

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNİN ETİYOLOJİSİNDE KLF4, KLF4A,
OCT3/4, SOX2, NANOG VE C-MYC GENLERİNİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TTU-2014-4929

Proje Türü: Tıpta Uzmanlık

SONUÇ RAPORU

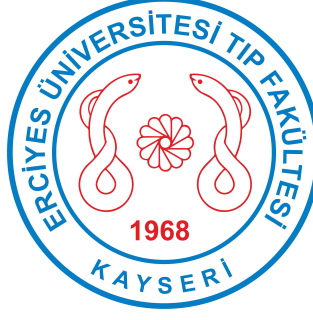
Proje Yürütücüsü:
Prof Dr Yusuf Özkul
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Oğuzhan Bahadır
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Aralık 2014

KAYSERİ

Bu alışma Erciyes Üniversitesi BAP birimi tarafından TTU-2014-4929 kodu ile desteklenmiştir.



ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNİN ETİYOLOJİSİNDE
KLF4, KLF4A, OCT3/4, SOX2, NANOG VE C-MYC
GENLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

OĞUZHAN BAHADIR

KAYSERİ - 2014



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNİN ETİYOLOJİSİNDE
KLF4, KLF4 α , OCT3/4, SOX2, NANOG VE C-MYC
GENLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

OĞUZHAN BAHADIR

Danışman

PROF DR YUSUF ÖZKUL

KAYSERİ - 2014

TEŞEKKÜR

Tez araştırmam ve eğitimim boyunca bilgisini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof Dr Yusuf Özkul'a, tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bana yol gösterici olan ve beni sürekli destekleyen sayın hocalarım Prof Dr Munis Dünder'a ve Doğ Dr Çetin Saatçi'ye, tez araştırmam süresince bana yol gösteren Sayın Prof Dr Özlem Canöz'e ve Doğ Dr Bülent Tucer'e, laboratuvar çalışmalarında bana destekleyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Hilal Akalın'a, Mehmet Boz'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma, istatistiksel analizlerde bana yardımcı olan Gökmen Zararsız'a;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen annem Edibe BAHADIR'a ve bütün aileme,

Tez çalışmam süresince yanımda olan eşim Derya BAHADIR'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması 2004 yılında aramızdan ayrılan babam Hüseyin Avni BAHADIR'a adanmıştır.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. SINIR SİSTEMİ	5
2.1.1. Merkezi sinir sistemi anatomisi	5
2.1.2. Merkezi sinir sisteminin embriyolojik gelişimi	5
2.1.3. Merkezi sinir sistemi histolojisi.....	6
2.4. BEYİN TÜMÖRLERİ	8
2.4.1. Sınıflandırma	8
2.4.2. Evreleme.....	8
2.4.3. Epidemiyoloji	12
2.5. KÖK HÜCRE.....	13
2.5.1. Kanser Kök hücresi nedir?	13
2.5.2. Kök hücre çalışmalarındaki etik sorunlar ve ülkemizdeki yasal düzenlemeler ..	14
2.5.3. IPKH programlaması	16
3. HASTALAR VE YÖNTEM	22
3.1. ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	22
3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI.....	22

3.3. ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLEN GRUPLAR.....	22
3.3.1. Hasta grubu	22
3.3.2. Kontrol gurubu	23
3.4. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	23
3.4.1. Demirbaş Malzemeler	23
3.4.2. Sarf Malzemeler	24
3.5. YÖNTEMLER.....	25
3.5.1. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	25
3.5.2. Real Time PCR Formatları	26
3.9.1. İstatiksel analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI	35
4.1.1. SOX2 geni	35
4.1.2. MYC geni.....	36
4.1.3. NANOG geni	37
4.1.4. KLF4 geni	37
4.1.5. POU5F1 geni	38
4.1.6. KLF4 α	39
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

MBT: Metastatik Beyin Tümörleri
PBT: Primer Beyin Tümörleri
SSS: Santral Sinir Sistemi
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
ÇSS: Çevresel Sinir Sistemi
KKH: Kanser Kök Hücresi
EKH: Embriyonik Kök Hücre
iPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KH: Kök Hücre
PKH: Pluripotent Kök Hücre
BOS: Beyin Omurilik Sıvısı
GBM: Glioblastome Multiforme
PCR: Polimerase Chain Reaction
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR: Real Time Polimerase Chain Reaction

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. DSÖ Beyin tümörleri sınıflandırması	10
Tablo 2. DSÖ Beyin tümörleri evrelemesi.	11
Tablo 3. cDNA sentezi için gerekli materyaller ve miktarları. HS= Hasta Sayısı.	30
Tablo 4. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü.	31
Tablo 5. Ekspresyon analizinde kullanılan ROCHE katalog assay ID'leri.	31
Tablo 6. Tablodaki miktarlar her çalışma grubundaki hasta sayısına göre hesaplanıp her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı. (Su miktarı, son hacim 20 µl olacak şekilde değişebilir.).....	32
Tablo 7. Lightcycler 480 II software programında ayarlanan sıcaklıkları ve süreleri	32
Tablo 8. SOX2 geni için istatistiksel analiz sonuçları. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.....	36
Tablo 9. MYC geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.....	36
Tablo 10. NANOG geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.....	37
Tablo 11. KLF4 geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.....	38
Tablo 12. NANOG geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. MSS'nin anatomik kısımlarını göstermektedir.....	6
Şekil 2. Kanser tedavisinde iki farklı yaklaşım (http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer_stem_cell).....	14
Şekil 3. Gerçek zamanlı PZR'nin fazları.....	25
Şekil 4. SYBR Green I, DNA dizisinden bağımsız olarak çift iplikli DNA'ya bağlanır ve ışıma verir.....	26
Şekil 5. Hidroliz probunun çalışma mantığı.....	27
Şekil 6. Hibridizasyon problemleri dizisi üzerinde art arda bağlanarak ışıma verir.....	28
Şekil 7. SOX2 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu	35
Şekil 8. MYC geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu	36
Şekil 9. Nanog geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu	37
KLF4 geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C _t eğrileri şekil 10'da verilmiştir.	37
Şekil 10. KLF4 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu	38
POU5F1 geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C _t eğrileri şekil 11'de verilmiştir.	38

Şekil 11. POU5F1 geninin RT-PCR ile elde edilen Ct eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu	38
--	----

ÖZET

Primer beyin tümörleri kanserler arasında nispeten daha az görülse de mortalitesi yüksektir. Artan erken tanı ve tedavi olanakları sayesinde sağ kalım sürelerinde iyi sonuçlar edilmesine rağmen hastalığın etiyolojisinde, iyonize radyasyon dışında, etkili bir faktör bulunamamıştır. Bu durum “Hastalığın altında yatan genetik faktörler olabilir mi?” sorusunu akla getirmektedir.

Kök hücre çalışmaları bugün geldiği noktada rejeneratif tıp konusunda olduğu kadar gelişim mekanizmalarını anlama, ilaç araştırması, hastalık modeli oluşturma gibi alanlarda da umut vaat etmektedir. Kanser kök hücresi de bunlara bir örnektir. Kanser kök hücre teorisi tümör dokusu içerisinde kök hücre özelliklerini taşıyan hücrelerin keşfedilmesi ile 1999 yılında ortaya atıldı. Yıllar içerisinde yapılan çalışmalarda bu hücrelerin tümör dokusunun kendini yenilemesinden ve tümör içerisindeki yapılanmalardan (damarlanma, metastaz, ilaç direnci kazanma gibi) sorumlu olduğu anlaşıldı. KKH hücrelerini hedef alan tedavi stratejilerinin daha iyi sonuçlar verdiği gösterildi.

Tamamen farklılaşmış bir dokuda kök hücre özellikleri taşıyan bu hücreler nereden ortaya çıkıyor? Bu sorunun cevabı olarak karşımıza somatik kök hücreler çıkmaktadır. SKH hemen her dokuda bulunan, dokudaki onarımı sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler kendini yenileyebilen ve dokudaki herhangi bir hücreye farklılaşabilen hücrelerdir. SKH’in başka dokularda bile onarım işlemine katıldığı

gösterilmiştir. Kanserin, bu SKH hücrelerinin KKH'ne dönüşerek oluştuğu yönündeki düşünceler giderek kuvvetlenmektedir.

2006 yılında bir grup tamamen farklılaşmış fibroblast hücrelerinden pluripotent kök hücre elde etmeyi başardı. İndüklenmiş pluripotent kök hücre olarak anılan bu hücreler oluşturulurken bazı transkripsiyon faktörleri kullanıldı. Daha sonraki başka çalışmalarda farklı transkripsiyon faktörleri kullanılarak iPKH elde edildi. Bu transkripsiyon faktörleri arasında POU5F1, SOX2, MYC, NANOG ve KLF4 bir adım daha öne çıkmıştır. Özellikle POU5F1 ve SOX2 embriyonik kök hücrelerde de önemli fonksiyonları olan ve iPKH elde etmek için elzem olan iki transkripsiyon faktörüdür.

Bu çalışmada beyin tümörlerinin etiyolojisinde etkili olabilecek genleri tespit etmeyi amaçladık. Bunun için parafinize beyin tümörlerinde, IPKH programlamada kullanılan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeylerine bakıldı. KLF4, SOX2, MYC ve POU5F1 genlerinin ekspresyonlarının arttığı, NANOG geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler; KLF4, NANOG, SOX2, MYC, POU5F1, kök hücre, beyin tümörü

ABSTRACT

Of all cancers, primary brain tumors correspond to relatively small portion, but its mortality is high. Although increased early diagnose and therapy strategies with better survival, etiological factors are still uncertain except ionize radiation. This inevitably gives rise to thought if there are underlying genetic factors.

The point where the stem cell research today is not promising for only regenerative medicine, but also to understand developmental processes, drug research, to create disease models. Cancer stem cell is a fascinating example for it. Cancer stem cell theory put forward in 1999 with the discovery of tumor cells, which resemble stem cell characteristics. In following years it has been discovered that these cells are responsible for self-renewal, angiogenesis, metastasis, drug resistance of tumors. It has been also shown that therapy strategies targeting cancer stem cells are more effective than the traditional strategies.

In fully differentiated tissues, how these cells with stem cell characteristics emerge? Somatic stem cell is the answer. Somatic stem cells exist nearly all tissues in the body and they are responsible for repairing the tissue damage. These cells are capable of self-renewing and differentiating to all cells of its host tissue. It has been reported that somatic stem cells contribute also repair of other tissues in body. It is increasingly strengthened that cancer stem cells originating from these somatic stem cells.

In 2006 a group of scientists achieved to produce pluripotent stem cells from fully differentiated fibroblasts. Four transcription factors used to produce these induced

pluripotent stem cells. In following studies iPSC producing was achieved by different combinations of transcription factors. POU5F1, SOX2, MYC, NANOG ve KLF4 are the important transcription factors in this process. Especially POU5F1 and SOX2 are crucial for iPSCs. These two transcription factors are also important factors in embriyonic stem cells and neural progenitor cells.

In this study we aim to discover the genes, which are contributing to brain tumor etiology. Therefore, we measured the expression levels of the genes used for IPSC programming, in paraffin-embedded brain tumors. KLF4, SOX2, MYC and POU5F1 genes are highly expressed in brain tumors in contrast to NANOG. There is no significant difference detected between brain tumors and normal brain tissue.

Keywords: KLF4, NANOG, SOX2, MYC, POU5F1, stem cell, brain tumor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin tümörleri “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. 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). Buna göre nöroepitelyal tümörler 9 farklı alt grupta sınıflandırılmıştır.

DSÖ’nün 2012 yılı verilerine göre Dünya’da 14,1 milyon kişi kanser tanısı almıştır, 8,2 milyon kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. 32,6 milyon kişi kanser ile yaşamaktadır. (2). İstatistiksel analizler ışığında 2020 yılında 17,1 milyon kişi kanser tanısı alacak ve 10 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybedecektir(1). Bu veriler ışığında kanser tanısı alan bireylerin her yıl yarısından fazlasının öldüğü görülmektedir. DSÖ verilerine göre her yıl dünyada 236 bin, veri kalitesi çok güçlü olmamakla birlikte ülkemizde her yıl 4021 yeni PBT tanısı koyulmaktadır (3).

Kök hücreler (KH) bir canlıdaki bütün dokulara farklılaşabilme kapasitesine sahip olan, aynı zamanda kendi kendini sınırsız bir şekilde yenileyebilen hücrelerdir. Son yıllarda kanser dokularının kendine ait kök hücreye sahip olduğunu gösteren birçok

Çalışma yapılmıştır. Bu konu üzerine yapılan ilk çalışmada CD34+ / CD38- (CD34 hematopoetik kök hücre belirteci, CD38 farklılaşmış hücre belirteci) lösemi hücrelerini NOD/SCID farelere aşıladıktan sonra yaptıkları flow sitometri analizinde lösemik hücrelerin CD34, CD38 ve CD33 eksprese ettiklerini tespit ettiler. Bu üç hücre yüzey belirtecine ek olarak CD34+ / CD38- hücrelerin %2 oranında varlığını devam ettirdiğini tespit ettiler (4). Akabinde yapılan birçok çalışmada farklı tümör dokularında kanser kök hücresinin varlığını destekleyen sonuçlar saptanmıştır (5-11).

Vücudumuzdaki dokular sürekli olarak bir yıkıma maruz kalırlar. Hücreler gerek dış gerek i etkenlere bağlı olarak ölürler. Buna karşılık bu hücrelerin yerini dolduracak yeni hücreler oluşur. Bu hücrelerin başlıca kaynağı hemen her dokuda bulunan ve bu onarımın sağlayıcısı somatik kök hücrelerdir (SKH) (12-14). SKH başlıca kök hücre özellikleri olan kendini yenileyebilme ve dokusundaki herhangi bir hücreye farklılaşabilme özelliklerine sahiptir. Hatta bazı çalışmalarda bu hücrelerin farklı dokulardaki onarım işlerine de katıldığı gösterilmiştir (15). Yapılan çalışmalarda bir dokudaki tümöre ait olan KKH ile aynı dokunun SKH'si arasında benzerlikler olduğunu ortaya çıkarmıştır (16). Bu alışmalar kanserin temelini atan KKH'nin SKH'inden köken aldığının bir göstergesidir.

Bir tümöre cerrahi, radyoterapik ve kemoterapik tedavi rejimleri uygulandıktan sonra tümör belirteçleri ortadan kalkmasına rağmen kanser zaman içerisinde nksedebilmektedir. Kanser kök hücrelerinin varlığı bu nüksün ana sebeplerinden biri olarak öne çıkmaktadır. KKH geleneksel tedavi stratejilerine dirençli oldukları için bu stratejiler hastalığı elimine etmiş gibi görünse de sağ kalan KKH hastalığın daha agresif ve tedavilere daha dirençli nüksetmesine neden oluyor. Ayrıca hasta geleneksel tedavinin toksik etkilerine de maruz kalıyor (17). Yapılan alışmalar KKH'ni hedef alan tedavi stratejilerinin geleneksel stratejilere göre daha başarılı olduğunu göstermiştir (18-20). Geliştirilen stratejiler KKH'nin mikro çevresini, hücre yüzey belirteçlerini, sinyal yolaklarını, "ATP-binding cassette" taşıyıcılarını hedef almaktadır (20-22).

Yapılan bir çalışma ile tamamen farklılaşmış bir fibroblast hücresinden "Pluripotent Kök Hücre, PKH" elde edilmiştir (23). İndüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) olarak isimlendirilen bu hücrelerin elde edilme aşamasında 4 farklı genin (POU5F1, SOX2, KLF4 ve MYC) ekspresyon düzeylerini değiştirerek, tamamen farklılaşmış; kök hücre özelliklerini yitirmiş bir hücreden pluripotent kök hücre elde edilmiştir.

İlerleyen yıllarda başka bir grup POU5F1, SOX2, NANOG ve Lin28 transkripsiyon faktörlerini kullanarak pluripotent kök hücre elde etmeyi başarmışlardır (24). İPKH'nin keşfi embriyonik kök hücreler ile çalışmanın getirdiği etik sorunları barındırmaması nedeniyle kök hücre çalışmalarında bir dönüm noktası olmuştur ve kök hücre çalışmalarına güçlü bir ivme kazandırmıştır.

İPKH programlamasında kullanılmış bu genlerin ortak noktaları, kök hücre özelliği taşıyan hücrelerde yüksek miktarlarda eksprese olmalarıdır. POU5F1 geni, blastokist evresinde iç hücre kitlesinde trofoblastlarla kıyaslandığında ekspresyon düzeyinin 31 kat daha yüksek olduğu tespit edildi (25). Ayrıca gestasyonun 9. gününden itibaren oluşmaya başlayan somatik hücrelerde, POU5F1 ifadesinin azaldığı tespit edildi (26). Fare çalışmalarında POU5F1 geni nakavt edilmiş embriyolarının çok erken safhada öldüğü gözlemlendi. Bu durum EK hücrelerinin kendi kendini yenileyememesine ve sonucunda iç hücre kitlesinin oluşamamasına bağlanmıştır (27).

SOX2 geni EKH'nde eksprese olmaktadır. SOX2 ekspresyonu özellikle EKH hücrelerinin nöral kök hücrelere doğru farklılaşması için elzem olduğu gösterilmiştir (28). Fakat nöral kök hücrelerinin terminal farklılaşması için SOX2 geninin inhibe olması gerektiği de gösterilmiştir. Aynı çalışmada SOX2 geninin nöral kök hücrelerinin proliferatif özelliklerinin korunmasında da elzem olduğu gösterilmiştir.(29).

MYC geni şu ana kadar birçok kanser türünde fazla ifade edildiği gösterilmiştir. İPKH programlamasında da kullanılmasına rağmen programlama için zorunlu olmadığı çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat MYC geni kullanılarak elde edilen İPKH'nin kök hücre özelliklerini daha iyi yansıttığı gösterilmiştir (24). MYC proteinin genom üzerinde 10000'den fazla bağlanma bölgesi olduğu tespit edilmiştir (30).

NANOG geninin EK hücrelerinde ekspresyonunun azaltılması hücrelerin farklılaşma yoluna gitmesi ile sonuçlanmıştır (31). MYC geni ile benzer olarak İPKH programlamada elzem olmasa da hücrenin pluripotent özelliklerinin kalitesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (32). Çeşitli kanserlerde ekspresyonunun arttığı ve kötü prognozla ilişkisi olduğu tespit edilmiştir (33,34). Bu bulgulara rağmen bu çalışmada NANOG geni ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark tespit edilemedi.

Deri ve intestinal sistem gibi epitel dokularında hücreler farklılaştıkça ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (35,36). Buna karşın KLF4 geni aynı zamanda İPKH'lerinde pluripotent özelliklerin korunmasında rol alan bir transkripsiyon faktörüdür (37). Bu durum mantıksal bir zıtlık gibi görünse de hücrelerdeki farklı yollar ya da KLF4 geninin farklı izoformları olması bu durumu açıklayabilir. Meme kanserlerinde KLF4 geniekspresyon düzeylerinin artması da bu durumun destekleyicisi olarak ortaya çıkmaktadır (38). Bu çalışmada da beyin tümörlerinde KLF4 geni ekspresyon düzeyi artmış olarak tespit edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SİNİR 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.

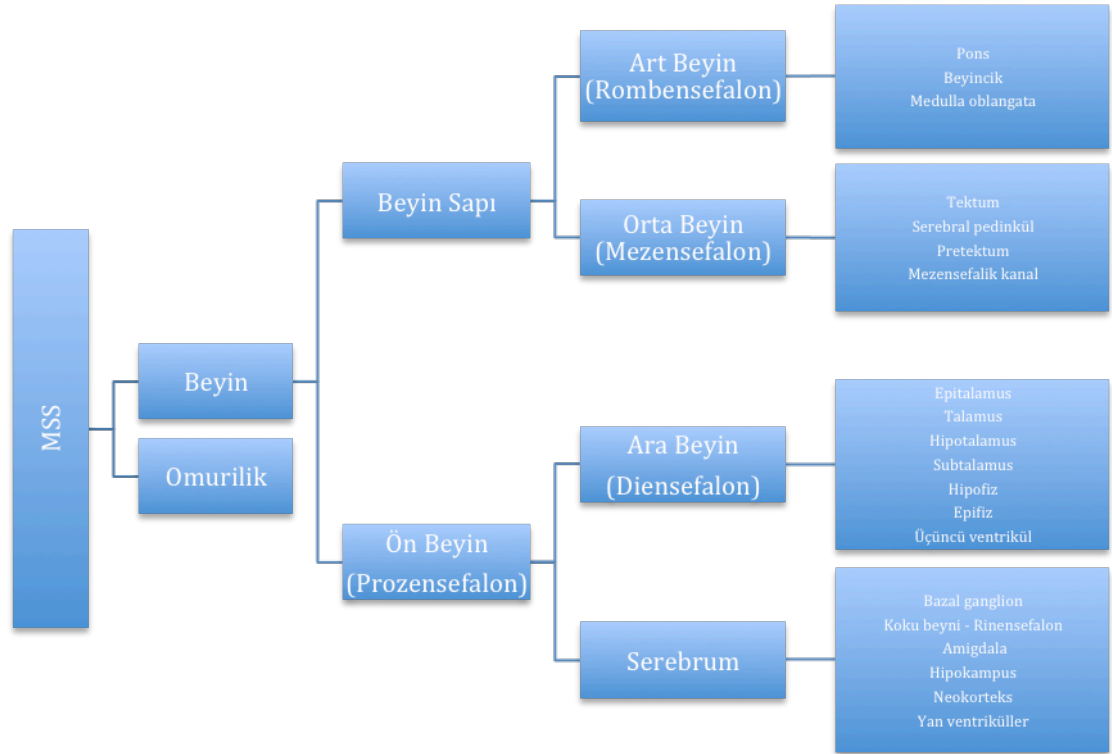
2.1.1. Merkezi sinir sistemi anatomisi

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 uyarak nöral plak oluşumunu sağlar. Daha sonra nöral oluk

oluşur. Bu oluk zamanla nöral tüp deneni yapıyı meydana getirir. Beyin ve omurilik bu nöral tüpten meydana gelir.



Şekil 1. MSS'nin anatomik kısımlarını göstermektedir.

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 gözlemlenebilir. Fakat bu hücreleri 2 temel gruba ayırabiliriz, nöronlar ve glia hücreleri.

Nöronlar

Sinir hücresi ya da nöron sinir sisteminin temel fonksiyonel birimidir. Başlıca işlevi bilgi transferini gerçekleştirmektir. İnsan sinir sisteminde yaklaşık olarak 100 milyar 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.

Glia Hücreleri

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

2.2. 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.

2.3. Makroglialar

Büyük yapıli glia hücreleridir. Farklı işlevleri olan makroglialar mevcuttur.

2.3.1. Astrositler

Nöronları destekleyen başliça gliya hücreleridir. Nöronların büyümesinde görev alırlar. Damarların dış çeperlerine gönderdikleri uzantılar yoluyla damarsal geçirgenliğı düzenler ve çevresel ortam konsantrasyonunu (madde miktarını) 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 boşluğı doldururlar.

2.3.2. Oligodendrositler

Uzantıları ile nöron hücrelerinin aksonlarını sararlar. Bu sayede myelin kılıf denen yapıyı oluştururlar. Bu kılıf nöron hücrelerinin iletim hızını artırır. Bu hücreler sadece MSS'de bulunurlar.

2.3.3. 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. Kan-Beyin bariyerinin oluşumuna katılırlar. Sadece Merkezi Sinir Sistemi'nde bulunurlar.

2.3.4. Radyal Glialar

Nörogenez, yani sinir üretiminin başlangıcında görülen gliya tipidir. Diğer sinir hücrelerine göre farklılaşmaları çok daha sınırlı olmaktadır. 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.

2.3.5. Schwann Hücreleri

Diğer sinir hücrelerinin aksine sadece Çevresel Sinir Sistemi'nde bulunurlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde görev almazlar. Oligodendrisitleri'in MSS'de yaptığı işi ÇSS'de gerçekleştirirler. Aksonları sararak miyelin kılıfı üretirler. Ayrıca nöronların büyümesi sırasında ortaya çıkan artık maddeleri temizlemekle görevlidirler.

2.3.6. 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.

2.3.7. Enterik Glialar

Sindirim sistemi için çalışan nöronların oluşturduğu öbeklerde bulunurlar. İç dengenin sağlanması konusunda önemli görevleri vardır.

2.4. 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.

2.4.1. Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü 2007 yılında beyin tümörlerini sınıflandırmıştır (1). Bu sınıflandırma tam olarak tablo 1’de belirtildiği gibidir. Buna göre beyin tümörleri 7 ana gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birinin MBT olduğu göz önüne alınırsa, PBT’nin 6 gruba ayrıldığını söyleyebiliriz.

2.4.2. Evreleme

Histolojik evrelemenin amacı, bir tümörün biyolojik davranışını tahmin edilebilir kılmaktır. Klinik uygulamada, bu evreleme sayesinde tedavi stratejileri

belirlenmektedir. Özellikle radyoterapi ve kemoterapi stratejilerinin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Daha öncede histolojik sınıflandırmalar yapılmış olmasına rağmen (39) DSÖ'nün 2007 yılında yaptığı bu sınıflama ayrıca geniş bir evreleme skalası da sunuyor. Sınıflara ayrılmış bazı tümörlerin literatürdeki vaka sayıları çok düşük olduğu için evrelemeye uygun değildir. PBT'nin evrelemesi tablo 2'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 glioblastoma 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 alması gereklidir. 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 düşüyorlar. Radyoterapi ve kemoterapi varlığında 5 yıllık sağ kalım oranları %60 – 80'i bulabiliyor (1).

Tablo 1. DSÖ Beyin tümörleri sınıflandırması

NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ

Astrositik tümörler

- Pilositik astrositom
- Pilomiksoid astrositom
- Subependimal dev hücreli astrositom
- Pleomorfik ksantrostrositom
- Diffüz astrositom
- Fibriler astrositom
- Gemisitositik astrositom
- Protoplazmik astrositom
- Anaplastik astrositom
- Glioblastoma
- Büyük hücreli glioblastoma
- Gliosarkom
- Gliomatozis Serebri

Oligodendrogial tümörler

- Oligodendrogliom
- Anaplastik oligodendrogliom

Oligoastrositik tümörler

- Oligoastrositom
- Anaplastik oligoastrositom

Ependimal tümörler

- Subependimom
- Mikropapiller ependimom
- Ependimom
- Selüler
- Papiller
- Clear hücreli
- Tansitik
- Anaplastik ependimom

Koroid pleksus tümörleri

- Koroid pleksus papilloması
- Atipik Koroid pleksus papilloması
- Koroid pleksus karsinomu

Diğer nöroepitelyal tümörler

- Astroblastom
- 3. Ventrikülün kordoid glioması
- Anjiyosentrik gliom

Nöronal ve mikst nöroglial tümörler

- Displastik gangliositoma
- Desmoplastik infantil astrositoma/ganglioglioma
- Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör
- Gangliositoma
- Ganglioglioma
- Anaplastik ganglioma
- Santral nörositoma
- Ekstraventriküler nörositoma
- Serebeller liponörositoma
- Papiller glionöronal tümör
- 4. Ventrikülün Rosette-şekilli glionöronal tümörü
- Paraganglioma

Pineal bölge tümörleri

- Pineositoma
- Orta diferansiye Pineal parankim tümörü
- Pineolastom
- Pinel bölgenin papiller tümörü

Embriyonal tümörler

- Medulloblastom
- Dezmoblastik/nodüler medulloblastom
- Aşırı nodüler medulloblastom
- Anaplastik medulloblastom
- Büyük hücreli medulloblastom
- SSS kökenli nöroektodermal tümör
- SSS nöroblastoması
- SSS gangliyonöroblastoması
- Medullaepitelyoma
- Ependimoblastoma
- Atipik teratoid /rabdoid tümör

KRANİYAL VE PARASPİNAL SINIR TÜMÖRLERİ

Şwannom

- Hücrel
- Pleksiform
- Melanotik

Nörofibrom

- Pleksiform

Perinörinom

- Perinörinom, NOS
- Malign Perinörinom

Malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST)

- Epiteloid MPNST

- Mezenkimal diferansiyasyona sahip MPNST
- Melanotik MPNST
- Glandüler diferansiyasyona sahip MPNST

MENİNGEAL TÜMÖRLER

Meningotelyal Hücre Tümörleri

- Meningotelyal
- Fibröz
- Miks
- Psammomatöz
- Anjiomatöz
- Mikrositik
- Sekretuar
- Lenfoplazmosit zengin
- Metaplastik
- Kordoid
- Clear Hücreli
- Atipik
- Papiller
- Rabdoid
- Anaplastik (Malign)

Mezenkimal Tümörler

- Lipoma
- Anjiolipoma
- Hibernoma
- Liposarkom
- Soliter Fibröz
- Fibrosarkom
- Malign Fibröz Histiositom
- Leimiyom
- Leimiyosarkom
- Rabdomyom
- Rabdomyosarkom
- Kondrom
- Kondrosarkom
- Osteom
- Osteosarkom
- Osteokondrom
- Hemanjiyom
- Epiteloid Hemanjiyoendotelyom
- Hemanjiyoperistom
- Anaplastik Hemanjiyoperistom
- Anjiyosarkom
- Kaposi Sarkomu
- Ewing Sarkom – PNET

Primer Melanositik Lezyonlar

- Diffüz Melanositozis
- Melanositoma
- Malign Melanom
- Meningeal Melanom

Meninks ilişkili diğer tümörler

- Hemanjioblastom

LENFOMALAR VE HEMOPOETİK TÜMÖRLER

- Malign Lenfomalar
- Plazmositom
- Granülositik sarkom

GERM HÜCRELİ TÜMÖRLER

- Germinom
- Embriyonel sarkom
- Yolk Sac tümörü
- Koryokarsinom
- Teratom

- Matür
- İmmatür
- Malign Teratom

Miks germ gücreli tümör

SELLAR BÖLGE TÜMÖRLERİ

- Kaniyofarinjiyom
- Adamantinomatöz
- Papiller
- Granüler Hücreli tumor
- Pituasitom
- Adenohipofizin Spindle Hücreli onkositomu

METASTATİK TÜMÖRLER

Tablo 2. DSÖ Beyin tümörleri evrelemesi.

Astrocytic tumours	I	II	III	IV
Subependymal giant cell astrocytoma	✓			
Pilocytic astrocytoma	✓			
Pilomyxoid astrocytoma		✓		
Diffuse astrocytoma		✓		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		✓		
Anaplastic astrocytoma			✓	
Glioblastoma				✓
Giant cell glioblastoma				✓
Gliosarcoma				✓
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		✓		
Anaplastic oligodendroglioma			✓	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		✓		
Anaplastic oligoastrocytoma			✓	
Ependymal tumours				
Subependymoma	✓			
Myxopapillary ependymoma	✓			
Ependymoma		✓		
Anaplastic ependymoma			✓	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	✓			
Atypical choroid plexus papilloma		✓		
Choroid plexus carcinoma			✓	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	✓			
Chordoid glioma of astrocytoma		✓		
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours				
Gangliocytoma	✓			
Ganglioglioma	✓			
Anaplastic ganglioglioma			✓	

Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	✓			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	✓			
Central neurocytoma		✓		
Extraventricular neurocytoma		✓		
Cerebellar liponeurocytoma		✓		
Paraganglioma of the spinal cord	✓			
Papillary glioneuronal tumour	✓			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	✓			
Pineal tumours	I	II	III	IV
Pineocytoma	✓			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		✓	✓	
Pineoblastoma				✓
Papillary tumour of the pineal region		✓	✓	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				✓
CNS primitive neuroectodermal tumour(PNET)				✓
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				✓
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	✓			
Neurofibroma	✓			
Perineurioma	✓	✓	✓	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		✓	✓	
Meningeal tumours				
Meningioma	✓			
Atypical meningioma		✓		
Anaplastic / malignant meningioma			✓	
Haemangiopericytoma		✓		
Anaplastic haemangiopericytoma			✓	
Haemangioblastoma	✓			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	✓			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	✓			
Pituicytoma	✓			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	✓			

2.4.3. 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 (40). 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 (40). 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.

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(40).

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

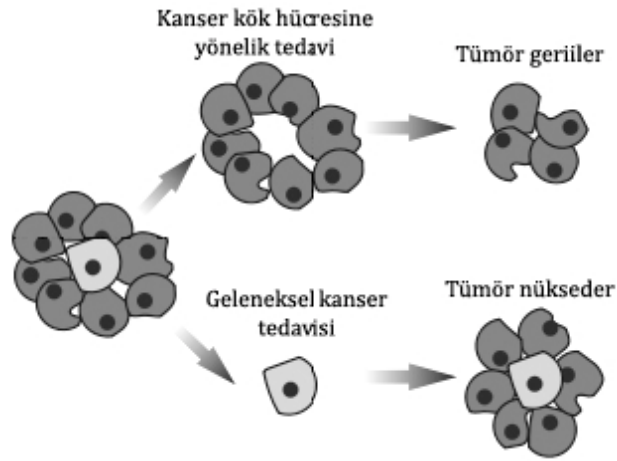
daha eğilimlidir ve insidans her iki cinsiyette de benzerdir. Ayrıca erişkinlerde nöroepitelyal doku tümörleri malign olma eğilimi gösterirken, çocuk yaş grubunda germ hücreli tümörler daha malign seyrederler (40).

2.5. KÖK HÜCRE

Genel tabir ile; kendi kendini yenileyebilen ve vücuttaki her hücre tipine dönüşebilen hücrelere kök hücre denir. 2006 yılına kadar genel kanı kök hücreler herhangi bir hücre tipine farklılaştıktan sonra tekrar kök hücre özelliklerini kazanamayacağı yönündeydi. 2006 yılında yayınlanan bir makalede erişkin fibroblastlar yeniden programlanarak kök hücre özelliklerini geri kazanmıştır (23). Doğal olarak bu çalışma kök hücre kavramını 2'ye böldü. Bu kavramlardan ilki her zaman bilinen “Embriyonal Kök Hücre, EKH” ve diğeri ise 2006 yılında ortaya çıkan “İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre, IPKH” kavramlarıdır. IPKH keşfi, farklılaşmış bir hücrenin tekrar kök hücreye dönüşebileceğini göstermenin yanında kök hücre araştırmaları için bir dönüm noktası olmuştur. Daha öncesinde yapılacak bir kök hücre çalışması için EKH'ye ihtiyaç duyuluyordu. EKH kullanımı da beraberinde etik sorunlar ortaya çıkarıyordu.

2.5.1. Kanser Kök hücresi nedir?

Son yıllarda kanser dokularının kendine ait kök hücreye sahip olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Bu konu üzerine yapılan ilk çalışmada CD34+ / CD38- (CD34 hematopoetik kök hücre belirteci, CD38 farklılaşmış hücre belirteci) lösemi hücrelerini NOD/SCID farelere aşıladıktan sonra yaptıkları flow sitometri analizinde lösemik hücrelerin CD34, CD38 ve CD33 eksprese ettiklerini tespit ettiler. Bu üç hücre yüzey belirtecine ek olarak CD34+ / CD38- hücrelerin %2 oranında varlığını devam ettirdiğini tespit ettiler (4). Akabinde yapılan birçok çalışmada farklı tümör dokularında kanser kök hücresinin varlığını destekleyen sonuçlar saptanmıştır (5-11).



Şekil 2. Kanser tedavisinde iki farklı yaklaşım (http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer_stem_cell)

Bir tümöre cerrahi, radyoterapik ve kemoterapik tedavi rejimleri uygulandıktan sonra tümör belirteçleri ortadan kalkmasına rağmen kanser zaman içerisinde nüksedebilmektedir. Kanser kök hücrelerinin varlığı bu nüksün ana sebeplerinden biri olarak öne sürülmektedir. KKH geleneksel tedavi stratejilerine dirençli oldukları için bu stratejiler hastalığı elimine etmiş gibi görünse de sağ kalan KKH hastalığın daha agresif ve tedavilere daha dirençli nüksmesine neden oluyor (Şekil 2). Ayrıca hasta geleneksel tedavinin toksik etkilerine de maruz kalıyor (17). Yapılan çalışmalar KKH'ni hedef alan tedavi stratejilerinin geleneksel stratejilere göre daha başarılı olduğunu göstermiştir (18-20). Son zamanlarda KKH'ni hedef alan tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Geliştirilen stratejiler KKH'nin mikro çevresini, hücre yüzey belirteçlerini, sinyal yollarını, ATP-binding cassette (ABC) taşıyıcılarını hedef almaktadır (20-22).

2.5.2. Kök hücre çalışmalarındaki etik sorunlar ve ülkemizdeki yasal düzenlemeler

Türkiye'nin de altına imza attığı Oviedo Sözleşmesinin (Biyoloji ve tıbbın uygulanması bakımından insan hakları ve insan haysiyetinin korunması sözleşmesi) 18. Maddesi aşağıdaki gibidir (41).

Article 18 - Research on embryos in vitro

1. Where the law allows research on embryos in vitro, it shall ensure adequate protection of the embryo.
2. The creation of human embryos for research purposes is prohibited.

Yukarıda belirtilen 2. maddeye göre araştırma amaçlı embriyo oluşturulması kesinlikle yasaklanmıştır. 1. maddeye göre ise; bir ülkenin yasaları eğer in vitro embriyo çalışmalarına izin veriyorsa, aynı yasalar embriyoyu uygun şekilde koruma altına almalıdır, deniyor.

Şu an içi ülkemizde kök hücre araştırmalarını ve uygulamalarını yasaklayan bir kanun yoktur. Fakat Sağlık Bakanlığı 2006 yılında yayınladığı “Embriyonik Olmayan KH Çalışmaları Kılavuzu” genelgesi ile embriyonik olmayan kök hücre çalışmalarına bir düzenleme getirmiştir (42). Genelge ile çalışmaların yapılabileceği merkezler, yürütülme şekli, çalışmaların başlatılabilmesi için gerekli koşullar ve yapılan araştırmaların değerlendirilebilmesi için bir merkez (Kök Hücre Nakilleri Bilimsel Danışma Kurulu) kurulması öngörülmüştür.

Öte yandan Sağlık Bakanlığı 2005 yılında bir genelge ile EKH çalışmalarına yasak getirmiştir (43). Genelgenin ilgili bölümü aşağıdaki gibidir.

“...Bakanlığımızca embriyonik kök hücre araştırmaları konusunda, çağdaş bilim ve kamu vicdanı gereklerine göre yapılması gereken hukuksal düzenlemelerin sonuçlandırılması amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir. Yapılan çalışmalarda, söz konusu araştırmalar AB mevzuat uyumu kapsamında hukuki, kültürel ve etik yönleriyle ele alınmaktadır.

Bakanlığımızca bu konudaki çalışmalar sonuçlandırılınca kadar embriyonik kök hücre araştırmalarının yapılmaması hususunda...”

Her ne kadar bu genelgeler belirli düzenlemeler getirse de kanunî bir ceza öngörmemektedir.

Şu anki şartlarda yasal olarak embriyonik kök hücrelerinin elde edilebileceği yer üremeye yardımcı tedavi merkezleridir. Üremeye yardımcı tedavi merkezleri yönetmeliğinin 18. maddesinde aşağıdaki ifade geçmektedir (44).

Madde 18 (4)Kendilerine ÜYTE uygulanacak eşlerden alınan yumurta ve spermiler ile bunlardan elde edilen embriyoların bu yönetmelikle belirlenen esaslar dışında her ne maksatla olursa olsun bulundurulması, kullanılması, nakledilmesi ve satılması yasaktır. Bu yasağa uymadığı tespit edilen merkezlerin faaliyetleri ile merkez dışında aynı faaliyetlerde bulunan yerlerin faaliyeti valilikçe derhal durdurulur.

Yönetmelikle belirtilen bu hususlara uyulmaması durumunda cezai bir sorumluluk olmamakla birlikte idari yaptırım uygulanması gereklidir.

2.5.3. IPKH programlaması

IPKH oluşturmak için yapılan ilk çalışmada 4 farklı gen kullanıldı. Bunlar POU5F1, SOX2, MYC ve KLF4 idi. Bu çalışmada retroviral bir aktarım sistem kullanılmıştı (23). Akabinde yapılan başka bir çalışmada farklı gen grubu kullanılarak, Oct4, SOX2, NANOG ve LIN28, IPKH elde edilebilmiştir (24).

Transkripsiyon Faktörleri

IPKH programlamasında kullanılan POU5F1, SOX2, MYC, KLF4, NANOG ve Lin28 genlerinin hepsinin ortak özelliği transkripsiyon genleri olmalarıdır. Transkripsiyon genlerinden meydana gelen proteinler tek başlarına ya da başka proteinler ile beraber, başka bir genin ya da genlerin transkripsiyon düzeyini değiştirirler. Bu değişim transkripsiyonu artırma ya da azaltma yönünde olabilir. Bir genin transkripsiyonunda artırılma söz konusu ise transkripsiyonu arttıran proteine/gene aktivatör, azaltma söz konusu ise transkripsiyonu azaltan proteine/gene baskılayıcı ya da represör denir (45-47).

POU5F1

OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) geninin farklı adlandırmaları olmasına rağmen (OCT3, OCT3/4, OTF3, OTF4), HGNC tarafından POU5F1 (HGNC Adı: POU class 5 homeobox 1, HGNC ID: 9221) olarak isimlendirilmiştir. Homeobox gen ailesinin POU alt sınıfına ait bir gendir. 360aa oluşan ve 38571 Da ağırlığında bir protein meydana getirir. Hücrede, çekirdekte ve sitoplazmada lokalizedir. 2 farklı domain barındırır; 75aa uzunluğundaki POU-özellikli domain ve 60aa uzunluğundaki Homeobox domaini. POU5F1 proteini distal ya da proksimal transkripsiyon başlangıç bölgelerindeki oktamer motiflerine bağlanarak gen ekspresyonunu artırır (48).

POU5F1 geni günümüzde IPKH programlamada kullanılması ile öne çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda pluripotent insan embriyonik kök hücresinde, pluripotent fare embriyonik kök hücresinde ve germ hücrelerinde ekprese olduğu bulunmuştur (25,26,49-52). Embriyonik hücrelerdeki farklılaşma düzeyi arttıkça POU5F1 geninin ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (53). Fare deneylerinde POU5F1 geni

nakavt edilmiş farelerin gelişimin erken safhasında “inner cell mass” yetersizliği sebebi ile öldüğü gösterilmiştir (27). Bu yetersizlik POU5F1’in embriyonik kök hücrelerinin yenilenmesindeki önemli rolüne bağlanmıştır (54).

POU5F1 gen ekspresyon düzeyleri bazı kanserlerde artmış olarak tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları embriyonel karsinom (55), teratom (56), seminom (57), mesane kanseri (58), Ewing’s sarkom (59) ve gliomadır (60).

Gliomalar üzerinde yapılan bir çalışmada POU5F1 geni 41 glioma dokusunun hepsinde ekspresyonu artmış olmasına rağmen 5 kontrol beyin dokusunda anlamlı bir ekspresyon artışına rastlanmamıştır. Yine aynı çalışmada yüksek dereceli gliomalarda ekspresyon düzeylerinin düşük dereceli gliomalara nazaran daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiş. İmmünohistokimyasal boyamada yüksek dereceli gliomalar düşük dereceli gliomalar ile karşılaştırıldıklarında, hücre çekirdeklerinin yüksek dereceli gliomalarda daha koyu boyandığı gösterilmiştir. Normal beyin dokusunda herhangi bir boyama olmadığı görülmüş (60).

Akciğer kanserleri üzerinde yapılan bir çalışmada, KKH belirteci olan CD133+’liğine göre hücreler ayrılmış ve kıyaslama yapılmıştır. CD133+ kanser hücreleri, CD133- hücelere göre daha yüksek düzeyde POU5F1 eksprese ettikleri, in vitro ve in vivo deneylerde CD133+ hücrelerin daha proliferatif ve invaziv seyrettikleri, kemoterapi ve radyoterapiye daha dirençli oldukları tespit edilmiş. CD133+ kanser hücresi enjekte edilen SCID farelere POU5F1 si-RNA uygulandıktan sonra, kemoterapiden bağımsız olarak, tümör kitlesinde anlamlı derecede küçülme gözlenmiştir (61).

SOX2

SOX2 (SRY [Sex Determining Region-Y]-Box 2, HGNC ID: 11192) geni intronu olmayan ve SOX2-OT geninin intronunda yerleşik bir gendir. 317aa ve 34310 Da ağırlığında bir protein kodlar. Hücrenin çekirdeğinde lokalizedir. Sendromik mikroftalmi (MIM:206900) ile ilişkili bulunmuştur (62).

SOX2 proteini, totipotent “inner cell mass” kök hücreleri için ve diğer pluripotent kök hücreleri için kritik öneme sahiptir. SOX2 geninin bu hücrelerden ablasyonu embriyonun erken dönemde ölümü ile sonuçlanmıştır (63). Santral sinir sisteminin gelişiminde önemlidir (64). Öyle ki birçok farklı türde embriyonun gelişimi sırasında sinir sistemi SOX2 ile işaretlenmektedir (65-68). SOX2 geni pozitif olarak nöral kök

hücrelerinin yenilenmesini arttırdığı (69) ve SOX2 geninin fazla ekspresyonunun nöral hücre farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (70-72).

SOX2 geni bir transkripsiyon faktörüdür ve POU5F1 geni ile beraber birçok genin ekspresyon düzeylerini etkiler (73). Ayrıca IPKH programlamada kullanılan genlerden biridir (23).

SOX2 geninin malign gliomalarda ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (74,75). Başka bir çalışmada astrosit hücre markırı olan “Glial Fibriler Asidik Protein” eksprese eden hücrelerin aynı zamanda aşırı SOX2 eksprese ettikleri de gözlenmiş. Aynı artışın medullablastom ya da pineablastom gibi beyin tümörlerinde olmadığı gözlenmiş (76). RNAi aracılı SOX2 geni nakavt edilmiş glioblastoma hücrelerinde proliferasyonda azalmaya neden olduğu gösterilmiş (77). Bu azalmanın cyclinD1 transkripsiyonundaki değişimlerden kaynaklanabileceği öngörülmüştür (78).

Gliomadaki artmış SOX2 ekspresyonuna rağmen mide kanserlerinde SOX2 protein düzeyleri düşük bulunmuştur (79) ve mide tümör dokusundaki ekzojen SOX2 artışı hücre proliferasyonunda azalma ile sonuçlanmıştır (80).

NANOG

NANOG (Nanog homeobox, HGNC ID: 20857) geni 4 ekzondan oluşan 12. Kromozom üzerinde yerleşik bir gendir. 305 aa’ten oluşan 34620 Da ağırlığında bir proteini kodlar. “Nanog Homeobox” olarak isimlendirilir. Hücre çekirdeğinde lokalizedir (81).

Nanog proteini EKH devamı ve yenilenmesi için gerekli bir proteindir. Nanog proteinindeki azalma EKH’nin farklılaşması ile sonuçlanmıştır (31,82). IPKH programlamada (23) kullanılan Nanog proteini, daha sonradan yapılan çalışmalarda IPKH üretimi için elzem olmasa da, NANOG eksprese eden klonların pluripotent özelliklerinin daha iyi olduğu görülmüştür (32,83-86). Ayrıca Nanog ekspresyonu olmayan EKH’lerin proliferasyonunun kısıtlandığı ve farklılaşmaya meyilli olduğu görülmüştür (87).

Mide adenokarsinomlarında yüksek Nanog protein düzeylerinin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (33). Pankreas adenokarsinomlarında ekspresyon düzeyinin arttığı, proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu tetkilediği, kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (34,88,89).

Evre 2, 3 ve 4 astrositik tümörler üzerinde yapılan bir çalışmada POU5F1, SOX2 ve Nanog ekspresyonlarının mRNA ve protein düzeyinde arttığı tespit edilmiş. Bu ekspresyon artışları aynı hücre popülasyonlarında gözlenmiş. Bu hücrelerin %50'den fazlasının nöral kök hücre markırları olan Nestin ve CD133 de eksprese ettikleri tespit edilmiş (90).

MYC

MYC geninin farklı isimlendirmeleri olmasına rağmen HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) tarafından “v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog” olarak isimlendirilmiştir ve sembolü “MYC” olarak belirlenmiştir (91). MYC, 8. kromozom üzerinde yerleşmiş, 3 ekzondan oluşan, translasyon sonucu 454aa'lık bir protein meydana getiren bir genidir.

MYC geni N-terminal ucunda 140aa'lık bir transaktivasyon domaini ve C terminal ucunda heliks-loop-heliks lösin zincir domaini barındırmaktadır (92). MYC proteini ve MAX proteini dimer oluşturur ve DNA'da belirli bölgelere bağlanarak birçok genin ekspresyon düzeylerini etkiler (93). Genom boyunca yapılan çalışmalarda genom üzerinde 10000'den fazla MYC bağlanma bölgesi tespit edilmiştir (30,94-97). Bazı çalışmalar MYC proteinin P-TEFb'yi bağlayarak RNA Polimeraz enzimidaki blokajı kaldırdığını ve bu sayede transkripsiyonu aktive ettiğini bildirmiştir (98,99).

1908 yılında Ellermann ve Bang lösemi ve sarkom geliştirmiş tavuklardan hücre içermeyen sıvı almışlar ve bu sıvıları sağlıklı tavuklara enjekte etmişlerdir. Gözlemlerinde sağlıklı tavukların da zaman içerisinde lösemi ve sarkom geliştirdiklerini görmüşlerdir. Sonuç olarak bu tümörlerin aktarılabilir olduğunu göstermişlerdir (100). Süregelen 50 yıl boyunca bu aktarılabilirlik çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. 1960'lı ve 1970'li yıllarda 4 farklı retrovirüsün (MH-2, MC29, CMII ve OK10) monosit ve makrofaj hücrelerini tümör hücrelerine dönüştürdüğü bulunmuştur (101,102). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu dört farklı virüsün yapısında ortak olan v-myc (insandaki homoloğu MYC) geni keşfedilmiştir. Bu gen tümör dönüşümüne sebep olmayan retrovirüslerde tespit edilmediği için kanser dönüşümüne bu genin sebep olabileceği öne sürülmüştür. (103-105).

IPKH keşfinde kullanılan 4 transkripsiyon faktöründen biri de MYC'dir (23). Daha sonra yapılan çalışmalarda MYC geni kullanılmadan da IPKH elde edilebildiği gösterilmiştir. IPKH üretmedeki asıl amacın somatik hücrelerden EKH benzeyen hücre elde etmek olduğu düşünülünce, üretilen hücrelerin EKH özelliklerini ne kadar

yansıttığı önemli olmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı transkripsiyon faktörleri kullanarak IPKH elde edilmekte ve bu hücrelerin EKH özelliklerini ne kadar yansıttığı değerlendirilmektedir. Bu bağlamdan ele alındığında MYC geni kullanılmadan elde edilen IPKH hücrelerin, MYC geni kullanılarak elde edilenlere oranla EKH özelliklerini daha az yansıttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada POU5F1 ve SOX2 genlerinin IPKH oluşumu için mecburi, MYC, NANOG, KLF4 ve Lin28 genlerinin alternatif destekleyici faktörler olarak sunulmuştur (24,106). Sonuç olarak MYC kullanımı IPKH oluşturmak için zorunlu olmasa da, kullanılması halinde oluşan IPKH'lerin daha kaliteli olduğu görülmüştür.

KLF4

KLF4 (HGNC approved name: Kruppel-like Factor 4; HGNC ID: 6348) geni 9. kromozom üzerinde lokalize 5 ekzondan oluşan bir gendir. Genin ürünü 513 aa'lık bir transkripsiyon faktörü olan KLF4 proteindir. Protein üzerinde C2H2 tipi çinko parmak yapısı bulunmaktadır (<http://www.uniprot.org/uniprot/O43474#ref11>).

KLF4 geninin vücutta gastrointestinal sistem (35,37) başta olmak üzere akciğer(37), testis (37), deri (36), timus (107) ve vasküler endotel hücrelerinde (35) ekprese olduğu gösterilmiştir. In situ hibridizasyon çalışmalarında KLF4 geninin gastrointestinal sistemde ve deride epitel hücrelerinde ekprese olduğunu göstermiştir (36,37). Ayrıca bu dokularda post-mitotik hücrelerde yani farklılaşmasını tamamlamış hücrelerde KLF4 ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir (36,37). Benzer olarak timüs dokusunda epitel hücre gelişiminin tamamlanmasında da ekspresyon artışının önemli olduğu gösterilmiştir (107). Özetle bu çalışmalar KLF4'ün epitel hücrelerinin farklılaşması ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

KLF4 geni yamanaka ve ark tarafından IPKH oluşturmada kullanılmış faktörlerden biridir (23). Daha sonra yapılan çalışmalarda IPKH oluşumu için zorunlu olmadığı gösterilmiş olsa da (24), EKH farklılaşmasında ve yenilenmesinde rolü olduğunu destekleyen yayınlar da mevcuttur (108).

KLF4 geninin kanserdeki ekspresyonu ve kanser üzerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmalar farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Kanser köken aldığı doku türüne göre KLF4 geninin ekspresyon düzeyleri farklılık göstermektedir.

KLF4 geninin epitel hücrelerinin farklılaşmasında önemli rolleri olduğunu yukarıda belirtmiştik. Kanser hücrelerinin farklılaşmamış hücreler olduğunu göz önüne alırsak

epitel hücrelerinden köken alan tümörlerde KLF4 geninin ekspresyon düzeylerinde azalma beklenmesi doğaldır. Özefagus kanseri üzerine yapılan bir çalışmada KLF4 ekspresyon düzeylerinin azaldığı da gösterilmiş ve ektopik olarak KLF4 düzeyi arttırıldığı zaman kanserin tümör özelliklerinde azalma olduğu gösterilmiştir (2). Benzer bulgular gastrik tümörlerde (109), kolorektal kanserlerde (110), akciğer kanserinde (111) ve deri kanserlerinde (112) de gözlenmiştir. KLF4 geni bu tümörler için tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmektedir.

Yukarıdaki örneklere zıt olarak Meme kanserinde ve orofarinks kanserlerinin çoğunda onkogen özellikte davrandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. KLF4 geni ekspresyon düzeylerinin invazif ve preinvazif meme kanserlerinde (38) ve orofarenks kanserlerinin (113) çoğunda ekspresyon düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Gastrointestinal sistemin diğer tümörlerinde KLF4 geni tümör baskılayıcı gen özellik gösterdiği yayınlarda tespit edilmişti. Oral bölge tümörlerinde ortaya çıkan bu farklılığın nedeni olarak farklı teoriler ortaya atılmıştır. Bunlar KLF4 geninin farklı hücre tiplerinde farklı yollar üzerinden etki edebilmesi ve oral bölgede oluşan tümörlerin farklı hücre tiplerini içinde barındırması olarak belirtiliyor (113).

Bu çalışmada primer beyin tümörlerinden olan gliomalarda Yamanaka faktörleri olarak da adlandırılan KLF4, SOX2, NANOG, POU5F1 ve MYC genlerinin ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TÜRÜ

Araştırma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu araştırma Ocak 2014 Temmuz 2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Erciyes Üniversitesi Nöroşirürji Anabilim Dalı ve 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

Çalışmaya dahil edilen hastalar Erciyes Üniversitesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'na başvurmuş ve beyinde tümör olduğu saptanmıştır. 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 (Evre 3 ya da evre 4 astrositom) olarak tanı koyulmuştur. Yukarıdaki özellikleri taşıyan hastalar bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya 50 adet hasta dahil edilmiştir. 7 hastanın parafin bloklarından elde edilen materyaller analiz için uygun olmadığından analizlere dahil edilmemiştir. Çalışma 43 hasta ile tamamlanmıştır.

3.3.2. Kontrol grubu

Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu hastalar beyin tümörü ile ilgisi olmayan farklı bir nedenle ölen kişilerdi. Bu bireylerden otopsi sırasında normal beyin dokusu alınmıştır ve parafin bloğa gömülmüştür.

Çalışmaya 25 adet kontrol grubu hastası dahil edilmiştir.

3.4. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.4.1. Demirbaş Malzemeler

- Mikropipetler; 10'luk, 100'lük, 1000'lik (DragonLab)
- Vorteks (IKA Vortex Genius 3)
- Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)
- -20 Buzdolabı (Beko)
- +4 Buzdolabı (Ariston)
- LabCycler (Sensoquest, Göttingen, Germany)
- Distile Su Cihazı (Diret-Q.UV Millipore)
- Isıtıcı Blok (Cleaver-Elite)
- LightCycler 480 II ()
- **NanoDrop 2000- Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazı (ThermoScientific, U.S.A.)**
- **Mikro Dalga Fırın (Arçelik 581)**
- **Plate Perfect Spin (Peqlab, Erlangen, Germany)**

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 proplar

- 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 Cyclor 480 cihazı ile uyumlu plate

- LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche)

Metilasyon Analizi için gerekli sarf malzemeler

Parafin dokudan Genomik DNA izolasyon kiti

- EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (**Qiagen**)

Genomik DNA'nın bisülfite ile dönüşüm kiti

- EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (**Qiagen**)

KLF4 geni promotör bölgesine özgü PCR kiti

- PyroMark PCR Kit (**Qiagen**)

PCR ile çoğaltılan bölgenin dizisinin çıkarılması için gerekli kit

- PyroMark CpG Assay (**Qiagen**)

Pyrosekans ile dizi çıkarma işlemi sırasında kullanılacak materyaller

- PyroMark Gold Q24 Reagents (**Qiagen**)

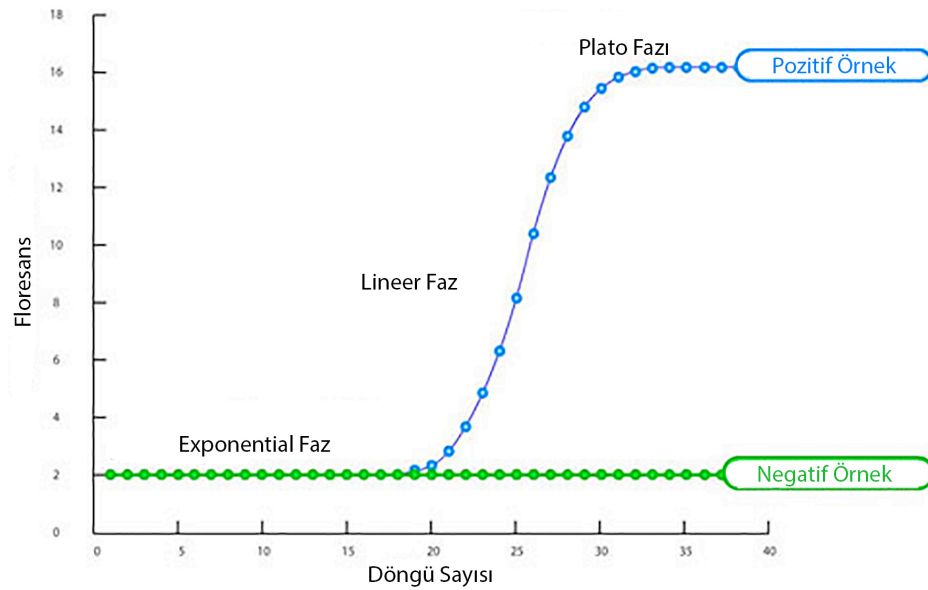
Çıkarılan dizinin analizi için kullanılması gereken kontrol DNA'ları

- EpiTect PCR Control DNA Set (**Qiagen**)

3.5. YÖNTEMLER

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

Real-Time PCR hem kalitatif hem de kantitatif analizler için alternatif bir yöntem sunar. Tek bir tüpte tek bir cihazla amplifikasyon ve floresan sinyalin deteksiyonu ile oluşan veriyi eş-zamanlı kaydetme imkânı verir. PCR ürünleri floresan özellikte ve floresans döngü sayısının üzerine kurulmuş ise, Şekil 3'deki gibi bir eğri ortaya çıkar.



Şekil 3. Gerçek zamanlı PZR'nin fazları.

Bu eğride x eksenini döngü sayısını, y eksenini floresan ölçüm değerini temsil etmektedir.

Exponential faz, aynı zamanda geometrik faz olarak da bilinir. Bu evrede PCR için koyulan malzemeler ortamda bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle PCR ürünü verimli bir şekilde geometrik olarak her bir döngüde ikiye katlanmaktadır.

Lineer faz ortamdaki malzemelerin tükenmeye başlaması ile başlar. Bu evrede artık PCR ürünü geometrik olarak ikiye katlanmamaktadır. Her bir döngüde PCR ürünün artma miktarı düşer.

PCR içine koyulan malzemelerin tükenmesi ile artık PCR reaksiyonu gerçekleşmez. Bu evreye plato fazı denir.

PCR ürünüde geometrik artış nedeniyle Real time PCR analizi için kullanılacak en doğru faz exponential fazdır.

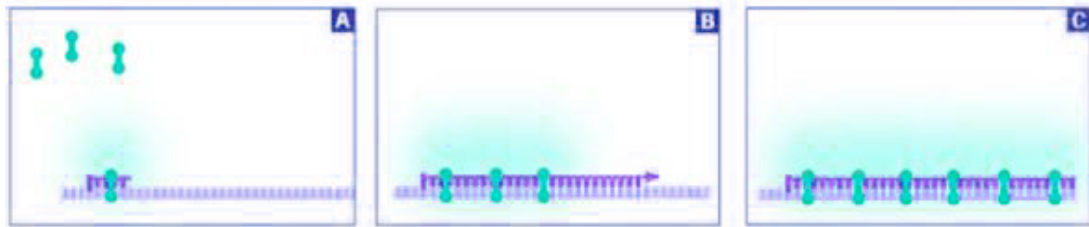
3.5.2. Real Time PCR Formatları

Real-Time PCR sistemleri floresan boyaları saptar ve bu floresan sinyal ile reaksiyondaki PCR ürünü arasında bir ilişki kurar. Florometrik olarak PCR ürünlerinin saptanması ve değerlendirilmesi için birtakım yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler 2 ana gruba ayrılabilir. Dizi-bağımsız saptama yöntemleri ve dizi spesifik prob bağlanma yöntemleri. Her birinin kendi kullanım alanı ve sınırlamaları bulunmaktadır.

Dizi Bağımsız saptama yöntemleri

Bu yöntem SYBR Green I gibi çift zincir DNA moleküllerine bağlanan floroforlara dayalı bir yöntemdir (Şekil 4).

SYBR Green I çift zincirli DNA'nın minor boşluğuna bağlanır. Serbest halde iken az miktar da olsa ışımaya yapmasına rağmen bağlanma ile birlikte ışımaya artar (114).



Şekil 4. SYBR Green I, DNA dizisinden bağımsız olarak çift iplikli DNA'ya bağlanır ve ışımaya verir.

SYBR Green I diziye spesifik olmadığı için herhangi bir çift zincirli DNA ile beraber ışımaya verebilir. Primer dimerleri ve non-spesifik ürünler istenmeyen ışımaya neden olarak yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olurlar. Bu nedenle bu yöntem ile yapılan çalışmalarda primer dizaynlarına özen gösterilmesi gereklidir.

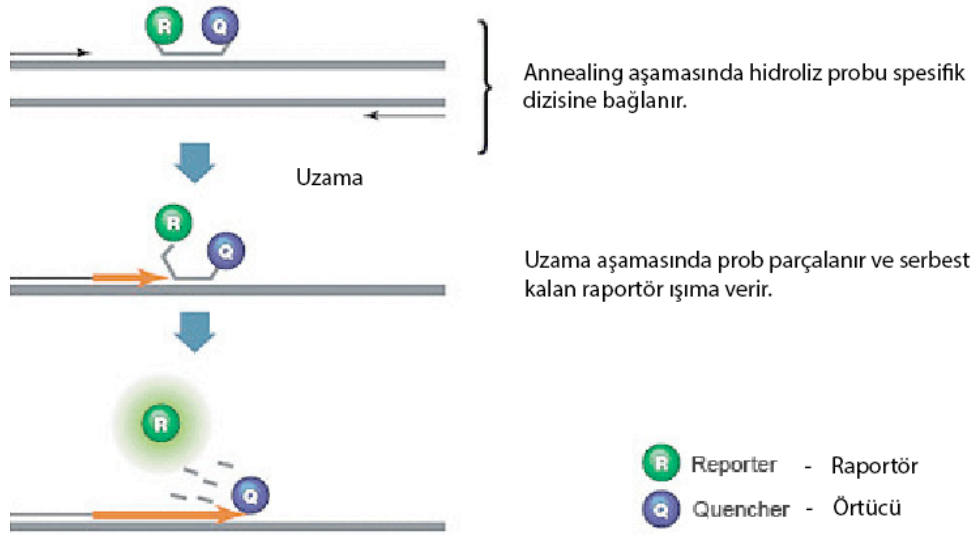
Dizi-Bağımlı saptama yöntemleri

Dizi bağımlı saptama yöntemlerinin temeli hedef PCR'daki tamamlayıcı diziye bağlanan oligonükleotitlere dayanır. Dizayn edilen proplar sadece spesifik dizilere bağlanır. En sık kullanılan proplar hidroliz probları, hibridizasyon probları ve tek işaretli (simple prob) problardır. Propların özelliği RT-PCR cihazı tarafından ölçülebilecek floroforlar takılı olmasıdır.

Işıma sadece dizayn edilen spesifik diziye bağlanma ile oluşacağından reaksiyon oldukça güvenilirdir ve primer dimerleri, PCR yan ürünü gibi faktörlerden etkilenmez.

Hidroliz (Taqman) Problemleri

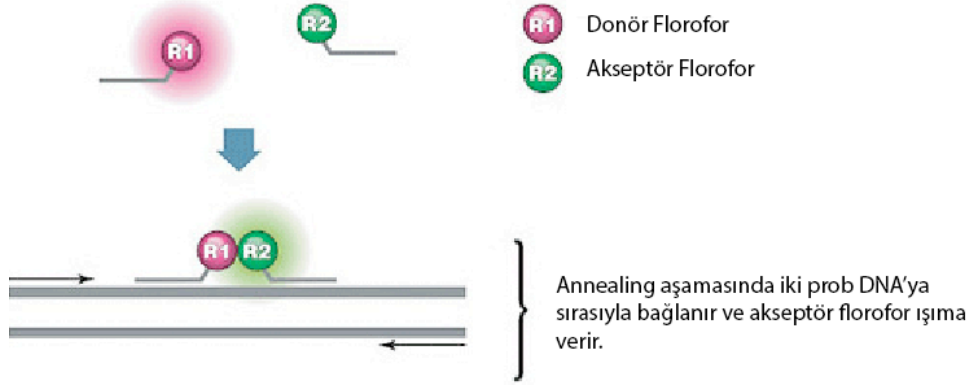
Bizim çalışmamızda da bu prob tipi kullanıldı. Hidroliz problemleri ile RT-PCR uygulaması sırasında sekans spesifik PCR primerlerine ek olarak floresan işaretlenmiş oligonükleotid bir prob da vardır. Bu probun özelliği 5' ucunda "Reporter" ve 3' ucunda "Quencher" bulunmasıdır. Bu prob spesifik bölgesine bağlı olmadığı zaman ışığa verecek olan raporör ucunun ışınması, 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 ışığa verir (Şekil 5).



Şekil 5. Hidroliz probunun çalışma mantığı.

Hibridizasyon Problemleri

Bu dizayn da PCR primerlerine ek olarak 2 adet Dizi-spesifik oligonükleotid prob kullanılır. Bu problemler DNA üzerinde bir birlerinin ardı sıra gelecek şekilde dizayn edilirler. İlk probun 3' ucunda donör boya ve ikinci sıradaki probun 5' ucunda akseptör boya mevcuttur. Bu iki prob DNA'ya bağlandıklarında iki boya arasında floresan rezonans enerji transferi (fluorescence resonance energy transfer; FRET) oluşarak akseptör floroforun ışığa yapması sağlanır (Şekil 6).



Şekil 6. Hibridizasyon problemleri dizi üzerinde art arda bağlanarak ışıma verir.

Uygulama Prosedürleri

Parafin Dokudan RNA izolasyonu

3.6. Deparafinizasyon

- 1,5 ml'lik reaksiyon tüpüne 10 µm kalınlıktaki 100 mm² alana sahip parafin doku koyuldu.
- 800 µl ksilen eklenip kısa aralıklarla 3 defa vortekslendi.
- 400 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 16000xg hızında 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 1000 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 16000xg hızında 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- Kalan etanol kalıntılarında kurtulmak için 55°C'de 10 dakika (gerekirse 20 dakika) kapağı açık bir şekilde bekletildi.

3.7. RNA İzolasyonu

- Deparafinizasyon aşaması sonucunda elde edilen pellete aşağıdaki maddeler sırayla ya da üçünden bir karışım elde edilerek eklendi.
 - 100 µl RNA tissue lysis buffer
 - 16 µl %10'luk SDS
 - 40 µl Proteinaz K

- Vortekslendi. Kısa santrifüj yapıldı.
- 30 dakika 850C’de inkübe edildi. Bu sırada 600 rpm ‘de çalkalandı.
- Kısa santrifüj yapıldı. 550C’nin altına soğuyana kadar bekledi.
- 80 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi. Kısa santrifüj yapıldı.
- 550C’de 30 dakika bekletildi. Bu sırada 600 rpm’de çalkalandı.
- Karışımın içerisine;
 - 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 (yaklaşık 900 µl).
- 30 sn 6000xg’de santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü değiştirildi. 16000xg’de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü değiştirildi. 100 µl DNase working solution eklendi. 150C - 250C arasında 15 dakika bekletildi.
- 500 µl wash buffer 1 eklenip 6000xg’de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- 500 µl wash buffer 2 eklenip 6000xg’de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. (Bu aşama 2 defa yapıldı.)
- Hiçbir ekleme yapılmadan 16000xg’de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtre tüpü 1.5 ml’lik tüpe yerleştirildi.
- 30 µl RNA elution buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
- 6000xg’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Filtre tüpü atıldı.
- Ürün -20 0C’de muhafaza edildi.

3.8. 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 650C'de 5 dakika beklemesi için termal cyclers 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 4'deki miktarlara göre karışım hazırlandı.
- Karışıma eklenecek ürün miktarları o anki çalışmada kullanılan hasta sayısını göre belirlendi. Her bir ürün için karışıma eklenecek miktar Tablonun son sütunundaki formüle göre hesaplanarak eklendi.
- Tablo 3'e göre hazırlanan karışım her bir reaksiyon tüpüne 15 µl olacak şekilde dağıtıldı.

Tablo 3. cDNA sentezi için gerekli materyaller ve miktarları. HS= Hasta Sayısı.

	Her bir hasta başına eklenecek miktar (µl)	Hasta Sayısı	Tüm hastalar için eklenecek miktar
5X Buffer (Tampon)	5	HS	5 x HS
dNTP	2	HS	2 x HS
Random Primer	5,25	HS	5,25 x HS
RNase İnhibitör	0,5	HS	0,5 x HS
Revers transkriptaz	1	HS	1 x HS
DTT	1,25	HS	1,25 x HS
Toplam miktar	15	HS	15 x HS

- Her bir reaksiyon tüpüne eklenecek su miktarları ayrı ayrı hesaplanarak reaksiyon tüplerine eklendi.
- Her bir reaksiyon tüpüne eklenecek su miktarı reaksiyon tüpüne eklenen RNA miktarına göre değişiklik göstermektedir. Her bir reaksiyon tüpündeki son hacim 25 µl olacak şekilde su miktarları hesaplandı. Aşağıdaki formüle göre miktarlar hesaplanıp kuyucuklara eklendi.

$$\text{RNA miktarı} + \text{Su miktarı} = 10 \mu\text{l}$$

- cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon tüpleri tablo 4’de belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre termal cycler’a koyulur.

Tablo 4. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü.

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
25	10
50	60
85	15
8	∞

- Elde edilen cDNA ürünleri +40C’de muhafaza edildi.

3.9. Ekspresyon analizi

Bu çalışmanın ekspresyon analizleri Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland) cihazı ile yapılmıştır. Analizler Lightcycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapılmıştır.

Çalışmada Roche firmasının katalog dizaynları kullanıldı. Kullanılan dizaynların Assay ID’leri tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Ekspresyon analizinde kullanılan ROCHE katalog assay ID’leri.

Gen	Assay ID
NANOG	114796
KLF4	113486
SOX2	111867

POU5F1	113034
MYC	100977
HPRT	102079
TBP	101145

Her hasta iki defa çalışılmıştır. Her çalışmada 2 adet negatif kontrol ve kalibratör koyulmuştur.

Ürünler aşağıdaki protokole göre hazırlanıp cihaza yüklenmiştir.

- Elde edilen cDNA'lar 1'e 4 oranında sulandırıldı.
- Tablo 6'ya göre karışım hazırlandı. Her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı.
- Sulandırılmış cDNA'lar her kuyucuğa 5'er µl dağıtıldı.

Tablo 6. Tablodaki miktarlar her çalışma grubundaki hasta sayısına göre hesaplanıp her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı. (Su miktarı, son hacim 20 µl olacak şekilde değişebilir.)

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

- Plate'in üstü bant ile kapatıldı.
- Plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra plate cihaza yüklendi.
- Lightcycler 480 Software açılarak tablo 7'deki programa göre çalışma başlatıldı.
-

Tablo 7. Lightcycler 480 II software programında ayarlanan sıcaklıkları ve süreleri

	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Sıcaklık artış / azalış hızı (°C)	Süre (Saniye)
Preinkübasyon	1	95	4,4	600
Amplifikasyon	45	95	4,4	10
		60	2,2	30
		72	4,4	1

Soğutma	1	40	2,2	30
----------------	----------	-----------	------------	-----------

Real time PCR kantitasyon Yöntemleri

Real time PCR’da kantitasyon analizinde 2 temel model vardır; mutlak ve rölatif kantifikasyon. Her iki model de deneysel açıdan belirlenen CP değerlerini farklı kullanır.

Mutlak Kantitasyon

Mutlak Kantitasyon yöntemlerinde hedef molekülün konsantrasyonu kesin değer olarak belirtilir. Kesin kantitasyon yöntemi bilinmeyen hedef molekülünün konsantrasyonun belirlenmesi için, bilinen konsantrasyonların eksternal standart örneklerinden oluşturulmuş standart eğriyi kullanır (115). Bu nedenle kesin bir kantitasyon yöntemi, eğer standartlar ve bilinmeyenler aynı verim ile amplifiye ve detekte edilmişler ise geçerli sonuçlar sağlar.

Standart eğri oluşturmak için standart örneklerin konsantrasyonlarına karşı CP değerlerinin grafiği çizilir. Oluşan eğrinin eğiminden yola çıkılarak aşağıdaki eşitliğe göre yapılır.

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{eğim}}}$$

Rölatif Kantitasyon

Rölatif kantitasyon yönteminde hedef genin konsantrasyonu başka bir referans gene oranlanarak hesaplanır. Rölatif kantitasyon yöntemleri başlangıç örnek miktarından, cDNA sentez verimliliğinden ya da pipetleme hataları gibi faktörlerinden etkilenmez. Kullanılacak referans gen tüm hücrelerde eksprese olan, hücre canlılığı için gerekli, hücre içindeki değişimlerle ekspresyon düzeyi değişmeyen özellikte olmalıdır. Bu özellikteki genlere “House Keeping Gen”ler de denir. GAPDH, β -actin, HPRT ve TBP referans genlere örnek olarak verilebilir.

Rölatif kantitasyonda kullanılan hesaplama Pfaffl metodu olarak bilinir. Formül aşağıdaki gibidir.

$$\text{Pfaffl metodu: } \frac{(E_{\text{hedef gen}})^{\Delta Ct_{\text{hedef gen (kontrol-hasta)}}}}{(E_{\text{referans gen}})^{\Delta Ct_{\text{referans gen (kontrol-hasta)}}}}$$

$\Delta Ct_{\text{referans gen}} = \text{Referans genin kontrol grubuna ait Ct değeri} - \text{Referans genin hasta grubuna ait Ct değeri}$

$\Delta C_{thedef\ gen} = \text{Hedef genin kontrol grubuna ait Ct değeri} - \text{Hedef genin hasta grubuna ait Ct değeri}$

E değeri her bir ürün için verimliliği temsil eder ve hesaplama yöntemi yukarıda verilmiştir.

Rölatif kantitasyon yönteminde kullanılan kalibratör sayesinde prob birleşimindeki farklılıklar, FRET verimi ya da boya eksitasyon sabitleri gibi saptama farklılıkları düzeltilir.

Bu çalışmada 6 hedef gen (KLF4, KLF4 α , POU5F1, SOX2, NANOG, MYC) ve 2 referans gen (TBP, HPRT) çalışıldı. Bütün hastalarda her gen ayrı ayrı çalışılmıştır. LightCycler 480 software programından Ct değerleri elde edildi.

Çalışmada kullanılan iki referans genin Ct değerlerinin geometrik ortalaması alındı (116). Hedef genlerin her biri bu geometrik ortalamaya göre Livak metodu ($\Delta\Delta C_t$) kullanılarak normalize edildi.

3.9.1. İstatiksel analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogramü q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası gen ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Veriler ortanca ile 25. Ve 75. yüzdelikler ile ifade edildi. Verilerin analizi R3.1.0 (www.r-project.org) programı ile değerlendirildi. $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

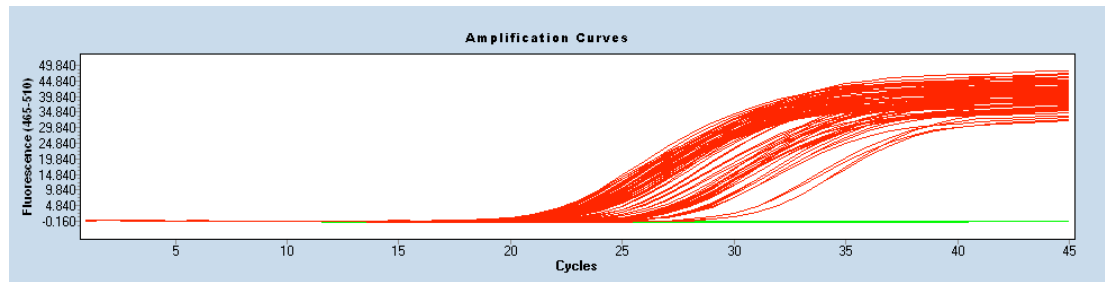
Çalışmaya dahil edilen 68 olgunun 43'ü hasta grubunu, 25'i kontrol grubunu oluşturmaktadır.

4.1. EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI

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 HPRT ve TBP genlerinin C_t değerlerinin geometrik ortalaması kullanıldı.

4.1.1. SOX2 geni

SOX2 geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C_t eğrileri şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. SOX2 geninin RT-PCR ile elde edilen C_t eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

SOX2 geninin Mann-Whitney U testi ve Lojistik regresyon analizleri tablo 8'de verildi. Tablodaki verilere göre hasta gurubunda SOX2 geni ekspresyonu kontrol gurubuna göre anlamlı derecede artmış olarak tespit edildi ($p<0,001$). Lojistik

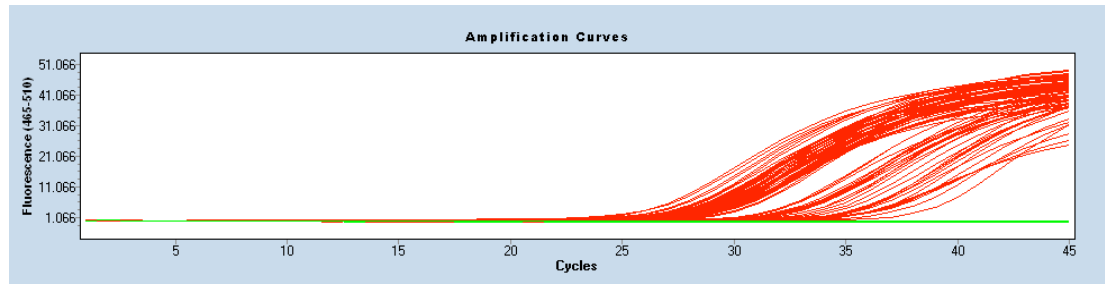
regresyon analizine göre SOX2 geni ekspresyonundaki bir birimlik artış, beyin tümörü oluşumu açısından 3,73 kat risk oluşturmaktadır.

Tablo 8. SOX2 geni için istatistiksel analiz sonuçları. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.

	Mann-Whitney U Testi			Lojistik regresyon analizleri	
	Kontrol (n=25)	Hasta (n=43)	p	OR (95% C.I.)	p
SOX2	0,69 (0,51 – 1,08)	5,65 (3,46 – 7,95)	<0,001	3,73 (1,82 – 7,64)	<0,001

4.1.2. MYC geni

MYC geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C_t eğrileri şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. MYC geninin RT-PCR ile elde edilen C_t eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

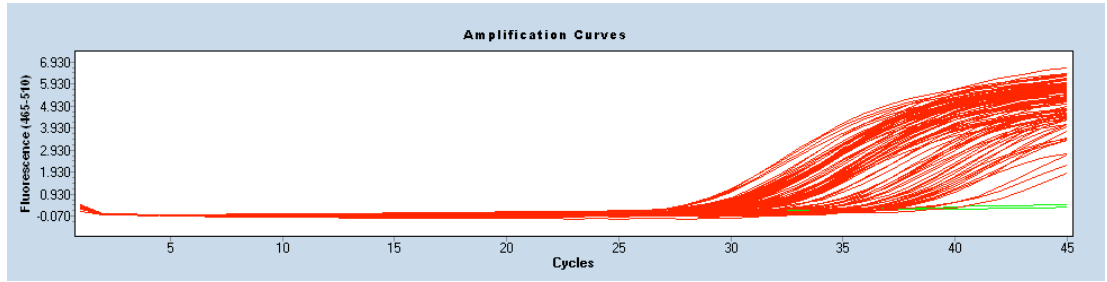
MYC geninin Mann-Whitney U testi ve Lojistik regresyon analizleri tablo 9’de verildi. Tablodaki verilere göre hasta gurubunda MYC geni ekspresyonu kontrol gurubuna göre anlamlı derecede artmış olarak tespit edildi ($p<0,001$). Lojistik regresyon analizine göre MYC geninin ekspresyonundaki bir birimlik artış, beyin tümörü oluşumu açısından 1,25 kat risk oluşturmaktadır.

Tablo 9. MYC geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.

	Mann-Whitney U Testi			Lojistik regresyon analizleri	
	Kontrol (n=25)	Hasta (n=43)	p	OR (95% C.I.)	p
MYC	2,41 (1,44 – 4,11)	27,24 (19,22 – 43,96)	<0,001	1,25 (1,13 – 1,38)	<0,001

4.1.3. NANOG geni

NANOG geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C_t eğrileri şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9. Nanog geninin RT-PCR ile elde edilen C_t eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

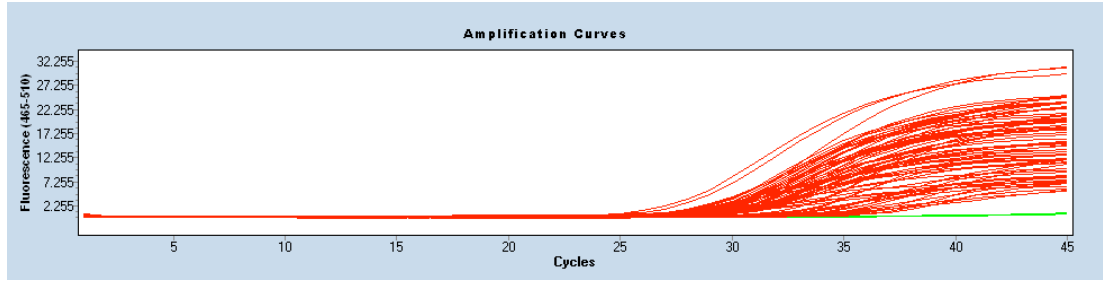
NANOG geninin Mann-Whitney U testi ve Lojistik regresyon analizleri tablo 10’da verildi. Tablodaki verilere göre hasta gurubunda NANOG geni ekspresyonunda kontrol gurubuna göre anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,624$).

Tablo 10. NANOG geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.

	Mann-Whitney U Testi			Lojistik regresyon analizleri	
	Kontrol (n=25)	Hasta (n=43)	p	OR (95% C.I.)	p
NANOG	2,64 (1,61 – 4,56)	2,33 (1,15 – 4,28)	0,624	0,95 (0,82 – 1,1)	0,12

4.1.4. KLF4 geni

KLF4 geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C_t eğrileri şekil 10’da verilmiştir.



Şekil 10. KLF4 geninin RT-PCR ile elde edilen C_t eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

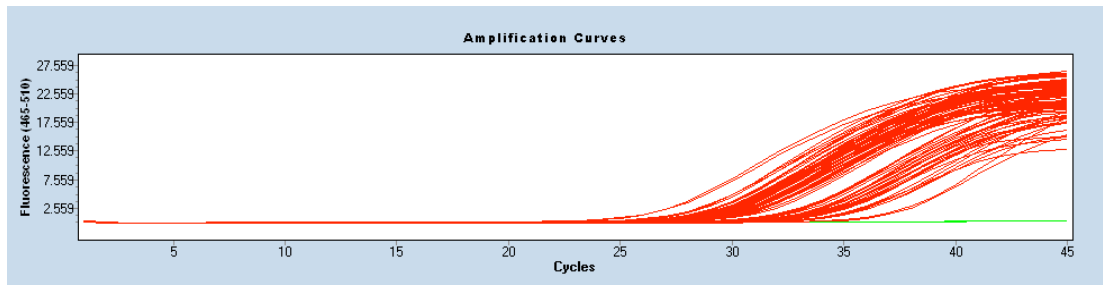
KLF4 geninin Mann-Whitney U testi ve Lojistik regresyon analizleri tablo 11’de verildi. Tablodaki verilere göre hasta gurubunda KLF4 geni ekspresyonu kontrol gurubuna göre anlamlı derecede artmış olarak tespit edildi ($p < 0,001$). Lojistik regresyon analizine göre KLF4 geninin ekspresyonundaki bir birimlik artış, beyin tümörü oluşumu açısından 1,62 kat risk oluşturmaktadır.

Tablo 11. KLF4 geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi

	Mann-Whitney U Testi			Lojistik regresyon analizleri	
	Kontrol (n=25)	Hasta (n=43)	p	OR (95% C.I.)	p
KLF4	0,53 (0,13 – 1,11)	1,33 (0,78 – 2,09)	<0,001	1,62 (0,9 – 2,94)	>0,05

4.1.5. POU5F1 geni

POU5F1 geni RT-PCR analizi sonucunda elde edilen C_t eğrileri şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11. POU5F1 geninin RT-PCR ile elde edilen C_t eğrileri ve mutlak kantifikasyon sonucu

POU5F1 geninin Mann-Whitney U testi ve Lojistik regresyon analizleri tablo 12’de verildi. Tablodaki verilere göre hasta gurubunda POU5F1 geni ekspresyonu kontrol gurubuna göre anlamlı derecede artmış olarak tespit edildi ($p < 0,001$). Lojistik regresyon analizine göre POU5F1 geninin ekspresyonundaki bir birimlik artış, beyin tümörü oluşumu açısından 1,25 kat risk oluşturmaktadır.

Tablo 12. NANOG geni için istatistiksel analizler. Veriler “Ortanca (25. Ve 75. Yüzdelikler)” olarak ifade edildi.

	Mann-Whitney U Testi			Lojistik regresyon analizleri	
	Kontrol (n=25)	Hasta (n=43)	p	OR (95% C.I.)	p
POU5F1	0,55 (0,21 – 1,11)	2,36 (1,98 – 2,97)	<0,001	4,74 (2,22 – 10,14)	<0,05

4.1.6. KLF4 α

Bu çalışmada bu gen ile ilgili sağlıklı ve tutarlı sonuçlar elde edilemediği için çalışmadan çıkarılmıştır.

5. TARTIŞMA

Kök hücreler kendi aralarında embriyonik kök hücresi (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) ve somatik kök hücresi (SKH) gibi alt gruplara ayrılabilir. Bu hücrelerin sahip olduğu iki temel özellik vardır: Kendini sonsuz yenileyebilme ve hepsine olmasa da insan vücudundaki bütün hücrelere farklılaşabilme özellikleridir (117,118). KH'nin bu eşsiz özellikleri sadece rejeneratif tıp alanında değil; hastalık modeli oluşturmada, ilaç geliştirme çalışmalarında ve insan gelişimindeki moleküler mekanizmaları anlamada da kullanılabilen güçlü araçlardır. Kendini yenileme ve hücrelere farklılaşabilme, iç ve dış etkenlerin kontrolü altında gerçekleşir (119). Dış etken olarak büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks ve sitokinler sayılabilirken iç etken olarak sayılabilecek başlıca faktör transkripsiyon faktörleridir (TF). Bir çok TF arasından POU5F1, SOX2, NANOG, MYC ve KLF4, iPKH programlamasında kullanılmaları ile de, öne çıkmışlardır.

İnsan vücudundaki her organın belirli bir yıkım - onarım dengesi içerisinde olduğu bilinmektedir. Yaşam süresince yıkım ve onarım arasında hassas bir denge içerisindeydir. Soru; bu denge nasıl bozulur? Bunun birçok nedeni olabilir; maruz kalınan toksisite, çevresel radyasyon, kök hücrelerin bulunduğu ortamın (niş) değişmesi, çok daha önemlisi kök hücrelerin sayısının azalması ve senescence (yaşlanma) mekanizmasının diğer hücreler gibi kök hücrelerde de devreye girmesidir.

Bugüne kadar birçok organda SKH'nin varlığı gösterilmiştir. Bunlar arasında meme (12), barsak (120), mezenkim (13), hematopoetik (121) ve nöral kök hücre (14)

bazılarıdır. Hatta farklı bir organda bulunan kök hücrelerin başka organların onarım süreçlerinde rol aldığı da gösterilmiştir (15,122,123).

1999 yılında Bonnet ve Dick (4) lösemi hücrelerinin arasında kök hücre belirteçleri taşıyan hücreler olduğunu buldu. Süregelen 15 yıl boyunca bir çok farklı tümör dokusunda; meme kanseri (5), beyin tümörü (6), kolon kanseri (11), over kanseri (7), pankreas tümörü (10), prostat tümörü (9), melanom (124) multipl myeloma (125); kök hücre belirteçleri taşıyan hücrelerin varlığı tespit edildi. Kanser kök hücresi olarak isimlendirilen bu hücreler tümör dokusundaki yenilenmeyi ve farklı klonal gruplar oluşturarak damarlanma, metastaz, ilaç direnci gibi farklı özellikler kazanılmasını sağlamaktadır.

Bu hücrelerin kanser kök hücre olarak isimlendirmesi, tabiidir ki, diğer kök hücreler ile olan davranış benzerliğinden kaynaklanmaktadır. Bu benzerlikten yola çıkarak bu çalışmada iPKH programlamada kullanılan 5 farklı transkripsiyon faktörünün; POU5F1, SOX2, NANOG, MYC ve KLF4; PBT'indeki mRNA düzeylerini beyin tümöründe inceledik.

POU5F1, EK hücrelerinin kök hücre potansiyelinin korunmasında ve devamında önemli rolü olan bir proteindir. Embriyolojik gelişimin evrelerinden olan erken bölünme evresinde ve daha sonra oluşan iç hücre kitlesinde ve primitif ektoderimde bulunan primordial germ hücrelerinde POU5F1 proteini oldukça yüksek miktarlarda ifade edilmektedir (27). Blastokist evresindeki embriyoda başlıca 2 yapı bulunmaktadır; kistik yapının içinde bulunan iç hücre kitlesi ve kistin duvarını oluşturan trofoektoderm. Bu iki yapıdaki POU5F1 ifade düzeyleri karşılaştırıldığında ilerde fetüsü oluşturacak olan iç hücre kitlesindeki ifade düzeyi trofoektodermden 31 kat daha fazla bulunmuştur (25). Gestasyonun 9. gününden itibaren oluşmaya başlayan somatik hücrelerde, POU5F1 ifadesinin azaldığı tespit edildi (26). POU5F1 geni nakavt edilmiş fare embriyolarının çok erken safhada öldüğü gözlemlendi. Bu durum EK hücrelerinin kendi kendini yenileyememesi ve sonucunda iç hücre kitlesinin oluşamaması sonucunda meydana geldi (27). Farklılaşmış somatik hücrelerde POU5F1 ifadesi olmamasına rağmen böbrek, meme epitel, pankreas mezenkim, karaciğer ve midedeki erişkin kök hücrelerinde ifade edildiği keşfedildi. Meme epitel, pankreas ve KC erişkin kök hücreleri farklılaşması yönünde uyarıldığında POU5F1 ekspresyonunun azaldığı görüldü (126). Aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada ise meme epiteli

erişkin kök hücreleri izole edilip X-ray'e maruz bırakıldıktan sonra zayıf tümörijenik aktivite gösterdiği gözlemlenmiş. Bu hücrelere c-erb B2/neu onkogeni aktarıldıktan sonra güçlü tümörijenik aktivite gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca kök hücre özelliklerini de sürdürdüğü tespit edildi (127).

Bu çalışmada PBT'nde POU5F1 gen ifadesinin normal beyin dokusuna göre anlamlı derecede artmış olduğu bulundu ($p<0,05$). Farklılaşmasını tamamlanmış bir nöron hücrelerinin POU5F1 geninin ifade edilmediği ve EK hücrelerinin nöron hücrelerine farklılaştıkça POU5F1 geni ifade düzeyinin azaldığı gösterildi (128). Fakat nöronal kök hücrelerin POU5F1 eksprese ettiği tespit edildi (129). KKH teorisine göre kanserin dokudaki SKH'den köken aldığı ve bu KKH'in tümör dokusunun yaşamındaki önemli unsur olduğu düşünüldüğünde POU5F1 geni artışı beklenirdi. Nitekim bizim bulduğumuz ifade artışı literatür ile uyumlu bulunmuştur (60). POU5f1 geninde erişkin dönemde gözlemlenmeyen artışın kanser dokusunda artması, POU5F1 geninin normal hücreleri etkileyerek yeniden embriyonik döneme dönmelerini sağlıyor olabilir ve normal hücrelerin kök hücreye dönüşmesinde katkıda bulunuyor olabilir. Nitekim biz biliyoruz ki POU5F1 geni ekspresyonu embriyonik kök hücrelerde oldukça yüksektir (25).

SOX2 geni embriyolojik gelişim aşamasında EK hücrelerinin nöral ektoderme farklılaşmasına sağlayan önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (28). Ayrıca gelişim boyunca bütün MSS'nde nöral progenitör hücrelerde eksprese edilir. Bu ekspresyon somatik nöral kök hücrelerde de vardır (29). SOX2 geni her ne kadar EK hücrelerinin nöral ektoderme farklılaşmasını sağlasa da nöral kök hücrelerinin terminal farklılaşmasını inhibe eder. Nöral kök hücrelerinin proliferatif özelliklerinin korunmasını sağlayan faktörlerdendir (29). Beyin tümörleri üzerine yapılan bir çalışmada tümöre ait kök hücrelerin nöral kök hücrelerle fenotipik olarak benzerlikler gösterdiği tespit edildi (16). Tümör dokusundaki en anaplastik bölgelerde de SOX2 ifadesinin daha yüksek olduğu gösterildi (130). Ayrıca *in vitro* ortamda GBM hücrelerindeki SOX2 inhibe edildiği zaman kısa vadede bazı hücrelerde bölünmenin durduğu gözlemlendi fakat dramatik etki 5 hafta içerisinde ortaya çıktı. Bu süre boyunca hücre sayısı yavaş fakat kararlı bir şekilde azaldı (77). Bu çalışmada da tümör dokusundaki ifade düzeyi normal hücreye göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu ($p<0,05$). Bu bulgu SOX2 geninin sinir hücrelerinde son farklılaşmasında önemli olduğunu desteklemekte ve eksprese olmaması gerektiğini

desteklemektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda ekspresyonunun artması POU5F1 geni ile birlikte kanser kök hücre dönüşümüne yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

KLF4 geni iPKH programlamada kullanılmış, birçok farklı kanser tipinde ifade düzeyleri araştırılmış ve kanser tipine göre farklı ekspresyon paternleri göstermiş bir transkripsiyon faktörüdür. EKH'nde pluripotentliğin korunmasında ve kendini yenilemede etkileri vardır ve bu etkilerini LIF-Stat3 sinyal yolağı üzerinden NANOG gen ekspresyonunu düzenleyerek yapmaktadır (108). Nanog ekspresyonu değişmeden KLF4 ekspresyonunun inhibe edilmesi sonucu EKH hücrelerinde farklılaşma görülmemiş fakat NANOG ekspresyonu inhibe edilip KLF4 ekspresyonu artsa bile hücrenin farklılaşma yoluna girdiği görülmüştür (108). Her ne kadar EKH'de farklılaşmayı engelleyici görevleri olsa da deride hücrenin farklılaşma seviyesi arttıkça KLF4 düzeyinin de arttığı gözlemlenmiştir (131). Benzer durum barsak hücrelerinde de tespit edilmiştir (132). Gastrointestinal sistem tümörlerinde; barsak ve gastrik, KLF4 ekspresyonunun tümör dokularında azaldığı, hatta bu azalmanın tümörün evresi ile ters orantıya sahip olduğu gösterilmiştir (109). Yine kolon adenomlarında (133) ve kanserlerinde (134) KLF4 düzeyleri normal dokuya göre daha az bulunmuş. KLF4 ifade düzeyinin azaldığı diğer kanser tipleri arasında özefagus (2) ve akciğer (111) sayılabilir. Bu çalışmalara zıt olarak KLF4 ekspresyon düzeyleri meme (38) ve orofarenksin skuamöz hücreli tümörlerinde (113) KLF4 ekspresyon düzeyleri artmış olarak tespit edildi.

Bizim çalışmamızda; PBT'nde KLF4 ekspresyon düzeyleri normal dokuya göre anlamlı artış bulunmuşken ($p < 0,05$), NANOG gen düzeylerinde anlamlı fark tespit edilemedi ($p > 0,05$). EKH hücrelerindeki KLF4-NANOG ilişkisi düşünüldüğünde KLF4 düzeyi artmışken NANOG düzeyinde anlamlı bir fark olmamasını açıklayabilecek bir kaç mekanizma olabilir. Birincisi; çalışmamızda protein düzeyleri bakılmamıştır. KLF4 düzeyindeki bu artış sadece mRNA düzeyinde ise, translasyon gerçekleşmiyorsa, NANOG geninde bir artış olmaması normaldir. Fakat başka bir çalışmada gliomalarda KLF4'ün protein düzeyinde de artış gösterdiği bulunmuş. (135). Her ne kadar sonuçlar KLF4 açısından uyumlu gelse de NANOG tarafında farklı sonuçlar elde edilmiştir. İkincisi; farklı protein izoformları oluşması olabilir. Öyle ki pankreas (136) ve prostat (137) tümörlerinde KLF4 geni üzerine yapılan bir çalışmada KLF4 geninin farklı bir izoformunun, KLF4 α , bulunduğu tespit edilmiş. KLF4 α 'nın hücre içi lokalizasyonuna bakıldığında sadece hücre sitoplazmasında bulunduğu görülmüş. Bu tespit genin DNA dizisi ile beraber yorumlandığında absürt

bir sonuç değildir. Çünkü KLF4 α izoformunda KLF4 geninde olması gereken lokalizasyon dizisi bulunmadığı için protein hücre çekirdeğine geçememektedir (137). KLF4 geninin bir TF olarak hücrenin çekirdeğine geçememesinin fonksiyonlarını eda edememesi ile sonuçlanması kuvvetle muhtemeldir. Üçüncüsü; KLF4 geni EKH'de ve PBT'nin köken aldığı hücrelerde farklı yollar üzerinden etki ediyor olabilir. Bu nedenle NANOG geninde bir artış görülmemiş olabilir. Zira KLF4 geninin farklı tümör tiplerine göre TSG ya da onkogen olarak davranabildiğini yukarıda belirtmiştik.

Bu çalışmada gliomanın MYC geni ekspresyon düzeylerinde normal dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. MYC geni yaklaşık 20 yıldır proto-onkogen olarak kanserlerle ilişkisi bilinen bir transkripsiyon faktörüdür. Normal fizyolojik süreçte MYC geni enhancer bölgesi aracılığı ile 4000'den fazla lokusta gen ifadelerini düzenlemektedir. Ayrıca 600'den fazla gen ve 45'den fazla transkripsiyon faktörünün ekspresyonunda düzeyini eklemektedir (30). Sinir sistemi gelişiminde de elzem TF'den biridir. MYC nakavt edilmiş farelerde sinir sisteminin gelişmediği görülmüş (138). Nöral Kök hücrelerde MYC over- ekspresyonu proliferasyonu kamçıladığı (139) ve birçok farklı tümörde olduğu gibi gliomlarda da ekspresyon artışı olduğu gösterilmiş (140). Literatür ile uyumlu olarak; çalışmamızda MYC geninin gliomlardaki mRNA düzeylerini normal dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi.

Kanser kök hücrelerinin nasıl oluştuğuna dair farklı öngörüler bulunmaktadır. Bu öngörülerden bir tanesi normal bir kök hücrenin genetik ya da epigenetik faktörlerle değişime uğrayarak kanser kök hücrelerinde dönüşmesidir. Yine bir diğer faktörde normal kök hücrelerin ürünlerinin (dokulardaki mutasyonlar ya da çevresel faktörler ki bu faktörler muhtemelen epigenetik faktörlerin tetikleyenleridir) farklılaşarak kanser kök hücrelerini oluşturmalarıdır.

Bizim çalışmamızda kullandığımız SOX2, KLF4, MYC ve POU5F1 genlerinin normal beyin hücrelerinde ekspresyonlarının düşük olduğu ya da olmaması gerektiği tahmin edilmekte iken aynı beyin hücrelerinden köken alan kanserlerde ise son derece yüksek seviyede bulunmuştur. Bu bulgu bize, acaba beyin hücrelerinde tanımlanamayan çevresel faktörlerin etkisiyle bu hücrelerin ekspresyon paternlerinin değişmesine yol açarak normal bir beyin hücrelerini kanser hücrelerine ya da kanser kök

hücrelerine çevirerek beyin tümörlerinin oluşmasına sebep olabilirler. Bizim bulgularımız da bu hipotezi destekler niteliktedir.

Konuyla ilgili Yamanaka faktörleri ve bu faktörleri etkileyen diğer faktörleri içeren yeni çalışmalarda, eğer hipotezimiz doğru ise, beyin tümörlerinde söz konusu genlerin çeşitli mekanizmalarla susturularak kanser kök hücrelerinin durdurulması ve yok edilmesi sağlanabilir düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada KKH ve diğer kök hücrelerin arasındaki benzerlikten yola çıkarak baktığımız gen ifadelerinde anlamlı farklılıklar tespit ettik PBT olan gliomlarda iPKH programlamasında kullanılan 5 farklı genin ekspresyon düzeylerini araştırdık ve 4 genin ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış tespit ettik. 1 gende ise anlamlı bir fark bulunamadı. Özellikle POU5F1 ve SOX2 geninin düzeylerindeki artış bu TF'nin EKH ve sinir sistemi gelişimdeki etkilerinden dolayı önemlidir. KLF4 ve MYC genindeki artışlar literatür ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Özellikle KLF4 geninin literatürde farklı izoformları olması ve farklı tümörlerde TSG ve onkogen olarak davranması bu genin kontrolünün karmaşıklığına işaret etmektedir. NANOG geninde anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Her ne kadar çalışmada anlamlı sonuçlar elde edilmiş olsa da çalışmamızda bazı kısıtlılıklar mevcuttu. Öncelikle ifade düzeyleri sadece mRNA düzeyinde bakıldı. Protein düzeyinde de araştırma yapılması konfirmasyon açısından ve proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonunu görme açısından daha faydalı olacaktır.

İleri de bu genlerin metilasyon düzeyleri, varsa izoformları, kemoterapötiklerin bu genler üzerindeki etkileri ve protein çalışması yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
2. Yang Y, Goldstein BG, Chao HH, Katz JP. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1216-21.
3. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Ferlay J, Soerjomataram IE, M., Dikshit R, et al. International Agency for Research on Cancer, v1.0. Lyon, France;2013. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>.
4. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-7.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8.
6. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
7. Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008;68:4311-20.
8. Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer: regeneration of interest in the prostate. *Nat Rev Urol* 2009;6:184-6.
9. Lang SH, Frame FM, Collins AT. Prostate cancer stem cells. *J Pathol* 2009;217:299-306.
10. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-7.

11. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10.
12. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005;7:86-95.
13. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-902.
14. Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 2002;57:751-8.
15. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-6.
16. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006;9:391-403.
17. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:1310-6.
18. LaBarge MA. The difficulty of targeting cancer stem cell niches. *Clin Cancer Res* 2010;16:3121-9.
19. Lacerda L, Pusztai L, Woodward WA. The role of tumor initiating cells in drug resistance of breast cancer: Implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* 2010;13:99-108.
20. Wang Z, Li Y, Ahmad A, et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat* 2010;13:109-18.
21. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:732-40.
22. Liu J, Kopeckova P, Buhler P, et al. Biorecognition and subcellular trafficking of HEMA copolymer-anti-PSMA antibody conjugates by prostate cancer cells. *Mol Pharm* 2009;6:959-70.
23. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
24. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20.

25. Hansis C, Grifo JA, Krey LC. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2000;6:999-1004.
26. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 1990;345:686-92.
27. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95:379-91.
28. Thomson M, Liu SJ, Zou LN, et al. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 2011;145:875-89.
29. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 2003;39:749-65.
30. Zeller KI, Zhao X, Lee CW, et al. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17834-9.
31. Chang DF, Tsai SC, Wang XC, et al. Molecular characterization of the human NANOG protein. *Stem Cells* 2009;27:812-21.
32. Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature* 2006;441:997-1001.
33. Lin T, Ding YQ, Li JM. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Med Oncol* 2012;29:878-85.
34. Wen J, Park JY, Park KH, et al. Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis. *Pancreas* 2010;39:622-6.
35. Jenkins TD, Opitz OG, Okano J, Rustgi AK. Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr virus ED-L2 promoters by gut-enriched Kruppel-like factor. *J Biol Chem* 1998;273:10747-54.
36. Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 1996;271:31384-90.
37. Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 1996;271:20009-17.
38. Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, et al. Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:6488-95.
39. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 1993;3:255-68.

40. 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;103:714-36.
41. Oviedo - Convention for the protection of Human Rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine. Erişim adresi: <http://www.portaledibioetica.it/documenti/001316/001316.htm>. Erişim tarihi: 30/09/2014.
42. KÖK HÜCRE ÇALIşMALARİ HAKKINDA SAĞLIK BAKANLIĞI GENELGESİ (MAYIS 2006). Erişim adresi: http://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.php?option=com_content&view=article&id=387:k-hre-lialari-hakkinda-saik-bakanli-genelgesmayis-2006&catid=3:tebligengelge&Itemid=35. Erişim tarihi: 30/09/2014.
43. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE ARAşTIRMALARİ HAKKINDA SAĞLIK BAKANLIĞI GENELGESİ. Erişim adresi: http://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.php?option=com_content&view=article&id=347:embron-k-hre-arairmalari-hakkinda-saik-bakanli-genelges&catid=3:tebligengelge&Itemid=35. Erişim tarihi: 30/09/2014.
44. ÜREMEYE YARDIMCI TEDAVİ UYGULAMALARİ VE ÜREMEYE YARDIMCI TEDAVİ MERKEZLERİ HAKKINDA YÖNETMELİK. Erişim adresi: http://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.php?option=com_content&view=article&id=741:emeye-yardimci-tedavuygulamaları-ve-emeye-yardimci-tedavimerkezlerhakkında-yetmel&catid=2:ymelik&Itemid=33. Erişim tarihi: 30/09/2014.
45. Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. Annu Rev Genet 2000;34:77-137.
46. Nikolov DB, Burley SK. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:15-22.
47. Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem Sci 1996;21:327-35.
48. Lamb KA, Rizzino A. Effects of differentiation on the transcriptional regulation of the FGF-4 gene: critical roles played by a distal enhancer. Mol Reprod Dev 1998;51:218-24.
49. Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, Monk M. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. Mol Hum Reprod 1999;5:851-60.
50. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. Cell 1990;60:461-72.
51. Pera MF, Herszfeld D. Differentiation of human pluripotent teratocarcinoma stem cells induced by bone morphogenetic protein-2. Reprod Fertil Dev 1998;10:551-5.

52. Scholer HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 1990;9:2185-95.
53. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 1998;71:89-98.
54. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372-6.
55. Kraft HJ, Mosselman S, Smits HA, et al. Oct-4 regulates alternative platelet-derived growth factor alpha receptor gene promoter in human embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 1996;271:12873-8.
56. Busch C, Oppitz M, Wehrmann M, Schweizer P, Drews U. Immunohistochemical localization of nanog and Oct4 in stem cell compartments of human sacrococcygeal teratomas. *Histopathology* 2008;52:717-30.
57. Cheng CJ, Wu YC, Shu JA, et al. Aberrant expression and distribution of the OCT-4 transcription factor in seminomas. *J Biomed Sci* 2007;14:797-807.
58. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1598-602.
59. Lee J, Rhee BK, Bae GY, Han YM, Kim J. Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein. *Stem Cells* 2005;23:738-51.
60. Du Z, Jia D, Liu S, et al. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 2009;57:724-33.
61. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 2008;3:e2637.
62. Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 2003;33:461-3.
63. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126-40.
64. Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:421-4.
65. Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, et al. Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* 1995;49:23-36.
66. Wood HB, Episkopou V. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev* 1999;86:197-201.

67. Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, et al. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 2000;127:791-800.
68. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 2000;16:182-7.
69. Kondo T, Raff M. Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev* 2004;18:2963-72.
70. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* 2004;26:148-65.
71. Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 2003;6:1162-8.
72. Bani-Yaghoub M, Tremblay RG, Lei JX, et al. Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol* 2006;295:52-66.
73. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009;1:228-36.
74. Schmitz M, Temme A, Senner V, et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer* 2007;96:1293-301.
75. Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, et al. Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 2014;16:193-206, e19-25.
76. Phi JH, Park SH, Kim SK, et al. Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol* 2008;32:103-12.
77. Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 2009;27:40-8.
78. Oppel F, Muller N, Schackert G, et al. SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. *Mol Cancer* 2011;10:137.
79. Li XL, Eishi Y, Bai YQ, et al. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2004;24:257-63.
80. Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* 2008;98:824-31.

81. Do HJ, Lim HY, Kim JH, et al. An intact homeobox domain is required for complete nuclear localization of human Nanog. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:770-5.
82. Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 2005;23:1035-43.
83. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1:55-70.
84. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448:318-24.
85. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313-7.
86. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007;25:1177-81.
87. Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007;450:1230-4.
88. Lonardo E, Cioffi M, Sancho P, et al. Metformin targets the metabolic achilles heel of human pancreatic cancer stem cells. *PLoS One* 2013;8:e76518.
89. Herreros-Villanueva M, Bujanda L, Billadeau DD, Zhang JS. Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20:2247-54.
90. Guo Y, Liu S, Wang P, et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 2011;59:763-75.
91. MYC Symbol Report - HUGO Gene Nomenclature Committee. Erişim adresi: http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=7553. Erişim tarihi: 30/09/2014.
92. Kato GJ, Barrett J, Villa-Garcia M, Dang CV. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* 1990;10:5914-20.
93. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev* 2008;22:2755-66.
94. Kim J, Woo AJ, Chu J, et al. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell* 2010;143:313-24.
95. Lee BK, Bhinge AA, Battenhouse A, et al. Cell-type specific and combinatorial usage of diverse transcription factors revealed by genome-wide binding studies in multiple human cells. *Genome Res* 2012;22:9-24.
96. Lin CY, Loven J, Rahl PB, et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 2012;151:56-67.

97. Nie Z, Hu G, Wei G, et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 2012;151:68-79.
98. Eberhardy SR, Farnham PJ. c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem* 2001;276:48562-71.
99. Rahl PB, Lin CY, Seila AC, et al. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 2010;141:432-45.
100. Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a014357.
101. Mladenov Z, Heine U, Beard D, Beard JW. Strain MC29 avian leukosis virus. Myelocytoma, endothelioma, and renal growths: pathomorphological and ultrastructural aspects. *J Natl Cancer Inst* 1967;38:251-85.
102. Graf T, Beug H. Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1978;516:269-99.
103. Sheiness D, Fanshier L, Bishop JM. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* 1978;28:600-10.
104. Bister K, Duesberg PH. Structure and specific sequences of avian erythroblastosis virus RNA: evidence for multiple classes of transforming genes among avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:5023-7.
105. Duesberg PH, Vogt PK. Avian acute leukemia viruses MC29 and MH2 share specific RNA sequences: evidence for a second class of transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1633-7.
106. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-6.
107. Panigada M, Porcellini S, Sutti F, et al. GKLf in thymus epithelium as a developmentally regulated element of thymocyte-stroma cross-talk. *Mech Dev* 1999;81:103-13.
108. Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem* 2010;285:9180-9.
109. Wei D, Gong W, Kanai M, et al. Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res* 2005;65:2746-54.
110. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, et al. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004;23:395-402.

111. Zhou Y, Hofstetter WL, He Y, et al. KLF4 inhibition of lung cancer cell invasion by suppression of SPARC expression. *Cancer Biol Ther* 2010;9:507-13.
112. Li J, Zheng H, Yu F, et al. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2012;33:1239-46.
113. Foster KW, Ren S, Louro ID, et al. Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLf. *Cell Growth Differ* 1999;10:423-34.
114. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-8, 60, 62.
115. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999;26:112-22, 24-5.
116. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
117. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:625-35.
118. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
119. Yeo JC, Ng HH. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res* 2013;23:20-32.
120. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
121. Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2002;100:1302-9.
122. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2001;345:93-7.
123. Mezey E, Key S, Vogelsang G, et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1364-9.
124. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 2010;466:133-7.

125. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008;26:2895-900.
126. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26:495-502.
127. Chang CC, Sun W, Cruz A, et al. A human breast epithelial cell type with stem cell characteristics as target cells for carcinogenesis. *Radiat Res* 2001;155:201-7.
128. Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* 2003;130:2505-12.
129. Okuda T, Tagawa K, Qi ML, et al. Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;132:18-30.
130. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 2011;8:139-47.
131. Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 1999;22:356-60.
132. Yu T, Chen X, Zhang W, et al. Kruppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity. *PLoS One* 2012;7:e32492.
133. Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CS, Yang VW. Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett* 1997;419:239-43.
134. Choi BJ, Cho YG, Song JW, et al. Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathol Res Pract* 2006;202:585-9.
135. Holmberg J, He X, Peredo I, et al. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PLoS One* 2011;6:e18454.
136. Wei D, Wang L, Kanai M, et al. KLF4alpha up-regulation promotes cell cycle progression and reduces survival time of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2010;139:2135-45.
137. Le Magnen C, Bubendorf L, Ruiz C, et al. Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 2013;49:955-63.
138. Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 2002;16:2699-712.

139. Fults D, Pedone C, Dai C, Holland EC. MYC expression promotes the proliferation of neural progenitor cells in culture and in vivo. *Neoplasia* 2002;4:32-9.
140. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, et al. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 2009;4:e7752.