel/CNV
<i>CDKN2A</i>	1,2,3	SNV/Indel/CNV
<i>CSF1R</i>	7,22	SNV/Indel
<i>CTNNB1</i>	3	SNV/Indel
<i>DDR2</i>	12,13,14,15,16,17,18	SNV/Indel/CNV
<i>EGFR</i>	3,7,15,18,19,20,21	SNV/Indel/CNV
<i>ERBB2</i>	10,19,20,21,24	SNV/Indel/CNV
<i>ERBB3</i>	2,3,7,8	SNV/Indel/CNV
<i>ERBB4</i>	3,4,6,7,8,9,15,23	SNV/Indel/CNV
<i>ESR1</i>	8	SNV/Indel
<i>EZH2</i>	16	SNV/Indel
<i>FBXW7</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	SNV/Indel/CNV
<i>FGFR1</i>	4,7,8,13,15,17	SNV/Indel/CNV
<i>FGFR2</i>	7,9,12,14	SNV/Indel/CNV
<i>FGFR3</i>	7,8,9,14,15,16,18	SNV/Indel/CNV
<i>FLT3</i>	11,14,16,20	SNV/Indel/CNV
<i>FOXL2</i>	1	SNV/Indel
<i>GNA11</i>	5	SNV/Indel
<i>GNAQ</i>	4,5	SNV/Indel
<i>GNAS</i>	6,7,8,9	SNV/Indel/CNV
<i>H3F3A</i>	2	SNV/Indel
<i>HNF1A</i>	3,4	SNV/Indel
<i>HRAS</i>	2,3	SNV/Indel
<i>IDH1</i>	3,4	SNV/Indel
<i>IDH2</i>	4	SNV/Indel
<i>JAK2</i>	11,13,14,16,19	SNV/Indel/CNV
<i>JAK3</i>	4,13,16	SNV/Indel/CNV
<i>KDR</i>	6,7,11,19,21,26,27,30	SNV/Indel/CNV
<i>KIT</i>	2,8,9,10,11,13,14,15,17,18	SNV/Indel/CNV

<i>KRAS</i>	2,3,4,5	SNV/Indel/CNV
<i>MAP2K1</i>	2,3	SNV/Indel
<i>MDM2</i>	2,3,4,6,8*,10	CNV
<i>MET</i>	2,11,14,16,19,21	SNV/Indel/CNV
<i>MYC</i>	-	CNV
<i>MYCN</i>	-	CNV
<i>MLH1</i>	12	SNV/Indel
<i>MPL</i>	10	SNV/Indel
<i>NOTCH1</i>	25,26,27,34	SNV/Indel/CNV
<i>NPM1</i>	11	SNV/Indel
<i>NRAS</i>	2,3,4,5	SNV/Indel/CNV
<i>PDGFRA</i>	12,14,15,18,23	SNV/Indel/CNV
<i>PIK3CA</i>	2,5,7,8,10,14,19,21	SNV/Indel/CNV
<i>PIK3R1</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	SNV/Indel/CNV
<i>PTEN</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9	SNV/Indel/CNV
<i>PTPN11</i>	3,13	SNV/Indel
<i>RB1</i>	4,6,10,11,14,17,18,20,21,22*	SNV/Indel/CNV
<i>RET</i>	10,11,13,14,15,16	SNV/Indel/CNV
<i>RHOA</i>	2,3	SNV/Indel
<i>ROS1</i>	38	SNV/Indel
<i>SMAD4</i>	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	SNV/Indel/CNV
<i>SMARCB1</i>	2,4,5,9	SNV/Indel/CNV
<i>SMO</i>	3,5,6,9,11	SNV/Indel/CNV
<i>SRC</i>	14	SNV/Indel
<i>STK11</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9	SNV/Indel/CNV
<i>TERT</i>	Promoter, 1	SNV/Indel
<i>TP53</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	SNV/Indel/CNV
<i>VHL</i>	1,2,3	SNV/Indel/CNV

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

GENETİK BİLİMSEL ARAŞTIRMA AMAÇLI KAN VEYA DOKU ÖRNEĞİ ALINAN KİŞİLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

1. “Glial Tümörlerde DNA Metilasyon Analizi ve Genetik Varyasyonların Belirlenmesi” başlıklı klinik çalışmada kullanılmak üzere kolunuzdan 10 mL (1 tüp) kan ve ameliyat esnasında patoloji için alınan beyin dokusundan örnek alınması gerekmektedir. Sağlıklı kişilerden sadece kan örneği alınması gerekmektedir. Bu kandan ve dokudan, genetik materyal (DNA/RNA) ve/veya hücre elde edilecektir. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

2. Tanı örneğiniz bölümümüze ulaştıktan sonra kayıt edilip, numaralandırılarak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak şekilde saklanmaktadır.

3. Alınan biyolojik örnek materyalinizden DNA/RNA/hücre izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu arşivde kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.

4. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz iş yeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

5. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan kendi isteğiniz ile ve istediğiniz an ayrılabilirsiniz.

6. Bu çalışmada sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumundan herhangi bir ödeme alınması söz konusu olmadığı gibi size de çalışmaya katılmanız nedeniyle herhangi bir ödemede bulunulmayacaktır.

7. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu talebinizin/kararınızın gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz bir etkisi olmayacaktır.

8. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

A. Benden alınan kan ve doku örneğinin yukarıda adı belirtilen bilimsel çalışmada kullanılmasını

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

B. Benden alınan kan ve doku örneğinin bundan sonra yapılabilecek genetik çalışmalarda kullanılmasını

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

C. Yukarıda adı belirtilen çalışmada ve örneğimin kullanıldığı diğer çalışmalarda tespit edilen benimle ilgili bulguları öğrenmek

İstiyorum ☐

İstemiyorum ☐

Burada attığım imza ile genetik testlerimin yapılması, materyalimin saklanması ve gereği halinde kimlik bilgilerim saklı kalmak koşulu ile elde edilen verilerin İ.Ü. AZİZ SANCAR DETAE Genetik AD tarafından yürütülen veya desteklenen bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum ve bu onayı verirken yukarıda tarafıma verilen bilgileri okuduğumu, anladığımı ve kabul ettiğimi tasdik ediyorum.

(Bu belge 2 sayfadan oluşmaktadır)

NOT:

Zihinsel özürlü kişiler, bilinci kapalı olanlar ve reşit olmayan çocuklar için bu belge velisi veya vasisi tarafından doldurulacaktır. Kararınızdan önce bilgileri lütfen okuyunuz.

Formu Okuyup İmzalayan Kişinin;

Bilgilendiren Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Adı ve Soyadı:

Hastaya Yakınlık Derecesi:

Telefon:

İletişim Bilgileri:

Tarih:

Tarih:

İmza

İmza:

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GLİAL TÜMÖRLERDE DNA METİLASYON ANALİZİ VE GENETİK VARYASYONLARIN BELİRLENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	clinvarminer.genetics.utah.edu İnternet Kaynağı	% 2
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	dspace.kocaeli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.omu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
9	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1