

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE BCL-2 , MEG3 VE
NRF2 GEN İFADE PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Aysel ÇÖMERTMAN**

**Danışman
Prof.Dr. Munis DUNDAR**

Yüksek Lisans Tezi

**Eylül 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE BCL2, MEG3 VE NRF2
GENLERİNİN İFADE PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Aysel ÇÖMERTMAN**

**Danışman
Prof. Dr. Munis DUNDAR**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2016- 6639 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Eylül-2017

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Aysel ÇÖMERTMAN

İmza :

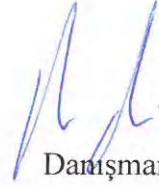
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Primer Beyin Tümörlerinde BCL-2 ,MEG3, NRF2 Gen İfade Profillerinin araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan

Aysel ÇÖMERTMAN



Danışman

Prof. Dr. Munis DÜNDAR



Tıbbi Genetik ABD Başkanı

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Munis DÜNDAR danışmanlığında **Aysel ÇÖMERTMAN** tarafından hazırlanan “**Primer Beyin Tümörlerinde BCL-2 ,MEG3, NRF2 Gen İfade Profillerinin araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

15/09 / 2017

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr.Munis DÜNDAR (Erciyes Üniversitesi)

Üye :Doç. Dr. A.İlter GÜNEY (Marmara Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Zuhale HAMURCU (Erciyes Üniversitesi)

İmza



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar insani ilişkilerde de sonsuz desteğiyle gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a

Yüksek Lisans Eğitimin süresince bilgi ve tecrübeleri, anlayışlı ve hoşgörülerini için değerli hocalarım Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL ve Prof.Dr. Çetin SAATÇI'ye

Değerli kişiliği ile gerek tezimin laboratuvar çalışmaları ve gerekse yazımı esnasındaki yardımlarından dolayı Sayın Biyolog Hilal AKALIN'a

Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyen iş arkadaşım Uzman Münevver BARAN'a

Tez çalışmam için uygun hasta temininde dolayı sayın Prof. Dr. Özlem CANÖZ'e,

Tezimin istatistiksel analizleri için yardımlarını esirgemeyen Sayın Yağut ERDEM'e

Tezimin laboratuvar çalışmalarında emeğini ve bilgisini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Damla BADUR MERMER, Nuriye GÖKÇE, Zeliha FUNDA KILIK'a

Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan değerli arkadaşlarım'a

Yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla TEŞEKKÜR EDERİM.

Aysel ÇÖMERTMAN

Kayseri, Eylül 2017

PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE BCL-2, MEG3 VE NRF2 GENLERİNİN İFADE PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aysel ÇÖMERTMAN
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Nisan 2017
Danışman: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

KISA ÖZET

Beyin tümörlerini iki ana gruba ayırabiliriz; ‘Metastatik Beyin Tümörleri (MBT)’ ve ‘Primer Beyin Tümörleri (PBT)’. Beyin dokusu dışındaki bir dokudan köken almış ve intrakraniyal bölgeye yayılım göstermiş tümörlere MBT denir. Beynin kendi hücrelerinden köken alan tümörlere ise PBT denir. Bu çalışmada beyin tümörü etyolojisine katkıda bulunan genlerin keşfedilmesi amaçlanmaktadır. MEG3 geni kodlamayan uzun bir RNA'yı (lncRNA) kodlar ve birçok normal dokuda eksprese edilir. Nükleer eritroid 2 ile ilgili bir faktör 2 (Nrf2) antioksidan yanıt elemanları aracılı gen ifade merkezi düzenleyicisidir. Çalışmamızda 45 PBT (27 erkek, 18 kadın) hastasından ve ölümü beyin hastalığına bağlı olmayan 23 kontrol grubundan alınan beyin dokusunda Nrf2 ve Meg3 genlerinin ekspresyonu LightCycler 480 Roche RT-PCR yöntemi ile araştırıldı. İnternal kontrol olarak Beta-aktin (housekeeping) kullanılmıştır. Genlerin ifade seviyesi, ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilir. Hasta grubunda Meg3 geninin ekspresyonu (0.011 ± 0.009) kontrol grubuna (0.342 ± 0.074) göre azalmıştır.

Nrf2 geninin ekspresyonu da hasta grubunda (0.271 ± 0.179) kontrol grubuna (1.416 ± 0.359) göre azalmıştır. Meg3 ve Nrf2 genlerinin ekspresyonu hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark t-test ile analiz edilmiş, sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Meg3, Nrf2, Beyin tümörü, Gen ifadesi

PRIMARY BRAIN TUMORS BCL-2, MEG-3 AND NRF2 INVESTIGATION OF GENE EXPRESSION PROFILE

Aysel ÇÖMERTMAN
Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Genetics
M.Sc. Thesis, April 2017
Supervisor: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

ABSTRACT

Structures that are malignant and benign as a result of abnormally growing normal cells in their brain are described as brain tumors. Of all cancers, primary brain tumors correspond to relatively small portion, but its mortality is high. MEG3 (Maternally Expressed 3 (Non-Protein Coding)) represents a tumor suppressor gene and ectopic expression can promote cellular apoptosis of human glioma cell lines that inhibit cell proliferation. NFE2L2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2) codes for a transcription factor that is a member of a small family of protein, basic leucine zipper.

In this study we aim to discover the genes, which are contributing to brain tumor etiology. In our study, the expression of Nrf2 and Meg3 genes in brain tissue from 45 PBT patients (27 male, 18 female) and 23 control groups whose death was not related to brain disease was investigated by LightCycler 480 Roche RT-PCR method. Internal control was widely used in Beta-actin (housekeeping). The expression level of the genes is shown as mean $\pm$ SEM. The expression of Meg3 (0.011 ± 0.009) gene was found lower in patients than in healthy controls (0.342 ± 0.074). The expression of nrf2 (0.271 ± 0.179) gene was found lower in patients than in healthy controls (1.416 ± 0.359). Meg3 gene expression of Nrf2, and this difference between patients and control groups analyzed by t-test, respectively.

Key Words: Meg3 , Nrf2 , Brain tumor , Gene Expression

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. SİNİR SİSTEMİ	3
2.1.1. Merkezi sinir sistemi anatomisi.....	3
2.1.2. Merkezi sinir sisteminin embriyolojik gelişimi	3
2.1.3 .Merkezi sinir sistemi histolojisi	4
2.2. BEYİN TÜMÖRLERİ	6
2.2.1. Sınıflandırma.....	6
2.2.2. Evreleme	7
2.2.3. Epidemiyoloji.....	8
2.3. MEG3 GENİ VE FONKSİYONU.....	9
2.4. NRF2 GENİ VE FONKSİYONU.....	10
2.5. BCL2 GENİ VE FONKSİYONU.....	10

3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	12
3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	12
3.3. ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLEN GRUPLAR	12
3.3.1. Hasta grubu	12
3.3.2. Kontrol gurubu	13
3.4. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	13
3.4.1. Demirbaş Malzemeler	13
3.4.2. Sarf Malzemeler	13
3.5. YÖNTEMLER	14
3.5.1. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	14
3.5.2. İstatiksel analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLAR	23
4.1.1. MEG3 geni	23
4.1.3. NRF2 geni	25
4.1.4. B-ACTİN	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	29
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

MBT:	Metastatik Beyin Tümörleri
PBT:	Primer Beyin Tümörleri
SSS:	Santral Sinir Sistemi
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
ÇSS:	Çevresel Sinir Sistemi
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
RT-PCR:	Real Time Polimerase Chain Reaction
NRF2:	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
MEG3:	Maternally Expressed 3 (Non-Protein Coding)

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1 . DSÖ Beyin tümörleri sınıflandırması	8
Tablo2. cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı (1 reaksiyon için).....	18
Tablo 3. Revers transkripsiyon karışımı bileşenleri	19
Tablo 4. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü.....	19
Tablo 5. Pre-Amplifikasyon PCR reaksiyon karışımı	20
Tablo 6. Preamplifikasyon için termal döngü koşulları.....	20
Tablo 7. LightCycler 480 Probes Master PCR karışımı	21
Tablo 8. Lightcycler 480 II software programında ayarlanan sıcaklıkları ve süreleri....	22
Tablo 9. MEG3 geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması.....	24
Tablo 10. NRF2 geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması.....	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. MSS'nin anatomik kısımlarını göstermektedir.	4
Şekil 2. Real-Time PCR’da hidroliz problemlerinin çalışma prensibi	15
Şekil 3. Gerçek zamanlı PCR’nin fazları.	16
Şekil 4. MEG3 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu.....	23
Şekil 5. BCL2 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu.....	24
Şekil 6. NRF2 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu.....	25
Şekil 7. β -actin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu.....	26

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin tümörlerini iki ana gruba ayırabiliriz; ‘Metastatik Beyin Tümörleri (MBT)’ ve ‘Primer Beyin Tümörleri (PBT)’. Beyin dokusu dışındaki bir dokudan köken almış ve intrakraniyal bölgeye yayılım göstermiş tümörlere MBT denir. Beynin kendi hücrelerinden köken alan tümörlere ise PBT denir. Normal beyin dokusunu oluşturan hücre grupları arasında; glial hücreler, nöronal hücreler, menengial hücreler ve schwann hücreleri başlıca hücrelerdir. Glial hücre grubu içerisinde merkezi sinir sistemi (MSS) destek hücreleri olan astrositler ve oligodendrositler; MSS boşluklarını çevreleyen ependim hücreleri sayılabilir. Menengial hücreler MSS etrafını saran zarları oluşturan hücrelerdir. Dünya Sağlık Örgütü 2007 yılında PBT’ni dördüncü kez sınıflandırmıştır (1). Dünya Sağlık Örgütü 2016 yılında beyin tümörlerini yeniden sınıflandırmıştır olup Dünya Sağlık Örgütü merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerini 7 farklı alt grupta sınıflandırılmıştır (2).

DSÖ’nün 2012 yılı verilerine göre Dünya’da 14,1 milyon kişi yeni kanser tanısı almıştır, 8,2 milyon kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. 32,6 milyon kişi kanser ile yaşamaktadır (3). İstatistiksel analizler ışığında 2030 yılında toplam 22 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde ortalama 300 milyonluk bir nüfusta her yıl yaklaşık 24 000 yeni PMT tanısı konmaktadır. Türkiye’de ise kesin bir rakam verilememekle birlikte benzer olduğu sanılmaktadır (4).

Maternal eksprese edilmiş gen 3 (MEG3) , bir uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA) birçok normal dokularda ifade edilmektedir. Bununla birlikte, MEG3 ekspresyonunu, primer insan tümörlerinde kaybolur ve promotör hipermetilasyonu ya intergenik diferansiyel metile bölgenin hipermetilasyonu beyin tümörleri MEG3 ifade

kaybına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (5,6). MEG3 bir tümör baskılayıcı gen olarak temsil edilir ve ektopik ifade hücre proliferasyonu'nu engeller, insan glioma hücre hatlarında apoptozu teşvik edebilir (7). Ayrıca, p53 (TP53), protein birikimi ve hedef gen ekspresyonu, kısmen MEG3 ile uyarılan hücre büyümesi engellenmesine katkıda bulunur (8). Birçok deneysel kanıtlar, bu genin lncRNA tümör supresör olduğunu göstermektedir. MEG3 RNA ekspresyonu insan hipofiz tümörleri ve diğer kanser hücre hatlarında kaybolur ve kanser hücresi büyümesini bastırır, p53 aracılı transkripsiyonel aktivasyonu uyarılır ve seçici p53 hedef genleri, aktive olan MEG3 yüksek normal insan beyinde eksprese edilir.

NRF2 geni, temel lösin fermuar (bZIP) küçük bir protein ailesinin bir üyesi olan transkripsiyon faktörünü kodlar. Kodlanmış transkripsiyon faktörü, antioksidan tepki elemanları (ARE) ihtiva genleri düzenler. Bu genlerin bir çoğu, serbest radikallerin üretilmesini içerir. Farklı izoform kodlayan birden fazla transkript varyantları, bu gen için karakterize edilmiştir. Nükleer eritroid 2 ile ilgili bir faktör 2 (Nrf2) antioksidan yanıt elemanları aracılı gen ifade merkezi düzenleyicisidir (9-12).

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi üyeleri hücre ölümünün önemli regülâtörleridir. Bu ailede hem apoptotik hem antiapoptotik üyeler bulunmaktadır. Bcl-2 proteini antiapoptotik proteinlerdendir ve mitokondrinin dış membranı, nükleus membranı ve endoplazmik retikulum membranında lokalizedir. Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomada klonlanmış bir onkogendir. Aşırı sentezi apoptosisi engelleyerek lenfomaya neden olmaktadır. Lenfoma ve lösemiler yanında barsak, meme, akciğer ve deri kanserinde de aşırı sentezi gösterilmiştir (13).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SINIR SİSTEMİ

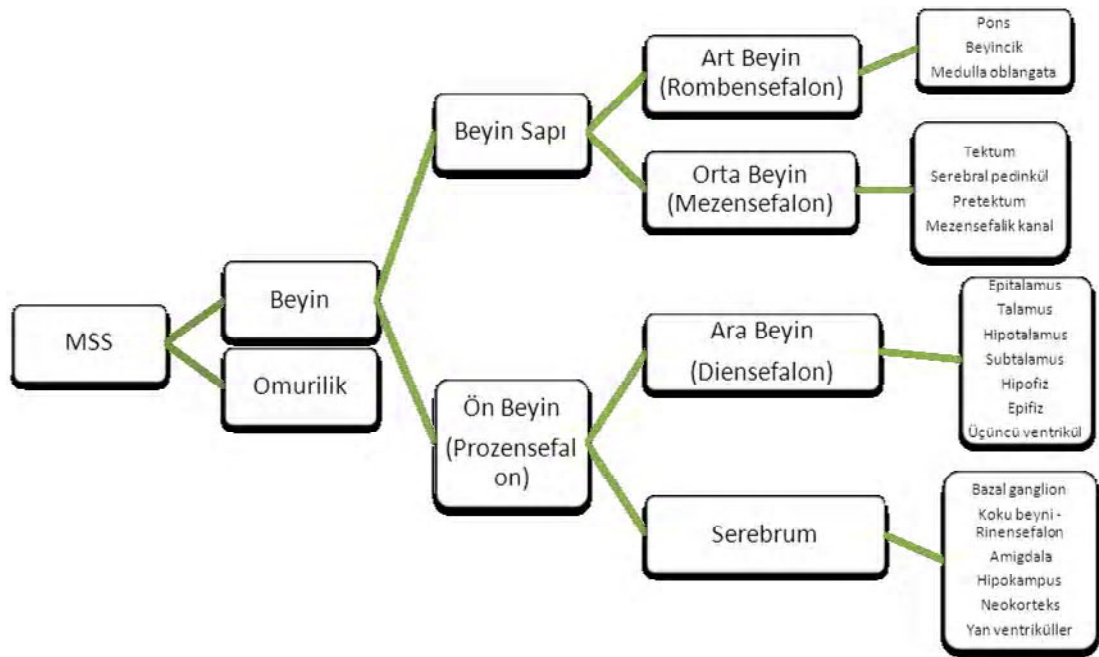
Sinir sistemi veya sinir ağı, canlıların içsel ve dışsal çevresini algılamasına yol açan, bilgi elde eden ve elde edilen bilgiyi işleyen, vücut içerisinde hücreler ağı sayesinde sinyallerin farklı bölgelere iletimini sağlayan, organların, kasların aktivitelerini düzenleyen bir organ sistemidir. Bu sistem 2 kısma ayrılır; Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ve Çevresel Sinir Sistemi (ÇSS). ÇSS tüm vücudu sinir hücresi ile sarar ve MSS vücudun diğer kısımları ile iletişimini sağlar. ÇSS, motor nöronları, dolaylı istemli hareket, otonom sinir sistemi, sempatik sinir sistemi, parasempatik sinir sistemi, düzenli istemsiz işlevler ve enterik sinir sisteminden oluşur.

2.1.1. Merkezi sinir sistemi anatomisi

MSS beyin ve omurilikten meydana gelir. Beyin kafatası, omurilik ise omurgalar tarafından sarılmıştır. Her iki organ da bu korunaklı yapının içerisinde Beyin-Omurilik Sıvısı'nın (BOS) içerisinde yüzmektedir. MSS anatomik yapısı Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir.

2.1.2. Merkezi sinir sisteminin embriyolojik gelişimi

Sinir sistemi ektoderm yaprağından köken alır. Gelişimin 3. haftasında notokord, üzerindeki ektodermi uyararak nöral plak oluşumunu sağlar. Daha sonra nöral oluk oluşur. Bu oluk zamanla nöral tüp denen yapıyı meydana getirir. Beyin ve omurilik bu nöral tüpten meydana gelir.



Şekil 1. Merkezi Sinir Sistemi'nin anatomik kısımları

2.1.3. Merkezi sinir sistemi histolojisi

Beyin dokusundan koronal bir kesit alındığında makroskopik olarak 2 farklı yapı görülür. Dış kısımda hücrelerin gövdelerinin bulunduğu gri cevher ve iç kısımda hücre aksonlarının bulunduğu beyaz cevher bulunur.

Mikroskopik olarak incelendiğinde beyin dokusunda farklı hücre tipleri gözlenebilir. Fakat bu hücreleri 2 temel gruba ayırabiliriz; nöronlar ve glia hücreleri

Nöronlar

Nöron sinir sisteminin temel fonksiyonel birimidir. Başlıca işlevi bilgi transferini gerçekleştirmektir. İnsan sinir sisteminde yaklaşık olarak 100 milyar üzerinde nöron olduğu tahmin edilmektedir. Normal bir sinir hücresi 50.000-250.000 kadar başka nöronla bağlantılıdır. Yaptıkları özelleşmiş işlere bağlı olarak farklı şekillerde ve çeşitlerde olabilirler (61).

Glia Hücreleri

Glia hücreleri nöronlar dışındaki beyin hücrelerinin genel adıdır. Mikroglia ve makroglia olmak üzere 2 gruba ayrılır ; Mikroglia ve Makroglialar

(a) Mikroglia

İmmün sistem hücreleri olan makrofajların beyin dokusundaki özelleşmiş tipidir. Köken aldığı hücre tipi ile aynı işlevi sinir sisteminde yerine getirmektedir. MSS'nin her yerinde bulunurlar. Diğer beyin hücrelerinden daha küçüktürler. Bu nedenle mikroglia olarak isimlendirilmiştir. En küçük glial hücrelerdir (61).

Makroglialar

Büyük yapıli glia hücreleridir. Farklı işlevleri olan 7 farklı tip makroglia mevcuttur.

1. Astrositler

Nöronları destekleyen başlıca glia hücreleridir. Yıldız şeklindedir. Nöronların büyümesinde görev alırlar. Damarların dış çeperlerine gönderdikleri uzantılar yoluyla damarsal geçirgenliğı düzenler ve çevresel ortam konsantrasyonunu ayarlarlar. Nöronlarda çoğalma oldukça sınırlı iken , astrositler ömür boyunca hızlı bir şekilde çoğalabilirler. Beyinde eğer ki bir tahribat meydana gelirse, astrositler o bölgede hızla çoğalarak bu tahribat sonucu oluşan boşluğu doldururlar (61).

2. Oligodendrositler

Az sayıda uzantılı hücrelerdir. Uzantıları ile nöron hücrelerinin aksonlarını sararlar. Bu sayede miyelin kılıf denen yapıyı oluştururlar. Bu kılıf nöron hücrelerinin iletim hızını artırır. Sadece MSS'de bulunurlar (61).

3. Ependimal hücreler

Beyinde bulunan iç boşlukları, yani ventrikülleri örterler, duvar yapısını oluştururlar. Beyin ve omurilik içi boşlukları dolduran beyin-omurilik sıvısı (BOS) dediğimiz sıvıyı salgılamakla yükümlü koroid pleksus adı verilen yapıyla Merkezi Sinir Sistemi arasındaki ilişkiyi sağlarlar. Ependimal hücreler sıvı ile temastadır. Kan-Beyin bariyerinin oluşumuna katılırlar. Sadece MSS'de bulunurlar (61).

4. Radyal Glialar

Nörogenez, yani sinir üretiminin başlangıcında görülen gliya tipidir. Diğer sinir hücrelerine göre farklılaşmaları çok daha sınırlıdır. Beynin ve sinir sisteminin gelişimi sırasında farklılaşan sinir hücrelerinin yerlerine taşınmasında görev alırlar. Yetişkin bir sinir sisteminde ise sadece beyincikte ve gözümüzde bulunan retina tabakasında

bulunurlar. Beynin plastisite gibi değişken özelliklerini düzenler ve onlara katkı sağlarlar (61).

5. Schwann Hücreleri

Diğer sinir hücrelerinin aksine sadece Çevresel Sinir Sistemi'nde bulunurlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde görev almazlar. Schwann hücreleri ÇSS'nin glial hücreleridir. Görevleri aksonları çevrelemektir . Aksonları sararak miyelin kılıfı üretirler. Ayrıca nöronların büyümesi sırasında ortaya çıkan artık maddeleri temizlemekle görevlidirler (61).

6. Uydu Hücreler

Duyusal, simpatik ve parasimptik sistemlerde (bunlara ileride girilecektir) nöronları sararlar. Oldukça küçük hücrelerdir. Nöronun dış kimyasal ortamını düzenleyici görevleri vardır. Hasara ve iltihaplanmaya karşı aşırı hassastırlar ve hemen müdahale ederler. Sadece ÇSS'de bulunurlar (61).

7. Enterik Glialar

Sindirim sistemi için çalışan nöronların oluşturduğu öbeklerde bulunurlar. İç dengenin sağlanması konusunda önemli görevleri vardır. Bunlar sadece Çevresel Sinir Sistemi'nde bulunurlar (61).

2.2. BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin tümörlerini “Metastatik Beyin Tümörleri (MBT)” ve “Primer Beyin Tümörleri, (PBT)” olmak üzere 2 ana gruba ayırabiliriz. MBT, beyin dokusu dışındaki bir dokudan köken almış ve intrakraniyal bölgeye yayılım göstermiş tümörlere denir. PBT ise beynin kendi hücrelerinden köken alan tümörlerdir. Beyin dokusunda bulunan temel hücre tiplerinden yukarıda bahsedilmiştir.

2.2.1. Sınıflandırma

Beyin tümörleri ilk olarak 1829'da Cruveilhier tarafından makroskopik olarak tanımlanmış, sonra 1836'da Bressler tarafından makroskopik olarak tekrar sınıflandırılmışlardır. İlk kez “glioma” tarifi makroskopik ve mikroskopik özelliklerinden yararlanarak Virchow tarafından yapılmıştır . Daha sonra , Dünya Sağlık Örgütü 2016 yılında beyin tümörlerini yeniden sınıflandırmıştır (14). Bu sınıflandırma Tablo 1'de belirtilmiştir.

2.2.2. Evreleme

Histolojik evrelemenin amacı, bir tümörün biyolojik davranışını tahmin edebilmektir. Klinik uygulamada, bu evreleme sayesinde tedavi stratejileri belirlenmektedir. Evreleme, özellikle radyoterapi ve kemoterapi stratejilerinin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Daha öncede histolojik sınıflandırmalar yapılmış olmasına rağmen (15) DSÖ'nün 2016 yılında yaptığı sınıflama ayrıca geniş bir evreleme skalası da sunmaktadır. Sınıflara ayrılmış bazı tümörlerin literatürdeki vaka sayıları çok düşük olduğu için evrelemeye uygun değildir. PBT'nin evrelemesi Tablo 1'de verilmiştir.

Evre I tümörler düşük proliferatif potansiyele sahip tümörlerdir ve tedavi cerrahi rezeksiyon yeterli olmaktadır. Evre II tümörler düşük proliferatif potansiyele sahip olmalarına rağmen infiltratif özellik gösterirler ve nüksetmeye meyillidirler. Örnek olarak diffüz astrositom, anaplastik astrositoma ya da glioblastomaya dönüşebilir. Benzer dönüşüm oligodendrogliom ve oligoastrocitomda da görülebilir. Evre III tümörler histolojik olarak malign özelliklere sahiptir. Hücrel atipi ve aktif mitotik aktiviteye sahiptir. Tedavi için adjuvan kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanmaktadır. Tümörün boyutu, özellikleri ve yayılımına bakarak koruyucu tedavi olarak uygulanan yöntemlerle (kemoterapi, hormon tedavisi, akıllı ilaç ve radyoterapi tedavileri), kanserin yenilenme ihtimalini azaltmayı hedefler.

Evre IV tümörlerde sitolojik malignensi ve yer yer nekroz odakları mevcuttur. Yoğun mitotik aktivite vardır. Glioblastoma ve embriyonal tümörler evre IV tümörlerin örnekleridir.

Evreleme sistemi hastaların sağ kalım süreleri ile ilgili ön bilgi verebilmesine rağmen hastanın yaşı, klinik bulguları, nörolojik durumu, tümörün yerleşimi, tümörün radyolojik özellikleri (kontrast tutup tutmaması), cerrahi rezeksiyon yapılması, proliferasyon indisi gibi değişkenler ile beraber değerlendirilerek daha sağlıklı bir sağ kalım süresi öngörülebilir. Evre II hastaların ortalama sağ kalım süreleri 5 yıldan fazla iken, evre III hastaların ortalama sağ kalım süreleri 2 – 3 yıldır. Evre IV hastaların sağ kalım süreleri tedavi imkanları ile yüksek oranda ilişkili olmasının yanında glioblastoma hastalarının çoğu, özellikle yaşlı olanlar, ilk bir yıl içerisinde hastalığa yenik düşmektedir. Radyoterapi ve kemoterapi varlığında 5 yıllık sağ kalım oranları %60 – 80'e bulabilmektedir (1).

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü Beyin tümörleri sınıflandırması

WHO grades of select CNS tumours			
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours			
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Papillary glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Central neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	Cerebellar liponeurocytoma	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III		
Other astrocytic tumours		Tumours of the pineal region	
Pilocytic astrocytoma	I	Pineocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	Pineoblastoma	IV
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	Papillary tumour of the pineal region	II or III
Ependymal tumours		Embryonal tumours	
Subependymoma	I	Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Myxopapillary ependymoma	I	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Ependymoma	II	Medulloepithelioma	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Anaplastic ependymoma	III	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
Other gliomas		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV
Angiocentric glioma	I	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Chordoid glioma of third ventricle	II	Schwannoma	I
Choroid plexus tumours		Neurofibroma	I
Choroid plexus papilloma	I	Perineurioma	I
Atypical choroid plexus papilloma	II	Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Choroid plexus carcinoma	III	Meningiomas	
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours		Meningioma	I
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	Atypical meningioma	II
Gangliocytoma	I	Anaplastic (malignant) meningioma	III
Ganglioglioma	I	Mesenchymal, non-meningothelial tumours	
Anaplastic ganglioglioma	III	Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	Haemangioblastoma	I
		Tumours of the sellar region	
		Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituitaryoma	I
		Spindle cell oncocyoma	I

2.2.3. Epidemiyoloji

Genel kanser verilerine bakıldığında, 1992 – 2007 yıllarının geriye dönük olarak tarandığı geniş çaplı bir araştırmada kanser insidansının 2003 – 2007 yılları arasında yıllık % 0,8 azalma gösterdiği tespit edildi. Buna rağmen çocuk yaş gurubunda (0 – 19 yaş) kanser insidansı 2003 – 2007 ve 1992 – 2007 yılları arasında yıllık % 0,6 artış gösterdiği tespit edildi.

PBT açısından bakıldığında 2003 – 2007 yılları arasında insidansın erkeklerde azalma eğiliminde olduğu, kadınlarda ise stabil kaldığı görüldü. Mortalite oranlarına bakıldığında her iki cinsiyette de azalma olduğu tespit edildi (16). Bu gerilemede etkili bir kaç faktör sayılabilir. Etiyolojide rol alan faktörlerin belirlenmesi ve bunlara yönelik önlemler alınması ya da tedaviler uygulanması bunlardan biridir. Özellikle AIDS hastalarında görülen MSS lenfomalarının AIDS'e karşı geliştirilen güçlü antiviral ilaçlar sayesinde insidansı azalmıştır (16). İleri görüntüleme yöntemleri ve tümör markırlarının

kullanımının artması ile erken tanı olanakları artmıştır. Bu sayede erken tanı ve tedavi olanakları doğmuştur. Gelişen cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olanakları da tümör mortaliteleri üzerine olumlu etkiler sağlamıştır (61).

Erişkin yaş grubunda (>19 yaş) benign PBT, malign olanlardan 2 kat daha fazla görülmektedir. Kadınlardaki yüz binde 26,55 PBT insidansına karşılık erkeklerde yüz binde 22,37'dir. Malign tümörler arasında en sık görülen histolojik tip nöroepitelyal doku tümörleridir ve erkeklerde daha sık görülür. Glioblastoma nöroepitelyal tümörlerin en sık görülen alt tipidir ve erkeklerde kadınlara oranla 1,6 kez daha sık görülür. En sık görülen benign PBT meninjioma'dır. Kadınlarda 2,3 kat daha sık görülür. Kadınlardaki insidansı yüz binde 12,42 iken erkeklerde yüz binde 5,46'dır. Nöroepitelyal tümörlerin malign olma olasılığı %94,9 iken meninjiomaların malign olma olasılığı sadece %2,1'dir (16).

Çocuk yaş grubunda PBT insidansı erişkinlere göre çok düşüktür. İnsidansı milyonda 48,47'dir. Fakat çocuk yaş grubundaki tümörler malign olmaya daha yatkındırlar. Çocuk yaş grubunda görülen tümörlerin %65,2'si malign iken bu oran erişkin yaş grubunda %33,7'dir. Nöroepitelyal doku tümörlerinin insidansı erkeklerde hafif artmış olsa da erişkin yaş grubundaki kadar yüksek değildir (Erkeklerde milyonda 35,2 vs kadınlarda milyonda 32,62). Meningeal tümörler çocuklarda malign olmaya daha eğilimlidir ve insidans her iki cinsiyette de benzerdir. Ayrıca erişkinlerde nöroepitelyal doku tümörleri malign olma eğilimi gösterirken, çocuk yaş grubunda germ hücreli tümörler daha malign seyrederek (16).

2.3.MEG3 GENİ VE FONKSİYONU

Maternal eksprese edilen MEG3 geni, insanlardaki kromozom 14q32.3'de bulunan baskılanmış DLK1-MEG3 loküsüne ait bir baskılanmış gendir. Fare ortologu, aynı zamanda gen kapanı yer 2 (Gtl2) olarak da bilinen Meg3, 12. kromozomun distalinde bulunur. MEG3 geni on ekzondan oluşur. İnsan maternal olarak eksprese edilen gen 3 (MEG3) ~ 1,6 kb'lik bir uzunluğa sahip mRNA benzeri RNA'dır. MEG3 geni kodlamayan uzun bir RNA'yı (lncRNA) kodlar ve birçok normal dokuda eksprese edilir. Bununla birlikte MEG3 ekspresyonunu, primer insan tümörlerinin birçoğunda genişleyen bir listede ifade olmaz ve promotör hipermetilasyonu ya intergenik diferansiyel metile bölgenin hipermetilasyonu tümörlerde MEG3'ün ifade kaybına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (17,18).

MEG3 bir tümör baskılayıcı gen olarak görev yapar ve ektopik ifade hücre proliferasyonu'nu engeller. İnsan glioma hücre hatlarında apoptozu teşvik edebilir (19). Ayrıca, p53 (TP53) protein birikimi ve hedef genin ekspresyonu kısmen MEG3 ile uyarılan hücre proliferasyonunun engellenmesine katkıda bulunur (20). Bir çok deneysel çalışmalar, bu genin kodlayan tümör supresör olduğunu göstermektedir. MEG3 fonksiyonel proteinleri kodlamayan RNA gibi davranır. MEG3 RNA'nın katlanması ve işlevinde önemli bir rol oynamaktadır. MEG3'ün geçici ifadesi p53'ü aktive eder ve P53, hedef geni GDF15'in ekspresyonunu uyarır. Bununla birlikte, MEG3, p53'ün yokluğunda hücre proliferasyonunu inhibe edebilir. MEG3 ekspresyonunun kaybının tümör gelişimine katkıda bulunduğunu ileri sürülmektedir. MEG3 ekspresyonu epigenetik kontrol altındadır (21-39) .

2.4.NRF2 GENİ VE FONKSİYONU

Bu gen, temel lösin fermuar (bZIP) protein ailesinin bir üyesi olan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Kodlanmış transkripsiyon faktörü, antioksidan tepki elemanları (ARE) ihtiva eden genleri düzenler; Bu genlerin bir çoğu, serbest radikallerin üretilmesini içerir. Farklı genler tarafından kullanılan, genel aktiviteleri aynı olan çeşitli formları kodlayan birden fazla transkript varyantları, bu gen için karakterize edilmiştir. Nükleer eritroid 2 ile ilgili bir faktör 2 (Nrf2) antioksidan yanıt elemanları aracılı genlerin düzenleyicisidir. Bu koruyucu olduğu amaçlı aşağı akış hedefleri çeşitli ekspresyonunu indükler antioksidan yanıt elemanı ile etkileşerek oksidatif strese adaptif tepkilerde önemli bir role sahiptir (40-43).

Nükleer eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) yüksek bir transkripsiyon faktörü Oksidatif strese duyarlılık, çekirdeğin ARE'lerine bağlanır ve transkripsiyonunu destekler. Nrf2, Keap1'in bitişiğindeki hücre iskeletinde bulunur. Nrf2, bir lösin fermuar / CNC proteini, bir polipeptiddir. 66 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahiptir ve yaygın şekilde ifade edilmiştir (44-47). Nrf2 hücre direncinde önemli bir rol oynamaktadır. NRF2 akciğer kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan dokularında yaygın olarak ifade edilir (48-54).

2.5.BCL2 GENİ VE FONKSİYONU

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi üyeleri hücre ölümünün önemli regülatörleridirler. Bu ailede hem apoptotik hem antiapoptotik üyeler bulunmaktadır. Bcl-2 proteini antiapoptotik proteinlerdendir ve mitokondrinin dış membranı, nükleus membranı ve endoplazmik retikulum membranında lokalizedir.

Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomada klonlanmış bir onkogendir. Aşırı sentezi apoptosisi engelleyerek lenfomaya neden olmaktadır. Lenfoma ve lösemiler yanında barsak, meme, akciğer ve deri kanserinde de aşırı sentezi gösterilmiştir (13).

Çalışmamızda Primer beyin tümörlerinin etiyolojisinde sorumlu olabilecek genleri (BCL-2, MEG-3 ve NRF2) tespit edilmesi amaçlandı. Bu genlerin tespit edilmesinin, ileri ki dönemlerde primer beyin tümörlerinin tanısında, tedavisinde veya prognozunda etkili olabileceği düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TÜRÜ

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu araştırma Ocak 2016 Temmuz 2016 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nın ortak çalışması ile gerçekleştirildi. Laboratuvar işlemleri Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.3. ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLEN GRUPLAR

Bu çalışmada hasta ve kontrol olmak üzere iki grup kullanıldı.

3.3.1. Hasta grubu

Erciyes Üniversitesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'na başvurmuş ve beyinde tümör olduğu saptanmış olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Ameliyata uygun görülen hastalardan ameliyat sonrası, uygun olmayan hastalardan otopsi sonrasında tümör dokuları eksize edilip Erciyes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiştir. Gönderilen materyallerin parafin bloğa gömülerek incelenmesi sonrasında Primer Beyin Tümörü (Grade 2 , grade 3 ya da grade 4 astrositom) olarak tanı konulmuştur. Yukarıdaki özellikleri taşıyan hastalar bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya 50 adet hasta dahil edilmiş olup , bunlardan 7 hastanın parafin bloklarından elde edilen materyaller analiz için uygun olmadığından çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu nedenle, çalışma 43 hasta ile tamamlanmıştır.

3.3.2. Kontrol grubu

Beyin tümörü ile ilgisi olmayan farklı bir nedenle ölen kişiler çalışmamızda kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu bireylerden otopsi sırasında normal beyin dokusu alındı ve parafin bloğa gömüldü.

Çalışmaya 25 adet kontrol grubu hastası dahil edilmiş fakat çalışmadan dolayı 23 kontrol grubu ile tamamlanmıştır.

3.4. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.4.1. Demirbaş Malzemeler

- Buzdolabı (+4 °C Hotpoint Ariston)
- Derin Dondurucu (-20 °C Beko)
- Mikropipet seti (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
- Vorteks (IKA Vortex Genius 3)
- Real Time PCR cihazı (LightCycler 480 II - Roche Diagnostics GmbH)
- Blok ısıtıcı (HLC)
- PCR cihazı (Thermal cycler) (Labcycler - SensoQuest GmbH)
- PCR cihazı (Thermal cycler) (T100™ Thermal Cycler - Bio-Rad)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- Mini Santrifüj/Vorteks (Combi-Spin FVL-2400N – Biosan)

3.4.2. Sarf Malzemeler

Ekspresyon analizi için gerekli sarf malzemeler

Parafin dokudan RNA izolasyon kiti

High Pure FFPE RNA Isolation Kit(Roche)

cDNA sentez kiti

İpsogen RT Kit, (Qiagen)

İlgili genlere göre dizayn edilmiş primerler ve problemler

RealTime ready Catalog Assays (Roche)

RealTime ready Designer Assays(Roche)

Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Prob mastır miks

LightCycler 480 Probes Master (Roche)

Light Cycler 480 cihazı ile uyumlu plate

LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche)

3.5. YÖNTEMLER

3.5.1. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) oligonükleotid primerler kullanarak DNA'nın ilgilendiğimiz bölgesinin *in vitro* ortamda çok sayıda kopyasını oluşturmaya yarayan reaksiyonlar bütünüdür. PCR yöntemi denatürasyon (tek iplikli DNA dönüşümü), bağlanma (annealing – primerlerin DNA'ya bağlanması) ve uzama (DNA polimeraz sayesinde yeni DNA ipliğinin oluşması) aşamalarından oluşan tekrarlayan termal döngü temeline dayanmaktadır. Konvansiyonel PCR'da ürünler ancak PCR işlemi sonlandıktan sonra değerlendirilebilir. Real-Time PCR'da ise diziye spesifik ya da diziden bağımsız floresan problemler ve boyalar kullanılarak PCR çoğaltımı gerçek zamanlı olarak gözlemlenir (55).

Real Time-PCR'da kullanılan prob sistemleri ve boyalar

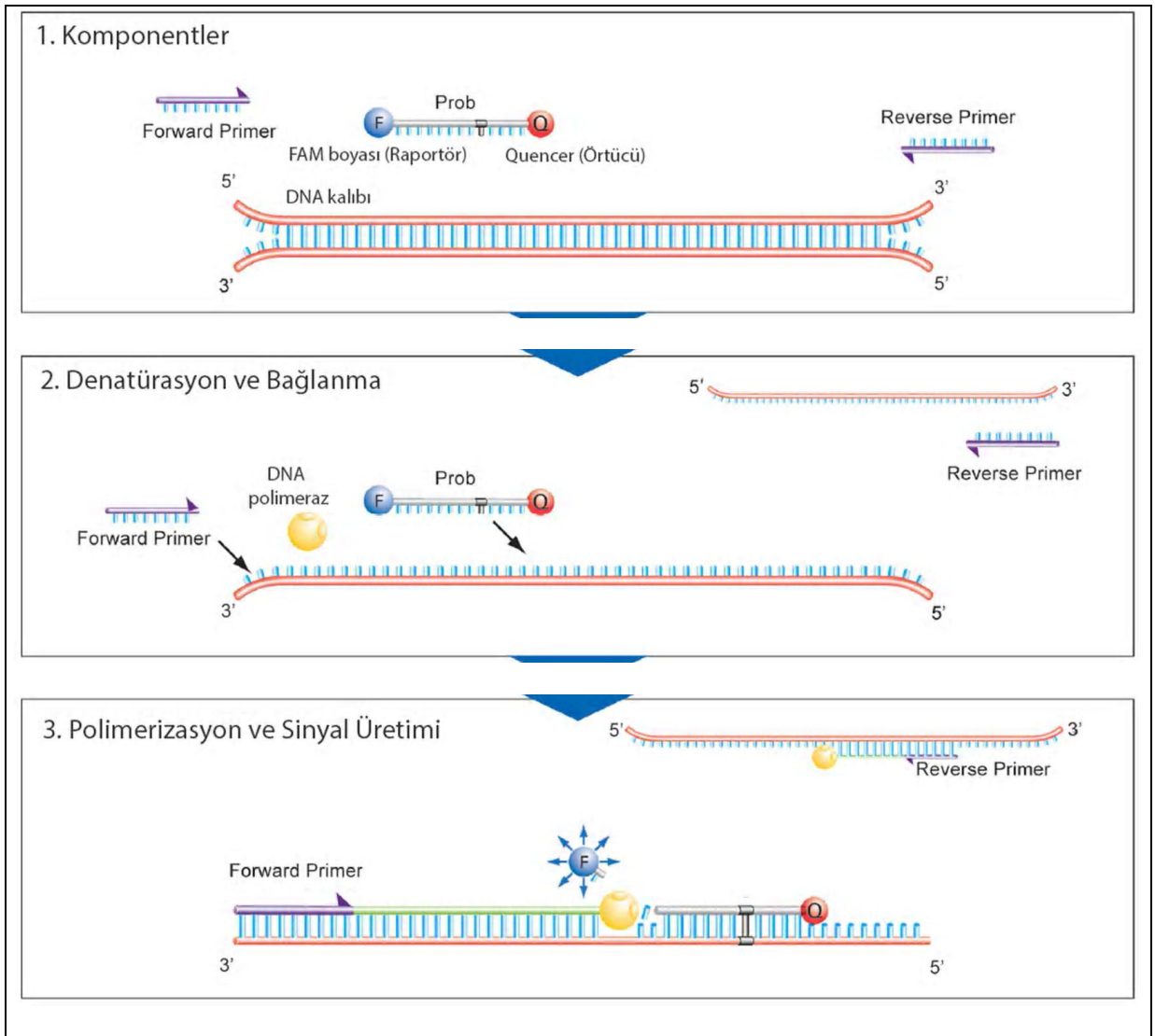
A. Dizi-Bağımlı saptama yöntemleri

- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Taqman
- Molecular Beacons
- Scorpion Primerleri
- Hibridizasyon Problemleri

B. Dizi Bağımsız saptama yöntemleri

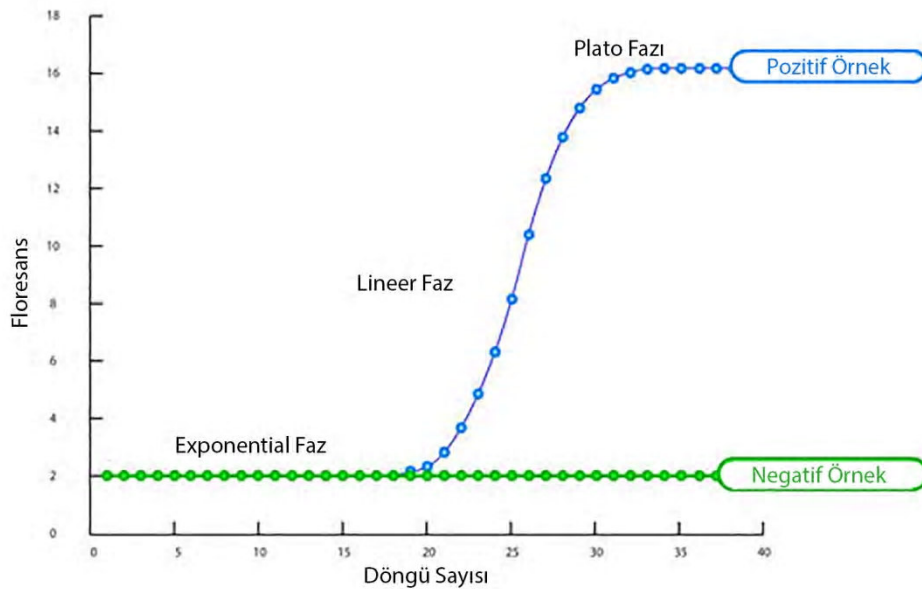
- Syber Green I
- Etidyum Bromid

Bizim çalışmamızda da hidroliz (Taqman) prob tibi kullanıldı. Hidroliz problemleri ile RT-PCR uygulaması sırasında sekans spesifik PCR primerlerine ek olarak floresan işaretlenmiş oligonükleotid bir prob kullanılır. Bu probun özelliği 5' ucunda "Reporter" ve 3' ucunda "Quencher" bulunmasıdır. Bu prob spesifik bölgesine bağlı olmadığı zaman ışıma verecek olan raporör ucunun ışıması, örtücü (quencher) uç tarafından bloklanır. Bu prob PCR'ın annealing aşamasında spesifik olduğu bölgeye yapışır. Uzama aşamasında 5' ekzonükleaz aktivitesi olan ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq, Tth) tarafından prob DNA dan uzaklaştırılmaya başlar. Öncelikle 5' ucundaki raporör bölge uzaklaştırıldığı için örtücü bölgeden uzaklaşır ve ışıma verir (Şekil 2).



Şekil 2. Real-Time PCR'da hidroliz problemlerinin çalışma prensibi

PCR amplifikasyon eğrilerinde eksponansiyel, lineer ve plato fazı olmak üzere 3 faz gözlenir (Şekil 3). Eksponansiyel fazda reaksiyon verimi tamdır, ürünler geometrik olarak artar. Real-Time PCR’da değerlendirmeler bu fazda yapılır. Lineer fazda reaksiyon bileşenleri tükenmeye başlar ve reaksiyon yavaşlar. Plato fazında ise reaktifler artık tükenmiştir, ürün yapımı durur (56). Real-Time PCR’da pozitif reaksiyon floresan sinyallerinin birikimi ile saptanır. Ct (Cycle threshold / Eşik döngü) değeri bu floresan sinyallerin eşik seviyeyi aştığı döngü sayısıdır. Ct değeri ile hedef nükleik asit miktarı arasında ters orantı vardır. Düşük Ct değerleri örnekte daha yüksek miktardaki hedef nükleik asit varlığını ifade eder (55).



Şekil 3. Gerçek zamanlı PCR'nin fazları.

Uygulama Prosedürleri

Parafin Dokudan RNA izolasyonu

Deparafinizasyon

- 2 ml'lik ependorf tüpüne 10 µm kalınlıktaki 100 mm² alana sahip parafin doku koyuldu.Üzerine 1000 µl ksilen eklenip vortekslendi.
- 37°C 'de 20 dk inkübasyon gerçekleştirilir.
- 16000xg hızında 5 dakika santrifüj yapıldı. Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı. Çökme gerçekleşene kadar bu işleme devam edildi.

- Bu işlem üç kez tekrar edildi.
- 1000 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- Bu işlemin ardından 37°C 'de 30 dk inkübasyon gerçekleştirildi.
- 16000xg hızında 2 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlem üç kez tekrar edildi.
- Pellet oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakıldı ve alkolden uzaklaştırıldı.

RNA İzolasyonu

- Deparafinizasyon aşaması sonrasında ,
- Elde edilen pelletin üzerine 100 µl RNA tissue lysis buffer ,16 µl %10'luk SDS , 40 µl Proteinaz K eklendi daha sonra vortekslendi.
- Tüplerin ağzı iyice parafinlendi. 30 dakika 85°C'de inkübe edildi.
- Daha sonra 80 µl Proteinaz K ve 1µl glikojen eklendi sonra vortekslendi . Ardından 55°C'de 40 inkübe edildi.
- Karışımın üzerine daha sonra 325 µl RNA binding buffer, 325 µl %100'lük etanol eklendi. Sırasıyla kısa vorteks ve kısa santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpüne filtre tüpü yerleştirildi. Hazırlanan karışım filtre tüpünün içine alındı. 6000g 1dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü değiştirildi. 14000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü değiştirildi. 100 µl DNase working solution eklendi. 15°C - 25°C arasında 15 dakika bekletildi.
- 500 µl wash buffer 1 eklenip 6000g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- 500 µl wash buffer 2 eklenip 6000xg'de 1 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- Yeniden 500 µl wash buffer 2 eklenip 6000xg'de 1 saniye santrifüj edildi ve membranın tamamen kuruması için 16000g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Filtre tüpü 1.5 ml'lik tüpe yerleştirildi. 25-50µl RNA elution buffer eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

- 6000xg'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Filtre tüpü atıldı.
- Ürün -20 °C'de muhafaza edildi.

cDNA sentezi

- cDNA sentezi Ipsogen RT Kiti (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır.
- RNA konsantrasyonlarına göre her bir hasta için kullanılacak RNA miktarları ayrı ayrı belirlendi. Belirlenen miktarlar 150 µl'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı.
- RNA örnekleri 65°C'de 10 dakika beklemesi için termal cycler cihazına koyuldu.
- Kit içeriğindeki ürünler (RNase inhibitör ve Reverse transkriptaz hariç) buz üzerinde çözölmeye bırakıldı. Vortekslenip kısa santrifüj yapıldı.
- RNase inhibitör ve Reverse transkriptaz kullanılacağı zaman buz üzerine çıkarılmasına özen gösterildi.
- Tablo 2'deki miktarlara göre karışım hazırlandı.
- Kalıp – primer karışımını içeren tüplere revers transkripsiyon için kalan bileşenler Tablo 3 'daki miktarlarda eklendi.

Tablo2. cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı (1 reaksiyon için)

Bileşenler	Hacim	Final konsantrasyonu
RNA	Değişken	1 µg
Random Hexamer	2 µl	60µM
Primer, 600 pmol/µl		
PCR seviyesi su	Değişken	Toplam hacim 11,4 µl olacak kadar
Toplam hacim	11,4 µl	

Tablo 3. Revers transkripsiyon karışım bileşenleri

Bileşenler	Hacim	Final konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc.	4 µl	1× (8 mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ µl	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	2 µl	1 mM
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µl	10 U
Toplam hacim	8,6 µl	
Final hacim	20 µl	

- cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon tüpleri Tablo 4’de belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre termal cyclers’a kondu.

Tablo 4. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü.

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
29	10
48	60
85	5

- İnkübasyon sonrası örnekler derhal buz üzerine alındı ve -20°C’de saklandı.
- Preamplifikasyon

- Preamplifikasyon işlemi için RealTime ready cDNA Pre-Amp Master kullanıldı.
- Ekspresyon primerleri 1:10 oranında dilüe edildi.
- Tablo 5'e göre Pre-Amp PCR reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 5. Pre-Amplifikasyon PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Her bir örnek için hacim
RealTime ready cDNA Pre-Amp Master	5 µl
Dilüe edilmiş primerler	Her bir primer için 1,4 µl
cDNA	5 µl
PCR seviyesi su	Toplam hacim 25 µl olacak kadar
Toplam hacim	25 µl

- PCR cihazı kullanılarak Tablo 6'deki termal döngü koşulları uygulandı.

Tablo 6. Preamplifikasyon için termal döngü koşulları

	Süre	Sıcaklık
İlk denatürasyon	1 dk	95°C
Preamplifikasyon	15 sn	95°C
(13 döngü)	4 dk	60°C
Soğuma	∞	4°C

- Preamplifikasyon işlemi sonrası ürünler 1:40 oranında dilüe edilerek ekspresyon analizi için kullanıma hazır hale getirildi.

Ekspresyon analizi

▪ Ekspresyon çalışması LightCycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, İsviçre) cihazı ile yapıldı. Analizler LightCycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapıldı. Her örnek iki defa çalışıldı. Her bir çalışmada 2 adet negatif kontrol ve bir kalibratör kullanıldı.

Ürünler aşağıdaki protokole göre hazırlanıp cihaza yüklenmiştir.

- Elde edilen cDNA'lar 1'e 4 oranında sulandırıldı.
- Tablo 7'ye göre karışım hazırlandı. Her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı.

Tablo 7. LightCycler 480 Probes Master PCR karışımı

Ürün	Her bir kuyucuğa eklenecek miktar (ml)
Mastermix (LightCycler 480 Probes Master)	10
Su	4
Prob(RealTime ready Catalog Assays, Roche; RealTime ready Designer Assays, Roche)	1
Toplam Miktar	15

- Sulandırılmış cDNA'lar her kuyucuğa 5'er µl dağıtıldı.
- Plate'in üstü bant ile kapatıldı.
- Plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra plate cihaza yüklendi.
- Lightcycler 480 Software açılarak tablo 8'deki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 8. Lightcycler 480 II software programında ayarlanan sıcaklıklar ve süreler

	Döngü sayısı	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Sıcaklık artış / azalış hızı ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (Saniye)
Preinkübasyon	1	95	4,4	600
		95	4,4	10
Amplifikasyon	45	60	2,2	30
		72	4,4	1
Soğuma	1	40	2,2	30

3.5.2. İstatistiksel analiz

Genlerin ekspresyon düzeyi $\text{mean} \pm \text{SEM}$ olarak gösterilmiştir. Grupların istatistiksel analizleri yapıldı. Hasta grubunda Meg3 geninin ekspresyonu (0.011 ± 0.009), kontrol grubuna (0.342 ± 0.074) göre azalmıştır. Nrf2 geninin ekspresyonu da hasta grubunda , (0.271 ± 0.179) kontrol grubuna (1.416 ± 0.359) göre azalmıştır. Meg3 ve Nrf2 genlerinin ekspresyonu hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark *t-test* ile analiz edilmiş, sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4. BULGULAR

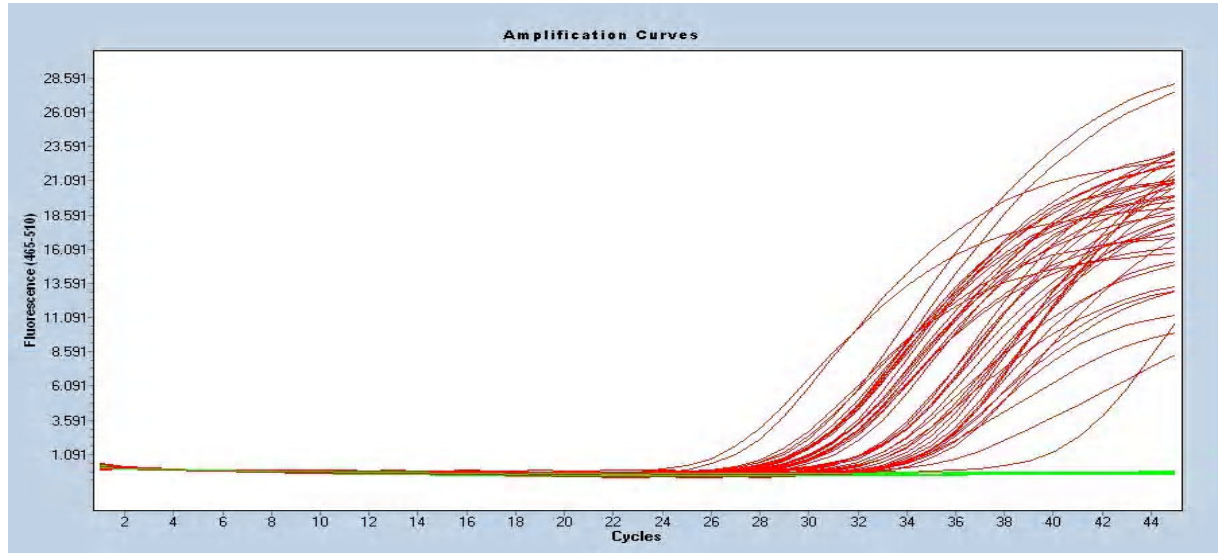
Çalışmaya dahil edilen 68 olgunun 43'ü hasta grubunu, 25'i kontrol grubunu oluşturmaktadır.

4.1. EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLAR

Bu çalışmadaki genlerin mutlak kantitasyonu Lightcycler 480 Software 1.5.0 programında yapıldı. Elde edilen C_t değerleri kullanılarak rölatif kantitasyon yapıldı. Bu aşamada Livak Metodu kullanıldı. Referans gen olarak beta aktin geninin C_t değerlerinin geometrik ortalaması kullanıldı.

4.1.1. MEG3 geni

MEG3 geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C_t eğrileri Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. MEG3 geninin RT-PCR ile elde edilen C_t eğrileri ve mutlak kantifikasyon değerleri

Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki MEG3 geni/ β -Actin mRNA ekspresyon seviyeleri bağımlı örneklem t-testi karşılaştırıldı. Karşılıklı olarak eşleşmeyen (aynı hastanın tümör dokusunda C_t değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnekler istatistiksel analizden

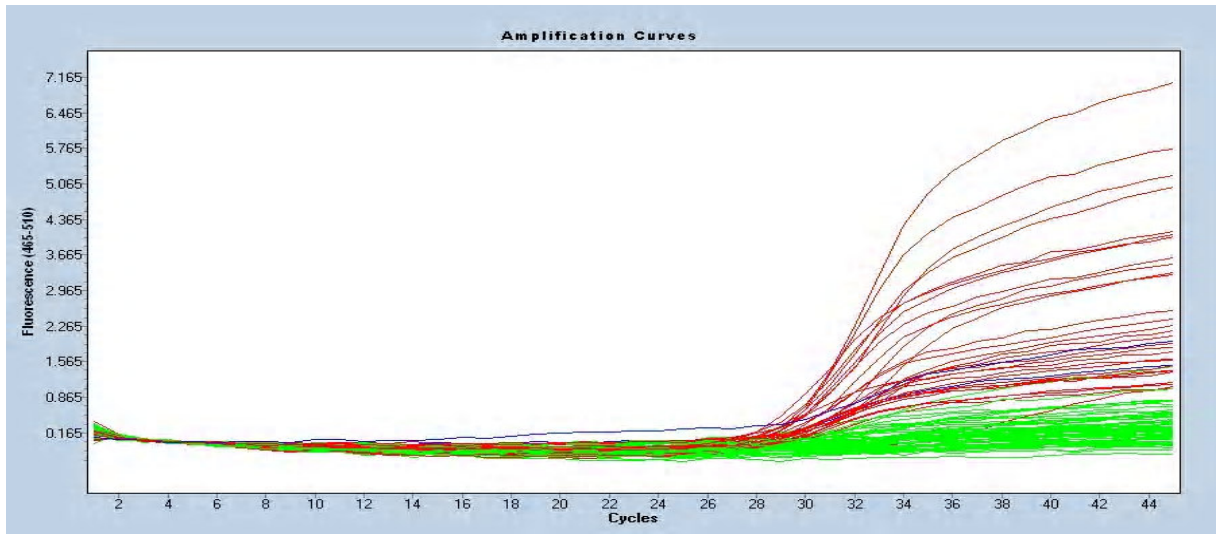
çıkarıldı. Analiz sonuçlarımıza göre ekspresyon düzeyi beyin tümörlü hastaların tümör dokularında kontrol beyin dokularına göre anlamlı olarak azalmıştır. (Tablo 9).

Tablo 9. MEG3 geninin normal dokularda ve tümör dokularında ekspresyonlarının karşılaştırması

Grup sütunu	N	Ortalama	Standart sapma
MEG3geni normal	23	0,3422739	0,35567384
MEG3 geni tümör	45	0,0110112	0,05785452

4.1.2. BCL2 geni

BCL2 geninin Real-Time PCR analizi sonucunda elde edilen Ct eğrileri Şekil 5’de verilmiştir.

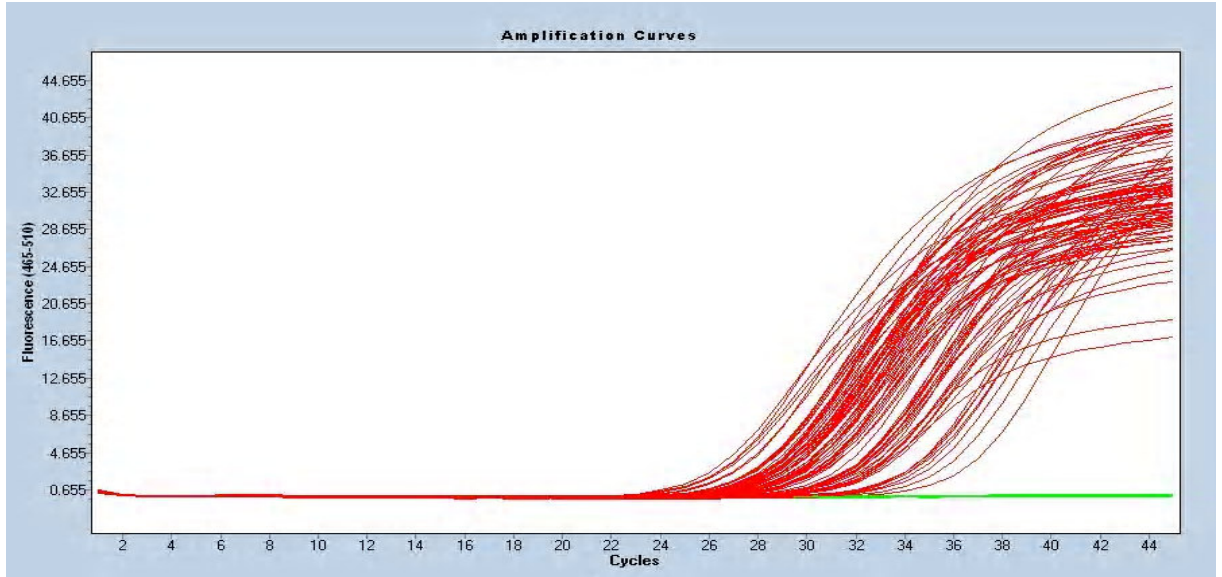


Şekil 5. BCL2 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

BCL2 geni ekspresyon sonuçları sağlıklı ve tutarlı sonuçlar elde edilemediği için çalışmadan çıkarılmıştır.

4.1.3. NRF2 geni

NRF2 geninin Real-Time PCR analizi sonucunda elde edilen Ct eğrileri Şekil 6'de verilmiştir.



Şekil 6. NRF2 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

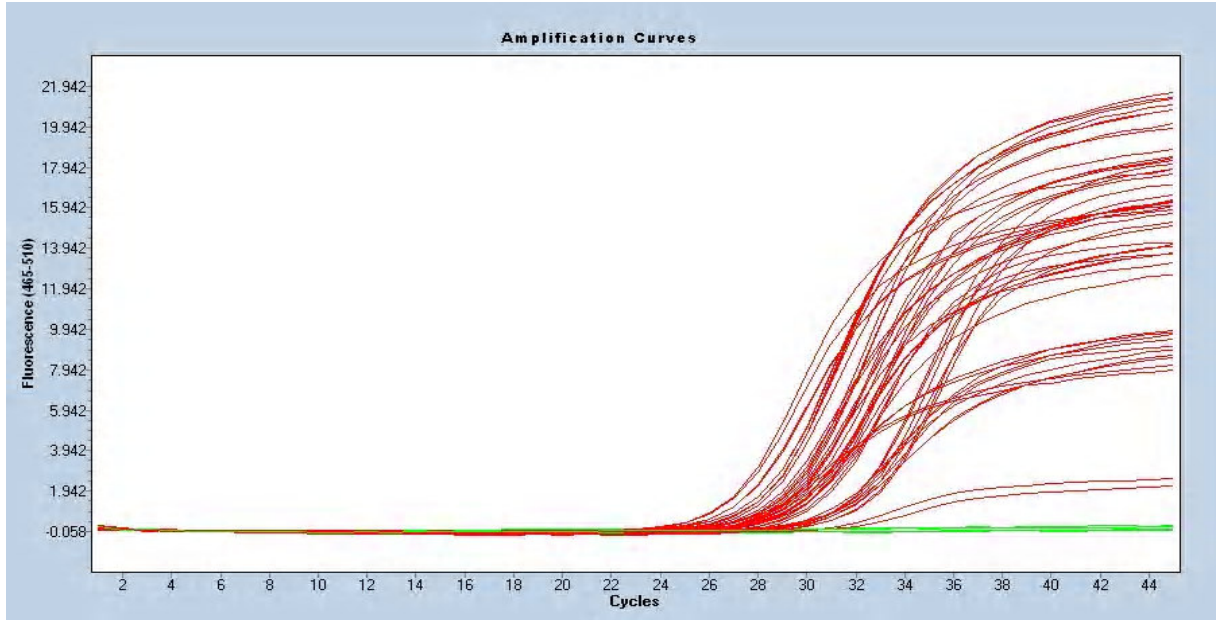
Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki NRF2 geni/ β -Actin mRNA ekspresyon seviyeleri bağımlı örneklem t-testi karşılaştırıldı. Karşılıklı olarak eşleşmeyen (aynı hastanın tümör dokusunda Ct değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnekler istatistiksel analizden çıkarıldı. Ekspresyon düzeyi hastaların tümör dokularında normal beyin dokularına göre anlamlı olarak azalmıştır. (Tablo 10).

Tablo 10. NRF2 geninin normal dokularda ve tümör dokularında ekspresyonlarının karşılaştırması

Grup sütunu	N	Ortalama	Standart sapma
NRF2geni normal	23	1,4160478	1,72391937
NRF2 geni tümör	45	0,2707721	1,20105027

4.1.4. B-ACTİN

B-ACTİN Real-Time PCR analizi sonucunda elde edilen Ct eğrileri Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 7. β -actin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon değerleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biz bu çalışmada Primer beyin tümörlerinin etiyolojisinde sorumlu olabilecek genleri BCL2, MEG3 ve NRF2 genini mRNA düzeylerini inceledik. MEG3 geni, kodlamayan uzun bir RNA'yı (lncRNA) kodlar ve bir çok normal dokuda eksprese edilir. Bununla birlikte MEG3 ekspresyonunun, primer insan tümörlerinin genişleyen bir listede kaybolur ve promotör hipermetilasyonu ya intergenik diferansiyel metile bölgenin hipermetilasyonu tümörlerinde MEG3 ifade kaybı katkıda gösterilmiştir (17,18). Bu çalışmada PBT'nde MEG3 gen ifadesinin normal beyin dokusuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu bulundu. MEG3 bir tümör baskılayıcı gen olarak temsil edilir ve ektopik ifadesi hücre proliferasyonu'nu engeller. İnsan glioma hücre hatlarında hücresi apoptozu teşvik eder (19). Bu çalışmada PBT'nde MEG3 gen ifadesinin normal beyin dokusuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu bulundu. NRF2 ,fizyolojik koşullar altında Nrf2 aktivitesini düşürür. NRF2 savunma mekanizmasının düzenleyicisidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, NRF2 düzenlenmesinin yeni mekanizmaları, hücresel detoksifikasyon ve kanser ile ilişkili olarak göstermektedir. NFE2L2 / KEAP1 mutasyonlarından bağımsız olarak NRF2 antioksidan yolunu aktive etmede onkogenler üzerinde bir rolü belirleyen yeni kanıtlar ortaya çıkmıştır (57). Tersine, NRF2 aktivitesinin restorasyonu veya amplifikasyonu, çok çeşitli hastalık durumu için potansiyel bir tedavi hedefi olarak ortaya çıkmaya devam etmektedir. Bu nedenle, hastalığın etyolojisi, ilerlemesi ve tedavisinde NRF2 ile başlatılan antioksidan aktivitenin rolü artmaya devam etmektedir. Normal hücrelere kıyasla ,meme kanseri hücrelerinde indirgenmiş NRF2 ekspresyonu gözlenmiştir (58). Son gelişmeler, kanserli hücrelerin NRF2 düzeylerinin artırmasının hücre içi çevreyi azalttığını ve hayatta kalma avantajları ve ilaç direnci kazandırabileceğini ortaya koymuştur. Nrf2'nin bazı detoksifiye edici enzimlerin ekspresyonunu düzenleyerek tütün dumanındaki belirli karsinojenlere karşı oluşturulan savunmada önemli rol oynaması nedeniyle, KOAH hastalarının akciğer kanserine duyarlılığına katkıda bulunabilir (59). KOAH hastalarında

epitel hücrelerin proliferasyonunu teşvik eden epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR) ekspresyonunda artış görülmektedir (60). Bu genlerin tespit edilmesinin, ileri ki dönemlerde primer beyin tümörlerinin tanısında, tedavisinde veya prognozunda etkili olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada primer beyin tümörlerinin etiyolojisinde sorumlu olabilecek genlerin (BCL-2, MEG-3 ve NRF2) tespit edilmesi amaçlandı. Bu genlerin tespit edilmesinin, ileri ki dönemlerde primer beyin tümörlerinin tanısında, tedavisinde veya prognozunda etkili olabileceğini düşünüldü. Beyin tümörlerinde MEG-3 ve NRF2 geninin ekspresyon düzeyleri incelediğimizde kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar tespit edildi. MEG3 ve NRF2 genin ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalış tespit edildi. Her ne kadar çalışmada anlamlı sonuçlar elde edilmiş olsa da çalışmamızda bazı kısıtlılıklar olduğu düşünülmektedir. Öncelikle ifade düzeyleri sadece mRNA düzeyinde bakıldı. Protein düzeyinde de araştırma yapılması konfirmasyon açısından ve proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonunu görme açısından daha faydalı olacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109
2. Kliehues P, Burger PC, Scheithauer BW. WHO International Histological Classification of Tumors. In: Histological typing of tumours of the central Nervous System 1993
3. Ferlay J, Soerjomataram IE, M., Dikshit R, et al. International Agency for Research on Cancer 2013
4. <http://www.orhansen.com/beyin-tumorleri/> 5 agustos 2017 erişildi.
5. Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer* 2011;129:773–779.
6. Anwar SL, Krech T, Hasemeier B ,et al. Loss of imprinting and allelic switching at the DLK1-MEG3 locus in human hepatocellular carcinoma PLoS One 2012;7:494-620.
7. Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J Cell Biochem* 2012;113:1868–1874.
8. Zhou Y, Zhong Y, Wang Y ,et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem.* 2007;282:24731–24742.
9. Ewan A Gibb, Carolyn J Brown and Wan L Lam. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol cancer* 2011;13;10:38
10. Chen B, Lu Y, Chen Y and Cheng J.The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol* 2015;225:83-99.

11. Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, et al. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol* 2015;17:555-565.
12. Zhu J, Wang H, Sun Q, et al. Nrf2 is required to maintain the self-renewal of glioma stem cells. *BMC Cancer* 2013;10:380
13. Giménez-Cassina A¹, Danial NN². Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:165-175
14. David N. Louis, Arie Perry, Guido Reifenberger, et al. Ellison. The World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System 2016
15. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 1993;3:255-68.
16. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:714-736.
17. Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer* 2011;129:773-779.
18. Anwar SL, Krech T, Hasemeier B, et al. Loss of imprinting and allelic switching at the DLK1-MEG3 locus in human hepatocellular carcinoma *PLoS One* 2012;7 :494-620.
19. Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J Cell Biochem* 2012;113:1868-1874.
20. Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem* 2007;282:24731-24742.
21. Zhou, Y. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol* 2009; (10) 13: 726-727.
22. Zhao J ,Dahle D ,Zhou Y, et al. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90: 2179-2186.

23. Zhang X, Gejman R, Mahta A ,et al. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Res* 2010;70: 2350–2358
24. Alexander JM, Biller BM, Bikkal H ,et al. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *Journal of Clinical Investigation* 1990;86: 336–340
25. Bando T, Kato Y, Ihara Y ,et al. Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1999;111:161–165
26. Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S ,et al. Identification of an imprinted gene, *Meg3/Gtl2* and its human homologue *MEG3*, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 2000;5: 211–220
27. Wang PJ, Ren ZQ & Sun PY. Overexpression of the long non-coding RNA *MEG3* impairs *in vitro* glioma cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry* In 2012;113:1868-1874
28. Weinberg R 1991 Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138–1146
29. Weinberg R 1993 Tumor suppressor genes. *Neuron* 1993;11: 191–196
30. Zhang X, Gejman R, Mahta A ,et al. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Research* 2010;70: 2350–2358
31. Zhang X, Rice K, Wang Y ,et al. Maternally expressed gene 3 (*MEG3*) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology* 2010;151:939–947
32. Astuti, D. Latif, F. Wagner, et al. *J. Cancer* 2005;92:1574–1580
33. Wu Y, Zhang L, Zhang L, et al. Long non-coding RNA *HOTAIR* promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting *EZH2* and repressing *E-cadherin* in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2015;46: 2586-2594
34. Wang Y, Chen W, Yang C ,et al. Long non-coding RNA *UCA1a* (*CUDR*) promotes proliferation and tumorigenesis of bladder cancer. *Int J Oncol* 2012;41: 276-284

35. Orom UA, Derrien T, Beringer M ,et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* 2010;143: 46-58
36. Tian D, Sun S and Lee JT. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* 2010;143: 390-403
37. Kobayashi S, Wagatsuma H, Ono R, et al. Mouse Peg9/Dlk1 and human PEG9/DLK1 are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: Mouse Meg3/Gtl2 and human MEG3. *Genes Cells* 2000;5: 1029-1037
38. Gejman R, Batista DL, Zhong Y,et al. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93: 4119-4125
39. Sheng X, Li J, Yang L,et al. Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep* 2014;32: 277-285
40. Ewan A Gibb, Carolyn J Brown and Wan L Lam. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol cancer* 2011;13:10-38
41. Chen B, Lu Y, Chen Y and Cheng J The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol* 2015 ;225:83-99
42. Kanamori M, Higa T, Sonoda Y ,et al. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol* 2015;17:555-565
43. Zhu J, Wang H, Sun Q, et al. Nrf2 is required to maintain the self-renewal of glioma stem cells. *BMC Cancer* 2013;10:380
44. Hayes J.D et al. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem Soc Trans* 2000;28:33-41

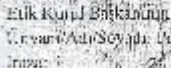
45. Chanas ,S. A. Jiang, Q. McMahon, et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2 ,Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the liver of male and female mice. *Biochem J* 2002;365:405-416
46. Venugopal, R. and Jaiswal, A. K. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 1998;17:3145–3156
47. Kwak, M. K.Wakabayashi, N.Itoh, K. Motohashi, H. Yamamoto, M. and Kensler, T. W.Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1–Nrf2 pathway: identification of novel gene clusters for cell survival. *J. Biol. Chem* 2003;278: 8135–814
48. Kensler TW and Wakabayashi N.Nrf2, friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 2010;31: 90-99
49. Moi P, Chank K, Asunis I, et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 9926-9930
50. Solis LM, Behrens C, Dong W, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2010;16: 3743-3753
51. Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, et al.NFE2L2 gene mutation in male Japanese squamous cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 2010;5: 786-789
52. Shibata T, Ohta T, Tong KI, et al. Cancer related mutations in Nrf2 impair its recognition by Keap1-Clu3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105: 13568-13573
53. Hu Y, Ju Y, Lin D, et al. Mutation of the Nrf2 gene in non-small cell lung cancer. *Mol Biol Rep* 2012;39: 4743-4747
54. Moi P, Chan K, Asunis I. et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-

- E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 9926-30
55. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR *Genome Res* 1996; 6: 986-94
 56. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7: 85
 57. DeNicola, G.M. ,et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011;106: 85
 58. Loignon, M. et al. Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy. *Mol. Cancer. Ther* 2009;8: 2432
 59. Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 76-87
 60. Am J Clin. Expression of epidermal growth factors and their receptors in the bronchial epithelium of subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Pathol* 2006; 125: 184-192
 61. Bahadır O. Primer beyin tümörlerinin etiyolojisinde klf4, klf4 α , oct3/4, sox2, nanog ve c-myc genlerinin rolünün araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2014: 12

EKLER

Tıbbi Genetik

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAY-100)

ARAŞTIRMACI ADI 	Etik kurulun bilgilendirme BCL 2, MCL 2 ve NRF 2 gerektiren profil için araştırması.																																												
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU																																													
ETİK KURUL BİLGİLERİ	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">ETİK KURULUN ADI</td> <td>ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</td> </tr> <tr> <td>AÇIK ADRES</td> <td>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sekizinci Mahalle, KAYSERİ</td> </tr> <tr> <td>TELEFON</td> <td>0332 437 48 10</td> </tr> <tr> <td>FAKS</td> <td>0332 437 62 50</td> </tr> <tr> <td>E-POSTA</td> <td>etik@erciyes.edu.tr</td> </tr> </table>	ETİK KURULUN ADI	ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sekizinci Mahalle, KAYSERİ	TELEFON	0332 437 48 10	FAKS	0332 437 62 50	E-POSTA	etik@erciyes.edu.tr																																		
ETİK KURULUN ADI	ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU																																												
AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sekizinci Mahalle, KAYSERİ																																												
TELEFON	0332 437 48 10																																												
FAKS	0332 437 62 50																																												
E-POSTA	etik@erciyes.edu.tr																																												
BASVURU BİLGİLERİ	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI</td> <td>Prof. Dr. Arslan Dincer</td> </tr> <tr> <td>KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI İZMİN ALAN</td> <td>Tıbbi Genetik</td> </tr> <tr> <td>KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI BULUNDUĞU MERKEZ</td> <td>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Araştırma Laboratuvarı</td> </tr> <tr> <td>YARSA / CARI SORUMLU UNVANI ADI / SOYADI</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DESTEKLEYİCİ</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PROJE YÖRÜTÜCÜSÜ UNVANI / ADI / SOYADI (TUTANAK VE GELİTİRİCİLERİN DESTEĞİ İÇİN)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ</td> <td> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>FAZ 1</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 2</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 3</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 4</td><td>☐</td></tr> <tr><td>Gözlemci (gözetimci)</td><td>☐</td></tr> <tr><td>Tıbbi amaçlı araştırma</td><td>☐</td></tr> <tr><td>İn vivo / tıbbi amaçlı araştırma ve teşhis amaçlı (gözetimci)</td><td>☐</td></tr> <tr><td>İn vitro / klinik araştırma</td><td>☒</td></tr> <tr><td>Diğer (belirtiniz)</td><td>Yararlı İlaçlar Testi</td></tr> </table> </td> </tr> <tr> <td>ARAŞTIRMA KATILAN MERKEZLER</td> <td> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>TEK MERKEZ</td> <td>☒</td> <td>ÇOKLULU</td> <td>☐</td> <td>ULUSAL</td> <td>☒</td> <td>ULUSLARARASI</td> <td>☐</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>	KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Arslan Dincer	KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI İZMİN ALAN	Tıbbi Genetik	KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Araştırma Laboratuvarı	YARSA / CARI SORUMLU UNVANI ADI / SOYADI		DESTEKLEYİCİ		PROJE YÖRÜTÜCÜSÜ UNVANI / ADI / SOYADI (TUTANAK VE GELİTİRİCİLERİN DESTEĞİ İÇİN)		DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ		ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>FAZ 1</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 2</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 3</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 4</td><td>☐</td></tr> <tr><td>Gözlemci (gözetimci)</td><td>☐</td></tr> <tr><td>Tıbbi amaçlı araştırma</td><td>☐</td></tr> <tr><td>İn vivo / tıbbi amaçlı araştırma ve teşhis amaçlı (gözetimci)</td><td>☐</td></tr> <tr><td>İn vitro / klinik araştırma</td><td>☒</td></tr> <tr><td>Diğer (belirtiniz)</td><td>Yararlı İlaçlar Testi</td></tr> </table>	FAZ 1	☐	FAZ 2	☐	FAZ 3	☐	FAZ 4	☐	Gözlemci (gözetimci)	☐	Tıbbi amaçlı araştırma	☐	İn vivo / tıbbi amaçlı araştırma ve teşhis amaçlı (gözetimci)	☐	İn vitro / klinik araştırma	☒	Diğer (belirtiniz)	Yararlı İlaçlar Testi	ARAŞTIRMA KATILAN MERKEZLER	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>TEK MERKEZ</td> <td>☒</td> <td>ÇOKLULU</td> <td>☐</td> <td>ULUSAL</td> <td>☒</td> <td>ULUSLARARASI</td> <td>☐</td> </tr> </table>	TEK MERKEZ	☒	ÇOKLULU	☐	ULUSAL	☒	ULUSLARARASI	☐
KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Arslan Dincer																																												
KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI İZMİN ALAN	Tıbbi Genetik																																												
KORDİNATÖR / GÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Araştırma Laboratuvarı																																												
YARSA / CARI SORUMLU UNVANI ADI / SOYADI																																													
DESTEKLEYİCİ																																													
PROJE YÖRÜTÜCÜSÜ UNVANI / ADI / SOYADI (TUTANAK VE GELİTİRİCİLERİN DESTEĞİ İÇİN)																																													
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ																																													
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>FAZ 1</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 2</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 3</td><td>☐</td></tr> <tr><td>FAZ 4</td><td>☐</td></tr> <tr><td>Gözlemci (gözetimci)</td><td>☐</td></tr> <tr><td>Tıbbi amaçlı araştırma</td><td>☐</td></tr> <tr><td>İn vivo / tıbbi amaçlı araştırma ve teşhis amaçlı (gözetimci)</td><td>☐</td></tr> <tr><td>İn vitro / klinik araştırma</td><td>☒</td></tr> <tr><td>Diğer (belirtiniz)</td><td>Yararlı İlaçlar Testi</td></tr> </table>	FAZ 1	☐	FAZ 2	☐	FAZ 3	☐	FAZ 4	☐	Gözlemci (gözetimci)	☐	Tıbbi amaçlı araştırma	☐	İn vivo / tıbbi amaçlı araştırma ve teşhis amaçlı (gözetimci)	☐	İn vitro / klinik araştırma	☒	Diğer (belirtiniz)	Yararlı İlaçlar Testi																										
FAZ 1	☐																																												
FAZ 2	☐																																												
FAZ 3	☐																																												
FAZ 4	☐																																												
Gözlemci (gözetimci)	☐																																												
Tıbbi amaçlı araştırma	☐																																												
İn vivo / tıbbi amaçlı araştırma ve teşhis amaçlı (gözetimci)	☐																																												
İn vitro / klinik araştırma	☒																																												
Diğer (belirtiniz)	Yararlı İlaçlar Testi																																												
ARAŞTIRMA KATILAN MERKEZLER	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>TEK MERKEZ</td> <td>☒</td> <td>ÇOKLULU</td> <td>☐</td> <td>ULUSAL</td> <td>☒</td> <td>ULUSLARARASI</td> <td>☐</td> </tr> </table>	TEK MERKEZ	☒	ÇOKLULU	☐	ULUSAL	☒	ULUSLARARASI	☐																																				
TEK MERKEZ	☒	ÇOKLULU	☐	ULUSAL	☒	ULUSLARARASI	☐																																						
 Etik Kurul Başkanı Dr. Yavuz Akın Soydan / Prof. Dr. Tugay D. ŞENİŞ																																													
 Bahri YANCAR Fakülte Şefi																																													

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

BİLGİLENDİRME

Araştırmanın Adı: PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE BCL-2, MEG-3 VE NRF2 GEN İFADE PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma bir araştırma olup, primer beyin tümörlerinde söz konusu genlerin düzeylerini belirlemeyi amaçlamaktayız. Araştırmanın süresi 12 ay olarak planlanmıştır. Araştırmaya katılması planlanan gönüllü sayısı ise 70'dir.

Öncelikle araştırma kapsamına alınacak olan gönüllüleri, Erciyes Üniversitesi Tıbbi Patoloji A.D.'da Glioblastome Multiforme tanısı almış hastalar arasından belirleyeceğiz. Bu araştırmada gönüllü olursanız size ait olan ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında muhafaza edilen primer beyin dokusundan bir miktar (0,4 mikron kalınlığında 15 kesit) materyal alınacaktır. Bu kesitlerden genetik materyaliniz elde edilecektir. Biyolojik materyalinizin alınmasından sonra RNA'nızın elde edilmesi işlemi bölümümüz laboratuvarlarında uluslararası standartlara uygun şekilde gerçekleştirilecektir. Elde edilen RNA örneklerinden yurtiçinde belirlenen merkezde genetik analizler yapılacak ve veriler analiz edilerek bu hastalarda hedef genlerdeki genetik değişiklikler belirlenecektir. Bu işlemlerin hiçbir aşamasında sizden ücret talep edilmeyecektir. Çalışma boyunca size herhangi bir cerrahi girişim yapılmayacaktır.

Genetik testlerin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalması için alınan materyaller Tıbbi Genetik A.D.'nda muhafaza edilecektir. Ayrıca materyaller üzerinde kimliğinizi açığa çıkarabilecek herhangi bir bilgi yazılmayacaktır. Materyaller üzerine nümerik kodlama yapılarak etiketlenecektir. Ancak yapılan testler sonucunda sizin veya ailenizin fertlerinden birisinin ilerde bu hastalıktan etkilenebileceği ortaya çıkabilir. Bu bilginin ortaya çıkması sizi ekonomik ve sosyal yönden olumsuz etkileyebileceği gibi hastalık durumu sizi psikolojik yönden de etkileyebilir. Araştırma sonucundaki bilgileri sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır. Genetik testlerin bir diğer önemli riski de anne ya da babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Yukarıda belirttiğimiz durumlar araştırmada yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Bu risklerden etkilenmemeniz için çalışma süresince alınan materyalleriniz kilit altında ve bilgileriniz şifrelenmiş dosya ve bilgisayarlarda muhafaza edilecektir. Çalışma sonrasında sizden alınan materyal imha edilecektir.

Biyolojik materyalinizi kullanmamız için onay vermeyebilirsiniz. Bu tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Şunu önemle belirtelim ki: İSTEDİĞİNİZ ZAMAN HİÇBİR GEREKÇE GÖSTERMEKSİZİN BİYOLOJİK MATERYALLERİNİZİN yok edilmesini isteyerek onayınızı çekme hakkına sahipsiniz. Böyle bir durumda biyolojik materyalleriniz en kısa süre içinde yok edilecek ve tüm kayıtlarınız silinecektir.

Bu araştırmada kimliklerinizi ortaya koyacak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacak, araştırma sonuçları yayınlansa bile kimlikleriniz gizli kalmaya devam edecektir.

Araştırma Süresince 24 saat ulaşılabilir kişi adı / soyadı / telefonu / Adresi:

Prof. Dr. Munis Dünder – 0553 531 05 04

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D. Melikgazi Kayseri

PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE BCL-2 ,MEG3 VE NRF2 GEN İFADE PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

17%	16%	2%	6%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	ateistforum.biz Internet Source	3%
2	Submitted to Erciyes Üniversitesi Student Paper	2%
3	trsgo.dergisi.org Internet Source	2%
4	sagens.erciyes.edu.tr Internet Source	1%
5	tr.wikipedia.org Internet Source	1%
6	acikerisim.deu.edu.tr Internet Source	1%
7	pharmacy.erciyes.edu.tr Internet Source	1%
8	www.aek.med.ege.edu.tr Internet Source	1%
9	www.lugatek.com	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad, Soyad : AYSEL ÇÖMERTMAN
Cinsiyet : BAYAN
Doğum Tarihi : 14.09.1989
Medeni Durum : BEKAR
Uyruk : TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Sürücü Belgesi : B
Askerlik Durumu : -

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres Bilgileri : cırgalan mah.381 sok no:8 KOCASİNAN/KAYSERİ
Ev Tel. :
Cep Tel : 0553 531 05 04
E-posta : ayselecmrt@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Genetik 05.09.2014-
Üniversite	Erciyes Üniversitesi/Fen fakültesi /Biyoloji 2009-2013
Lise	Açıköğretim lisesi/fen bilimleri/2004-2007

İŞ DENEYİMİ

01/2016 – işe giriş devam ediyor.	Genomiks yaşam bilimleri firması/ moleküler fish
---	--

KURS / SERTİFİKA BİLGİSİ

	İşaret dili kursu/2017 Diksiyon kursu / 05.2012 Fotoğrafçılık kursu/12.2015 Girişimcilik/02.2011 İngilizce/deulcom - 07.10.2014-18.12.2014(72 Saat) Ahmet Şerif İzgören /Başarmak semineri- 14.03.2014-14.03.2014 (75 Saat) Erdal demirkiran/ Etkili İletişim ve Motivasyon Teknikleri Konulu Semineri - 10.03.2013-10.03.2013
--	---

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

word,excel,power point, internet

YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce	iyi
-----------	-----

HOBİLER

Kitap okumak, Doğa yürüyüşleri,Canlı müzik,sinema,gitar çalmak,fotoğraf çekmek..

DERNEK VE KULÜP ÜYELİKLERİ

Fotoğrafçılık derneği