



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GLİOBLASTOMA MULTİFORME BEYİN TÜMÖRÜNÜN  
ERKEN TANI VE TEDAVİSİNE İMKAN SAĞLAYABİLECEK  
ANTİ-GBM OTOANTİKORLARIN ARAŞTIRILMASI**

OZAN TOPCU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üye NİHAL KARAKAŞ

İSTANBUL 2020

# TEZ ONAYI

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji  
Tez Sahibi : Ozan TOPCU  
Tez Başlığı : Glioblastoma Multiforme Beyin Tümörünün Erken Tanı ve Tedavisine İmkan Sağlayabilecek anti-GBM Otoantikorların Araştırılması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 08.09.2020

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Dr.Öğr.Üyesi Nihal KARAKAŞ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<b><u>Sınav Jüri Üyeleri</u></b>		
Prof.Dr. Hasan KÖRKAYA	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof.Dr. Erdem TÖZÜN	İstanbul Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

## BEYAN

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

Ozan TOPCU



## İTHAF

*Bu tez çalışmasını, binler ömür de sürseler insanoğlunun hayatta erişebileceği en yüksek ve en hakiki bilginin bilgisizlik; en derin ve ince fikrin rıza-ı ilahi kazanmak ve insanı şu kainatın bir meyvesi kılan ve dahi insanı insan eden en esaslı hissiyatın gelişim ve değişim meyili içerisinde daimi tazelenen muhabbet olduğunu kavrayabilecek kadar uyanık olan kalplere ithaf ediyorum.*

*İlm kesbiyle paye-i rif'at*

*Arzu-yı muhal imiş ancak*

*Aşk imiş her ne var alemde*

*İlm bir kıyl ü kal imiş ancak*

*Fuzuli*

## TEŞEKKÜR

Gerek bilgi ve tecrübelerini paylaşmasıyla gerek eğitim ve öğretim prensipleriyle araştırmacı, sorgulayıcı ve eleştirel fikir disiplinine sahip bir bilim insanı adayı olarak yetişmemde; en küçük işlerden en büyük işlere kadar her türlü fikri tartışmaya açık olup bana danışmanlık eden, bilimsel olarak giriştiğimiz her türlü işte bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek bana yol gösteren ve yeri geldiğinde bir abla yeri geldiğinde bir arkadaş gibi mesleki veyahut meslek harici her türlü konuyu mütalaa etmesinden hoşnut olduğum ve kendisi ile çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Dr. Öğr. Üye Nihal KARAKAŞ'a; esasında bir TÜBİTAK projesinin tamamını ihtiva eden bu tez çalışmasının proje danışmanlarından olup bilgi ve tecrübesini her seferinde aktaran Prof. Dr. Erdem TÜZÜN'e ve tez çalışmam sırasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen kendisini 'ORTAK' diye çağırdığım çok sevgili arkadaşım Berrak YETİMLER'e; hayatımın son 10 yılında tanışmış olduğum ve tanıştığımız günden itibaren yanımda olan ve kendisiyle dost olmaktan memnun olduğum ve çeşitli hatıraları paylaştığım değerli arkadaşım Sadık BAY'a; çeşitli alanlardaki fikirlerinden istifade ettiğim ve yüksek seviyedeki fizik ve mühendislik prensiplerini bu alanlarla iştigal etmeyen kimselere verdiği örneklerle meseleleri zihinlere yaklaştırmada ustalaşmış çok değerli arkadaşım Doğan ÇOK'a ve ismini sayamadığım nice dostlarıma; hüznü ve neşeyi birlikte paylaştığımız çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Nurşah ÖZTUNÇ ve Damla ULUDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak hayattaki en büyük destekçilerim ve en hakiki dostlarım olan annem Herdem TOPCU ve babam Ziya TOPCU'ya ve küçük kardeşim Okan TOPCU'ya ve değerli halam Atife TOPCU'ya şükranlarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	5
4.1. Gliomlar.....	5
4.1.1. Gliomların sınıflandırılması.....	6
4.1.2. Gliomların Tedavisi .....	8
4.2. Glioblastom (GB).....	9
4.2.1. Patogenezi.....	13
4.2.2. Güncel Tedavi Yaklaşımları .....	14
4.2.3. Erken teşhis için biyobelirteç çalışmaları .....	17
4.3. Biyobelirteç olarak otoantikorlar.....	19
4.3.1. Glioblastom ilişkili otoantikor çalışmaları .....	20
4.4. Solüt Taşıyıcı Proteinler .....	21
4.4.1. Solüt Taşıyıcı Protein 3A2 ( SLC3a2).....	23
5. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	25

5.1. Malzemeler .....	25
5.2. Cihazlar .....	26
5.3. Tampon Çözeltiler .....	27
5.4. Olguların toplanması .....	29
5.5. Serum örneklerinden IgG İzolasyonu.....	31
5.6. Dokulardan Protein İzolasyonu .....	32
5.7. SDS PAGE Analizi .....	32
5.8. Western Blot (WB).....	32
5.8.1. Örneklerin Yükleme Hazırlanması .....	33
5.8.2. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması.....	33
5.8.3. Örneklerin Yüklenmesi ve PVDF membrana Transferi .....	33
5.8.4. Primer ve Sekonder Antikor Muamelesi .....	34
5.8.5. Görüntüleme .....	34
5.9. Kütle Spektrometrisi.....	34
5.10. İmmünpresipitasyon .....	34
5.11. İmmünohistokimya (İHK).....	35
5.12. İmmüno Floresan Boyama (İF) .....	36
5.13. Biyoistatistik Analizler.....	37
6. BULGULAR.....	38
6.1. Gliom Hastalarının Doku ve Serumlarında Otoantikor-Otoantijen Etkileşimlerinin Glioblastom Özgünlük Göstermesi .....	38
6.2. Kütle Spektrometri Analizleri Sonucu Glioblastomlarda SLC3a2 Ekspresyon Artışının Tespiti.....	39
6.3. Glioblastom Hasta Dokularında SLC3a2 Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot ve İmmünohistokimya ile Doğrulanması .....	39
6.4. İmmünpresipitasyon ile anti-SLC3a2 Otoantikorlarının Tespiti.....	41

6.5. Otoantikörlerin SLC3a2'ye Özgü Bağlanma Profilinin İmmüno Floresan Boyama ile Hücre Hatlarında Gösterilmesi.....	45
6.6. Glioblastomlarda SLC3a2 Modifikasyonlarının ve İzomerlerinin İncelenmesi .....	47
6.7. Glioblastomlarda SLC3a2' nin Fosforilasyon Durumunun Belirlenmesi .....	49
6.8. SLC3a2 Otoantikörlerinin Gliom Grad Seviyesi İle İlişkilendirilmesi.....	50
6.9 Glioblastom Serumları-SLC3a2 Otoantikör Reaktivitesi ile Sağ Kalım Korelasyonu.....	51
7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	52
8. KAYNAKLAR .....	56
9. ETİK KURUL ONAYI.....	67



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1 Nöral kök hücrelerden gliomların formasyonu .....	6
Şekil 4.1.1.1 DSÖ 2016 sınıflandırması ve alt tiplerin sağkalım eğrileri .....	7
Şekil 4.1.1.2 DSÖ 2007 gliom sınıflandırması .....	8
Şekil 4.1.1.3 DSÖ 2016 son sınıflandırması MSS tümörlerinden bazıları .....	8
Şekil 4.2.1 Primer ve sekonder GB' nin gelişimi .....	10
Şekil 4.2.2 GB tümör heterojenitesinin kökenleri .....	12
Şekil 4.2.1.1 GB patogenezi .....	14
Şekil 4.2.2.1 GB tedavisinde immünoterapiklerin gelişimi .....	17
Şekil 4.2.3.1 Bir tümörden vücut sıvılarına biyomoleküler transportasyon .....	18
Şekil 4.3.1 IgG antikoları .....	19
Şekil 4.4.1 Solüt taşıyıcı proteinler ve kanser malign transformasyon arasındaki bağlantı.....	22
Şekil 4.4.2 Onkometabolizmada solüt taşıyıcı proteinlerin rolleri (72).....	23
Şekil 5.1 Tez çalışmasının tamamlanmasında izlenen yöntem.....	25
Şekil 6.1.1 GB serum-GB dokusu etkileşimlerinde kontrol dokularına kıyas ile özgünlük gözlemlenmesi.....	38
Şekil 6.3.1 SLC3a2 GB'lerde yüksek seviyede ekspresyon göstermektedir .....	40
Şekil 6.3.2 GB dokuları SLC3a2' yi epilepsi kontrol dokuları ve GB olmayan gliomlara göre yüksek seviyede eksprese etmektedir .....	40
Şekil 6.3.3 SLC3a2' yi yüksek ve düşük eksprese eden hastaların Kaplan Meier Analizi .....	41

<b>Şekil 6.4.1</b> GB serumları, GB doku lizatları ile güçlü bir biçimde, non-GB ve kontrol doku lizatları ile ise zayıf olarak etkileşmektedir .....	42
<b>Şekil 6.4.2</b> Glioblastom (grad IV) ve non-GB (grad III-IV) gliom serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikörlerinin doku etkileşimi analizleri.....	43
<b>Şekil 6.4.3</b> GB serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikörler 3 boyutlu SLC3a2 yapısını tanımaktadır.....	44
<b>Şekil 6.5.1</b> Glioblastom hücre hatlarında SLC3a2 ekspresyonunun belirlenmesi.....	45
<b>Şekil 6.5.2</b> Otoantikörlerin SLC3a2' ye özgü bağlanma profilinin immünfloresan yöntemi ile belirlenmesi.....	47
<b>Şekil 6.6.1</b> Uniprot veritabanı kullanılarak SLC3a2 izoformlarının belirlenmesi.....	48
<b>Şekil 6.6.2</b> Uniprot veritabanında SLC3a2 modifikasyonlarının araştırılması.....	49
<b>Şekil 6.7.1</b> Glioblastomda SLC3a2'nin fosforilasyon durumunun kıyaslamalı analizi. ....	50
<b>Şekil 6.8.1</b> anti-SLC3a2 otoantikörleri yalnızca ileri evreli gliomlarda tespit edilmektedir.....	51
<b>Şekil 6.9.1</b> Glioblastom serumlarındaki otoantikörlerin SLC3a2 ile reaktivitesi GB sağ kalımları ile pozitif korelasyon göstermektedir. ....	51

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 5.5.1</b> Kullanılan sarf malzemeleri .....	26
<b>Tablo 5.3.1</b> Ayırıştırma tamponu .....	27
<b>Tablo 5.3.2</b> Stakleme tamponu .....	27
<b>Tablo 5.3.3</b> Koşturma tamponu .....	27
<b>Tablo 5.3.4</b> Transfer tamponu .....	27
<b>Tablo 5.3.5</b> TBST hazırlanışı .....	28
<b>Tablo 5.3.6</b> Strip tamponu .....	28
<b>Tablo 5.3.7</b> 1X PBS hazırlanışı .....	28
<b>Tablo 5.3.8</b> 1X PBST hazırlanışı.....	28
<b>Tablo 5.3.9</b> Sodyum azidli PBS hazırlanışı.....	29
<b>Tablo 5.3.10</b> Bloklama tamponu hazırlanışı .....	29
<b>Tablo 5.4.1</b> Hasta bilgileri .....	30
<b>Tablo 5.8.2.1</b> Üst jelin hazırlanışı .....	33
<b>Tablo 5.8.2.2</b> Alt jelin hazırlanışı.....	33

## SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persülfat
ASH	: Antijen Sunan Hücreler
BSA	: Bovin Serum Albumin
CAR-T	: T Hücre Kimerik Antijen Reseptörü
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
GB	: Glioblastom
GKH	: Gliom Kök Hücreleri
HCl	: Hidroklorik asit
İHK	: İmmünohistokimya
İF	: İmmünfloresan
KKH	: Kanser Kök Hücreleri
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
MetOH	: Metanol
NKH	: Nöral Kök Hücreler
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
PBST	: Fosfat Tampon Tuzu Tween20
PFA	: Paraformaldehid
PVDF	: Poliviniliden diflorid
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Assay Tamponu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N,N-tetrametiletilediamin
TBS	: Tris Tampon Tuzu

TBST	: Tris Tampon Tuzu Tween20
tDNA	: Tumor DNA
THR	: T Hücre Reseptörü
TMZ	: Temozolomid
WB	: Western Blot



## 1. ÖZET

### GLİOBLASTOMA MULTİFORME BEYİN TÜMÖRÜNÜN ERKEN TANI VE TEDAVİSİNE İMKAN SAĞLAYABİLECEK ANTI-GBM OTOANTİKORLARIN ARAŞTIRILMASI

Glioblastom (GB) son derece invazif karaktere sahip malign bir beyin tümörüdür. Glioblastom hastaları ortalama 12-15 ay arası yaşamlarını sürdürebilmektedir. Dolayısıyla hastalığa erken tanı konulabilmesi büyük önem arz etmektedir. Çeşitli hastalıklarda erken tanıda biyobelirteç olarak otoantikor çalışmaları olumlu sonuçlar vermektedir. Fakat hasta serumlarında otoantikor araştırmaları, kanserde bilinen proteinlere karşı sürdürülmektedir. Bu doğrultuda, kanser hasta serumlarında yapılan bir çalışmada da p53 otoantikorlarına rastlanılmıştır. Ancak, yeni otoantijenlerin saptanabileceği otoantikor taramaları rapor edilmemiştir. Bu çalışmada, gliom hastalarının tümör dokusunda ve tümör barındırmayan epilepsi (kontrol) olgularında otoantikor-otoantijen etkileşimi araştırılmıştır. Serum ile etkileşimine bağlı olarak otoantijenin GB'lere özgü bir profil sergilediği tespit edilmiştir. Bu kapsamda, proteomiks çalışmaları ile GB'lerde ekspresyon düzeyi yüksek olan proteinler belirlenip, immünohistokimya ve western blot yöntemleri ile protein düzeyi doğrulanmıştır. En yüksek skorlu proteinlere yönelik immünpresipitasyon ve immüno floresan çalışmaları ile yüksek gradlı gliomlarda, solüt taşıyıcı proteinlerden SLC3a2'ye karşı otoantikor etkileşiminin varlığı saptanmıştır. Bu çalışma, yüksek gradlı gliomlarda diyagnostik ve prognostik öneme sahip SLC3a2 otoantikorlarının varlığını, ve SLC3a2 etkileşiminin yüksek gradlı gliom ile düşük gradlı gliom hasta serumlarından ayırt edilebilecek şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca GB'lerde SLC3a2'nin büyük oranda fosforile olduğunu ve serum etkileşiminin özgün bir şekilde diğer yüksek gradlı gliomlardan farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Klinik olarak incelendiğinde, GB hastalarında SLC3a2 otoantikor reaktivitesi ile sağ kalım süreleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ( $p=0.043$ ;  $R=0.517$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Glioblastom, gliom, otoantikor, biyobelirteç, SLC3a2

Bu tez çalışması aynı isimli 216S358 proje nolu TÜBİTAK 3001 projesi kapsamında desteklenmiştir.

## 2. ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is a malignant brain tumor with an extremely invasive character. The median survival is only 12-15 months for glioblastoma patients. Therefore, early diagnosis of the disease is of great importance. The autoantibody studies give promising results as a biomarker in early diagnosis of various diseases. However, autoantibody studies using patient sera are carried out against proteins already known in cancer. On this basis, p53 autoantibodies were found in a study conducted in cancer patient sera. To date, investigation of autoantibodies to detect new autoantigens have not been reported yet. In this study, the autoantibody-autoantigen interaction was investigated both in tumor tissue of glioma patients and in epilepsy (control) cases. It has been detected that the autoantigen exhibits a GB specific profile due to its interaction with the serum. In this context, proteins with high expression levels in GBs were determined by proteomics studies. Additionally, the protein level was confirmed by immunohistochemistry and western blot methods. Immunoprecipitation and immunofluorescence studies against highly expressed proteins revealed the presence of autoantibody interaction against SLC3a2, one of the solute carrier proteins, in high grade gliomas. The SLC3a2 interaction in high grade glioma patient sera was distinguishable from low grade glioma patient sera. Therefore, this study indicated that SLC3a2 autoantibodies have diagnostic and prognostic significance in high grade gliomas. It is demonstrated that the SLC3a2 is highly phosphorylated in GBs. Furthermore, the serum interaction uniquely differs between GBs and other high grade gliomas. In clinical aspect, a positive correlation was found between SLC3a2 autoantibody reactivity and survival of GB patients ( $p = 0.043$ ;  $R = 0.517$ ).

**Key Words:** Glioblastom, glioma, autoantibody, biyobelirteç, SLC3a2

This thesis study was supported within the scope of TÜBİTAK 3001 project with the same name, project number 216S358.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Gliomlar, tüm intrakranyal tümörlerin %40 kadarını oluşturan ve en sık görülen primer beyin tümörüdür. Histopatolojik olarak gliomlar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflandırmasına göre, düşük grade (WHO I ve II) ve yüksek grade (WHO III ve IV) olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Gliomların da %60-70 kadarını astrositomlar oluşturur (1,2). Astrositomlar, beynin destek hücrelerinden olan yıldız şeklindeki astrositlerden kaynaklanmaktadır ve bu tip tümörler, beyin sapı, omurilik ve beyin gibi santral sinir sistemi bölümlerinden herhangi birinde gelişebilmektedir. Astrositomlar, düşük dereceli astrositom, anaplastik astrositom ve glioblastom (GB) olarak başlıca 3 gruba ayrılır (3). Yüksek grade gliomlardan olan malign glioblastom ise tüm beyin tümörleri içinde en sık görülen ve seyri en kötü olanıdır. Glioblastom tümörleri, genellikle serebral hemisferlerin beyaz maddesinde yerleşirler. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu hemisferlerde geniş dağılım gösterir ve en sık olarak frontal lob ve oksipital lob-parietal lob sınırlarında gözlenirler. Glioblastom, hızlı büyür ve yakınındaki dokulara yayılır. Glioblastom teşhisinden sonra hasta ortalama 12 ay kadar yaşamını sürdürebilmektedir (4). Dolayısıyla hastalığın erken tanı ve tedavisine yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Geleneksel olarak gliom tanısı görüntüleme yöntemleri ve histopatolojik analizler ile konulabilmektedir. İki yıllık sağkalımı %30'un altında olan gliom olgularında biyopsi temelli invazif yöntemlere gerek duyulmadan, hastalığın erken dönemlerinde tanıya ulaştırabilecek ve prognoz ile ilgili bilgi verebilecek yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Gliomların özellikle hızlı yayılım göstermesi ve beyin biyopsisi ile ilgili yan etkiler yeni serum temelli biyobelirteçlerin belirlenmesini gündeme getirmiştir. Bu özelliklere sahip bir tanı yönteminin gliom dokusundaki aberran proteinlere karşı üretilmiş otoantikorların belirlenmesi yoluyla gerçekleştirilmesi mümkündür. Tümörlere özgü antijenlerin kuvvetli bağışıklık yanıtına sebep olduğu ve bunun genellikle otoantikor üretimi ile seyrettiği iyi bilinmektedir. Tümör ile ilişkili proteinlerin aşırı düzeyde ifade edilmeleri, mutant formlu onkogenik proteinler olmaları veya embriyonik kökenli olmaları sebebiyle kuvvetli otoimmün yanıtı sebep oldukları düşünülmektedir. Günümüzde otoantikorlar, sinir sisteminin otoimmün ensefalit, nöromyelitis optika ve multipl



skleroz gibi çeşitli otoimmün hastalıklarında tanı ve/veya prognoz belirteci olarak yaygın kullanım alanı bulmuş ve rutin kullanıma girmişlerdir. Tümöre özgü otoantijenlere karşı gelişen antikörlerin de benzer şekilde gliom tanısında kullanılmaları mümkündür. Farklı yöntemlerle belirlenecek gliom ilişkili tek bir otoantikör veya bir antikör paneli ile gliom tanısında ve prognoz tayininde ilerleme kaydedilmesi ön görülmektedir (5–11).

Literatürde otoantikörlerin, beyin tümörleri ile ilişkisine yönelik, hastalığın patolojisiyle ilgili olabilecek ve bilinen antijenlere özgü tarama yapılmasına karşılık serum örnekleri ile tümör dokusunu aynı anda tarayacak nitelikte yeni otoantikörler ve ilişkili antijenlerin/peptitlerin tespitine ve bunların grade özgünlüğüne yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır (12–14). Yakın zaman önce yapılan bir çalışmada, tümöre özgü lineer peptidlerin kullanıldığı bir protein mikroarray incelemesi aracılığıyla gliom hastalarının serum antikörleri taranmış ve gliom tanı özgüllüğü ve duyarlılığı %87 ile %100 arasında değişen otoantikörler tanımlanmıştır (14). Ancak bu çalışmada kullanılan yöntem otoantijenlerin konformasyonel yapısını tanıyan antikörlerin tanımlanmasına izin vermemektedir. Konformasyonel hedefleri tanıyan antikörlerin patogeneizde ön planda rol oynadığı ve bu sebeple tanı ve prognoz belirlenmesinde daha yararlı oldukları bilinmektedir. Bu çalışmada kullandığımız immünopresipitasyon ve kütle spektrometri yöntemleri bu tür antikörleri daha hassas bir şekilde belirlemek üzere tasarlanmış ve geçmişte pek çok tanısal/prognostik değeri olan antikörlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (15).

Bu tez çalışmasında, gliom evrelerine özgü ve glioblastom ayırıcı niteliği taşıyan anti-glioblastom otoantikörlerin tespiti ve bu antikörlere özgü antijen profilinin çıkarılarak yeni biyobelirteçlerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

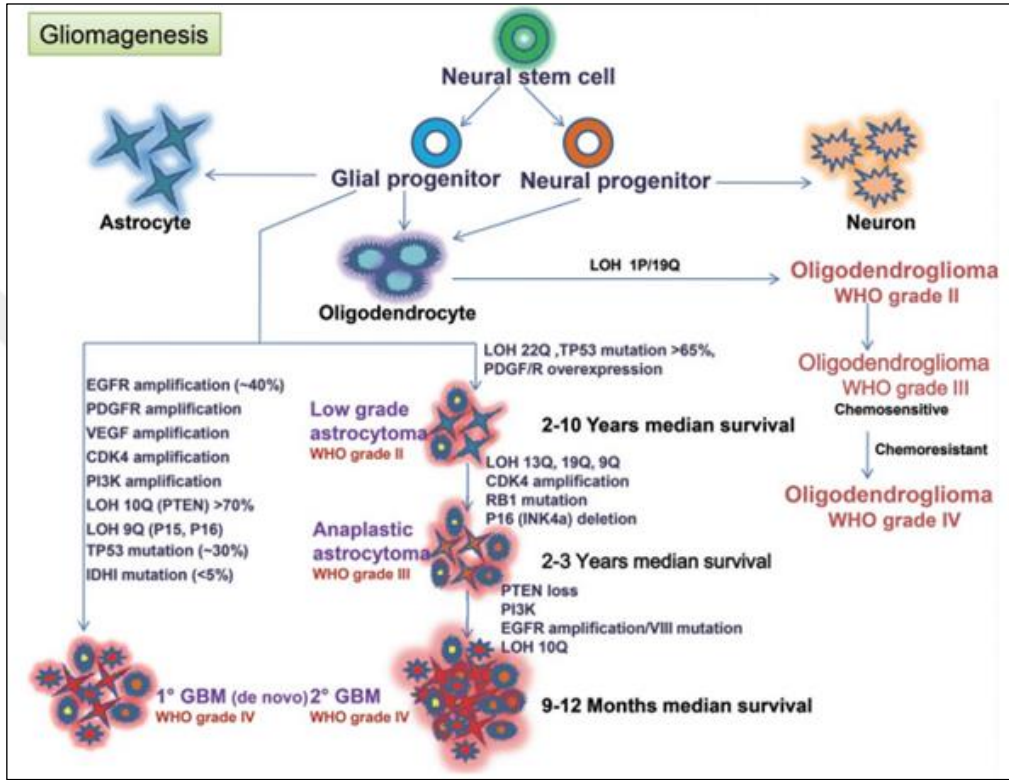
### 4.1. Gliomlar

Gliomlar, Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde çok yaygın olarak gözlenen ve glial hücrelere benzerlikleri ile karakterize edilen heterojen yapıda beyin tümörüdür (16). Her yıl dünya genelinde yaklaşık 100.000 insana gliom tanısı konmaktadır (17). Her ne kadar yeni tanısı konmuş tüm kanser vakalarının %1'ini içerse de gliomlar önemli derecede ölümcüldür (18). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) gliomları I-IV gradlara ayırmaktadır. Bu bağlamda, grad I-II gliomlar düşük gradlı, grad III-IV gliomlar ise yüksek gradlı gliom olarak adlandırılmaktadır. Gradları açısından incelendiğinde grad I-II başlangıç aşaması, grad III malignant ve grad IV malignant olmakla birlikte çok agresif olarak düşünülmektedir (19). Düşük grad gliomlar daha çok çocuklarda yüksek gradlar ise yetişkinlerde gözlemlenmektedir (19). Gliomlar yüksek proliferative potansiyele sahip infiltratif büyüme davranışı gösterme eğiliminde olmaktadır (19). Bu yüksek invazif karakter grad seviyesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Nöbet, ekstremitelerde zayıflığı ve davranış değişikliği şikayeti olan hastalara düşük gradlı gliomlar için malignant gliom teşhisi konulabilmesi için 3 aydan 6 aya kadar nörolojik muayene yapılmaktadır (20). MRI ile gliom ilişkili beyin lezyonlarının tespit edilmektedir. Fakat gliom alttıplemesi yapılabilmesi için biyopsi ya da cerrahi rezeksiyon sonucu elde edilen tümör dokusunun moleküler olarak analiz edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda hastalarda P53, ATRX, IDH1/2 mutasyonları, EGFR amplifikasyonu, Ki67 pozitifliği ve 1p19q kromozom delesyonlarının varlığı incelenmektedir (21).

Gliomlar ortaya çıkma aşamasında grad IV gliomlara transforme olana kadar çok yüksek intratümör heterojenite kazanmaktadır. Bu ise gliom oluşumunun nöral kök hücrelerden (NKH) başlaması sebebiyle meydana gelmektedir. NKH'ler glial ya da nöron hücrelerine doğru farklılaşma basamağına girdiğinde glial progenitör ve nöral progenitörleri oluşturmaktadır. Normal süreçte bu progenitörler ayrı ayrı glial hücre ve nöronlara farklılaşmaktadır. Fakat bu hücreler radyasyon, kimyasallar, viral enfeksiyon veya genomik instabiliteye (TP53 ve PTEN mutasyonu gibi) maruz kaldığında bu hücreler gliom kök hücrelerine (GKH) transforme olmaktadır. GKH

geçirdikleri malign transformasyona göre çeşitli gradlardaki gliomlara kadar dönüşmektedir. Bu dönüşümde GB hücreleri anaplastik astrositomlardan ya da direkt glial kök hücrelerden forme olmaktadır. Oligodendrogliomlardan ise hiçbir şekilde malign transformasyon boyunca GB'ler meydana gelmemektedir. Gliom oluşumunun aşamaları Şekil 4.1.1' de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



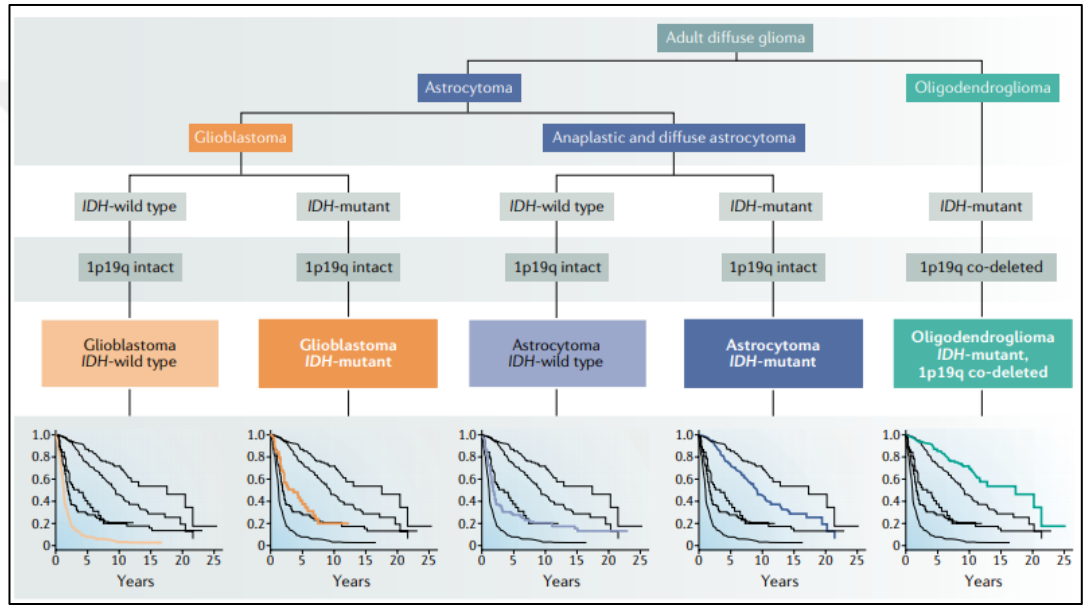
Şekil 4.1.1 Nöral kök hücrelerden gliomların oluşumu (19)

#### 4.1.1. Gliomların sınıflandırılması

DSÖ 2007' de gliomları histopatolojik kriterleri göz önüne alarak evrelere (grad) sınıflandırmıştır. Bu sebep ile birkaç morfolojik alt tip doku orjini hakkında genel yargıya varılmasını sağlamaktadır. Bu durum klinik çalışmalarda gözlemciye bağlı çeşitlilik oluşturmaktadır (22). Bu belirsizlikle mücadelede biyologların gliomlar hakkında moleküler ve kromozomal alt tipler oluşturması ile 2016' da gradları yeniden tanımlamak için gerekli veri toplanmıştır (23–25). Bu bağlamda, DSÖ tümör morfolojisini, IDH mutasyonlarını ve 1p/19q kromozomu kodelasyon durumlarını entegre ederek gliomlar için yeni sınıflandırma sistemi belirlemiştir. Bu yeni sınıflandırma sistemi ile yetişkin difüz gliomlar 5 temel kategoriye ayrılmaktadır (26).

1. Glioblastom, IDH yabanıl tip
2. Glioblastom, IDH mutant tip
3. Difüz ya da anaplastik astrositom, IDH yabanıl tip
4. Difüz ya da anaplastik astrositom, IDH mutant tip
5. Oligodendrogliom ya da anaplastik oligodendrogliom, IDH mutant ve 1p/19q kodelesyonlu tip

Bu 5 gliom alt tip için 1989-2012 yılları arası toplanan verilerden oluşan Kaplan-Meier sağ kalım grafiği Şekil 4.1.1.1' de gösterilmektedir.



Şekil 4.1.1.1 DSÖ 2016 sınıflandırması ve glioma alt tiplerin sağ kalım eğrileri (26)

Bununla birlikte, grad IV gliom sınıflandırması önceleri yalnızca Glioblastom (GB) için kullanılırken DSÖ' nün 2016 yılındaki yeni sınıflandırması ile bu değişmiş ve grad IV olup GB olmayan gliom tanımlaması yapılmıştır (27). DSÖ' nün eski sınıflandırması Şekil 4.1.1.2' de yeni sınıflandırması ise Şekil 4.1.1.3' de gösterilmektedir.

Table 1 WHO 2007 classification for diffuse gliomas			
Type	Grade	Description	Median survival (years)
Astrocytoma	II	Found diffusely infiltrating into surrounding neural tissue; increased hypercellularity, no mitosis	6-8
Oligodendroglioma	II	Occur in the white matter and cortex of the cerebral hemispheres, low mitotic activity, no necrosis	12
Oligoastrocytoma	II	Diffuse mixed tumor with mixed glial background	3 to >10
Anaplastic-astrocytoma/ oligodendroglioma	III	Highly infiltrating tumors with increased mitotic activity; no necrosis or vascular proliferation	3
Glioblastoma	IV	Infiltrating glial neoplasm with necrosis and micro-vascular proliferation; high rate of mitosis	1 to 2

WHO, World Health Organization.

Şekil 4.1.1.2 DSÖ 2007 gliom sınıflandırması (1)

WHO grades of select CNS tumours	
<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV
Glioblastoma, IDH-mutant	IV
Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III
<b>Other astrocytic tumours</b>	
Pilocytic astrocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III
<b>Ependymal tumours</b>	
Subependymoma	I
Myxopapillary ependymoma	I
Ependymoma	II
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III
Anaplastic ependymoma	III

Şekil 4.1.1.3 DSÖ 2016 son sınıflandırması MSS tümörlerinden bazıları (27). Yeni sınıflandırmaya göre grad IV gliomlardan GB olan ve olmayan beyin tümörleri kırmızı kutu içerisinde görülmektedir.

#### 4.1.2. Gliomların Tedavisi

Tüm gliomlar için ana tedavide cerrahi operasyon ile tümör kütlesi çıkarılmaktadır. Cerrahi operasyon sırasında tümör dokunun yeterince kazınmaması hasta yaşamını olumsuz etkilemektedir (28). Cerrahi operasyon dışında düşük gradlı gliomlar için ilave tedavi tümör progresyonunun önüne geçmek için uygulanmaktadır (29). Radyoterapi ise tümör ilerlemesinin engellenmesi ve toplam sağkalım üzerine ciddi ölçüde olumlu etkileri olmasına rağmen 18 yaş altı çocuklarda uygulanmamaktadır. Çünkü bu yaş gurubundaki bireylerde radyoterapinin son dönem

negatif etkileri ve sekonder malign elištirme riski bilinmektedir (30, 31) . Bunun yerine bu bireylerde radyoterapi ihtiyacı, düşük grad gliomların progresyonunu geciktirmek ya da engellemek için kemoterapi ile karşılanmaktadır (29).

Glioblastom gliomlardan en malign karaktere sahip olan beyin tümörüdür. GB hastaları teşhis konulduktan sonra maalesef ortalama 12-15 ay arası yaşayabilmektedir. Düşük gradlı gliomlar ise ortalama 7 yıla kadar yaşamlarını sürdürebilmektedir. Glioblastom olmayan yüksek gradlı gliomlar bu düşük grad gliomlardan gelişmektedir (32). Glioblastoma ve diğer yüksek gradlı gliomlar için standard terapi, cerrahi operasyonun ardından uygulanan adjuvan kemoterapi ve radyoterapi olmaktadır (33). Kemoterapi olarak geleneksel tedavide Temozolomid (TMZ) uygulanmaktadır. DNA onarım proteini O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metil-transferaz (MGMT) promotör durumuna göre GB hastalarının bazılarında TMZ bazlı kemoterapiye direnç gelişmektedir. Bu vakalarda MGMT promotör metilasyon seviyesindeki azalış ya da MGMT protein seviyesindeki artış TMZ' ye direnç gelişmesine sebep olmaktadır (34).

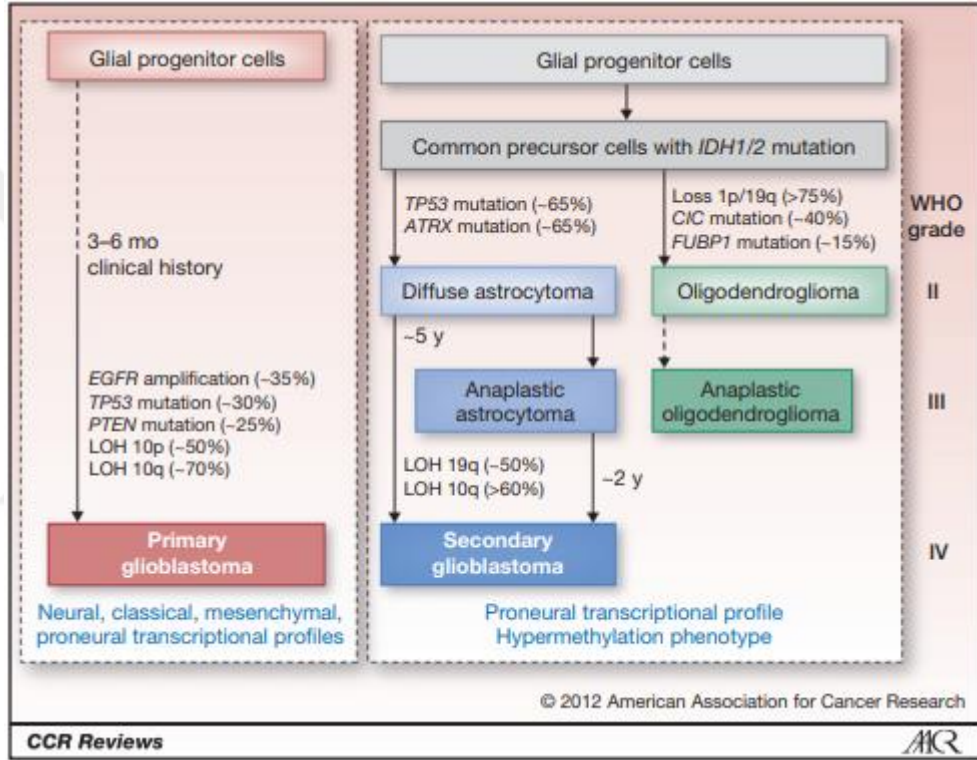
#### **4.2. Glioblastom (GB)**

Glioblastom merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri arasındaki en ölümcül en kötü huylu gliomdur ve tüm difüz gliom tanısı konulan vakaların yaklaşık %70-75'ini içermektedir (26). Glioblastom hastalarının ortalama sağ kalım süresi 15 ay olmaktadır (35). Glioblastom hastalarının %5' inden azı 5 yıla kadar yaşamaktadır. DSÖ GB'yi grad IV gliom olarak tanımlamaktadır. En son güncellemelere göre DSÖ bu sınıflandırmada histopatolojik, morfolojik özellikleri ve moleküler değişimleri kriter almaktadır (36).

Glioblastom ortaya çıkma kökenine göre primer ve sekonder GB olarak adlandırılmaktadır. Primer GB GKH şeklinde adlandırılan kanser kök hücrelerinden (KKH) kökenlenerek geliştiği öngörülmektedir. Sekonder GB ise astrositlerde mutasyonların birikmesiyle bu hücrelerin malign transformasyona uğraması sonucu meydana gelmektedir. Sekonder GB gelişimi düşük gradlardan zamanla ortaya çıktığı için uzun yıllar sürebilmektedir. Oysa primer GB *de novo* yolla gelişim gösterdiği için

birkaç ay içerisinde ortaya çıkmaktadır. Primer ve sekonder gelişimi ve malign transformasyon boyunca meydana gelen mutasyonlar Şekil 4.2.1’de görülmektedir.

Gliom hastalarından elde edilen verilere göre GB’lerin %43’ü frontal lobda, %28’i temporal, %25’i parietal ve %3’ü de osipital lobda bulunmaktadır (37). Bununla birlikte, GB diğer gliomlar gibi frontal loblara doğru bilateral bulunma eğiliminde olmaktadır (38). Yine de sağ hemisferde bulunma sıklığı sol hemisfere göre daha fazla görülmektedir (39).



Şekil 4.2.1 Primer ve Sekonder GB' nin gelişimi (40)

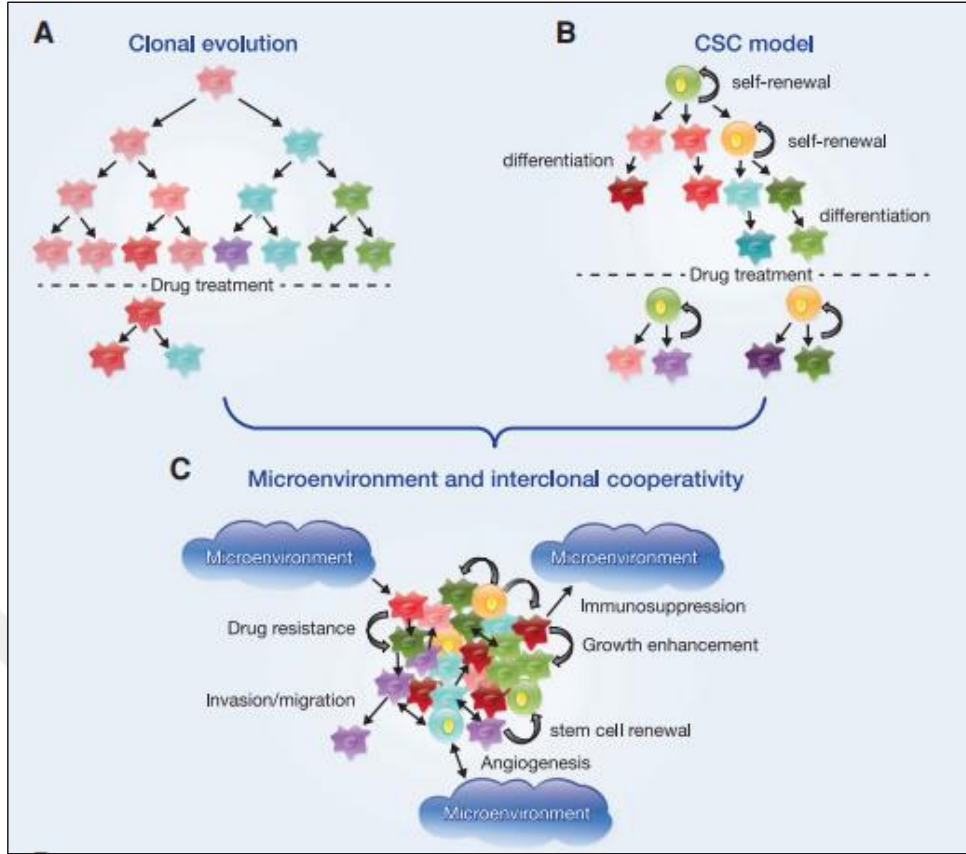
Glioblastom hastalarına günümüzde standart tedavi ve cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve adjuvant temozolomid tedavisi uygulanmaktadır. Eğer cerrahi operasyonla birlikte radyoterapi temozolomid olmadan hastalara uygulanırsa ortalama sağkalım süreleri 12.1 ayken temozolomid tedavisi ile 14.6 aya çıkmaktadır (33). Glioblastom tümör dokusu uzaklaştırıldıktan sonra her ne kadar bahsedilen tedavi yöntemleri kullanılsa da tümör doku çok hızlı bir şekilde nüks etmektedir.

Glioblastom çok invazif karaktere sahip ama metastaz yapmayan bir tümör olarak kabul edilmektedir. Çok yüksek invazif karakterde olup grad IV olarak tanımlanmasına rağmen metastaz yapmaması biriken veriler ışığında 3 sebebe bağlanmaktadır (41).

1. Çok agrasif ve malign karaktere sahip olduğu için hasta sağ kalım süreleri çok düşüktür ve tümör olgusu metastaz yapmadan hasta yaşamını yitirmektedir.
2. Hastanın bağışıklık sistemi tümörün metastaz yapmasını engellemektedir ve hasta sağ kalım süresi düşük olduğundan hasta immünitesi GB' nin metastatik kabiliyetine baskın geldiği varsayılmaktadır.
3. Kan beyin bariyeri GB' nin metastaz yapmasını engellemektedir.

Glioblastoma yönelik gerçekleştirilen ilaç denemelerinin yüksek tümör heterojenitesi sebebiyle başarısızlığa uğradığı ve ilaç direncinin geliştiği düşünülmektedir. Bu tümör heterojenitesinin oluşmasında 3 model öne sürülmektedir (42). Bu modeller Şekil 4.2.2' de özetlenmektedir.





Şekil 4.2.2 Glioblastom tümör heterojenitesinin kökenleri (43).

### Klonal Evrim Modeli

Kanser hücrelerinin gelişiminin evrimsel süreç olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte doğal seçilimin bir gereği olarak çevresel şartlara daha çok uyum sağlayan hücreler hayatta kalmakta ve tümör büyümesinden sorumlu olmaktadır. Bu bağlamda aynı zorlu çevreye uyum sağlayabilmiş hücreler çeşitli mutajenlere maruz kalarak birbirinden farklı genomik ekspresyon modeline sahip olmaktadır. Bu kendilerine has özellikler taşıyan klonlar proliferasyon olarak tümör heterojenitesini oluşturmaktadır. Bununla birlikte bu klonlar kemoterapi ya da radyoterapi gibi seçici baskılara adaptasyon sürecinde çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmektedir. Böylelikle GB dokusunda çoklu ilaç direnci (muti-drug resistance; MDR) meydana gelmektedir.

## **Kanser Kök Hücresi (KKH) Modeli**

Bu teori , hiyerarşik bir organizasyon ile KKH' nin alt popülasyonlarından tümörün doğduğunu varsaymaktadır. Bu modele göre, sadece KKH' ler sınırsız bölünme kabiliyetiyle heterojen olarak farklılaşan hücrelere sebebiyet vermektedir. Bu KKH' ler zamanla mutasyon kazanmakta ve heterojen KKH popülasyonu oluşturmaktadır. Tedavi sırasında dirençli hücreler yaşamaya devam etmektedir. Zaman içerisinde bu dirençli soylar çoğalmakta ve böylelikle tedavi sonrası tümör dokusundaki nüks ve ilaç direncinden sorumlu olmaktadır.

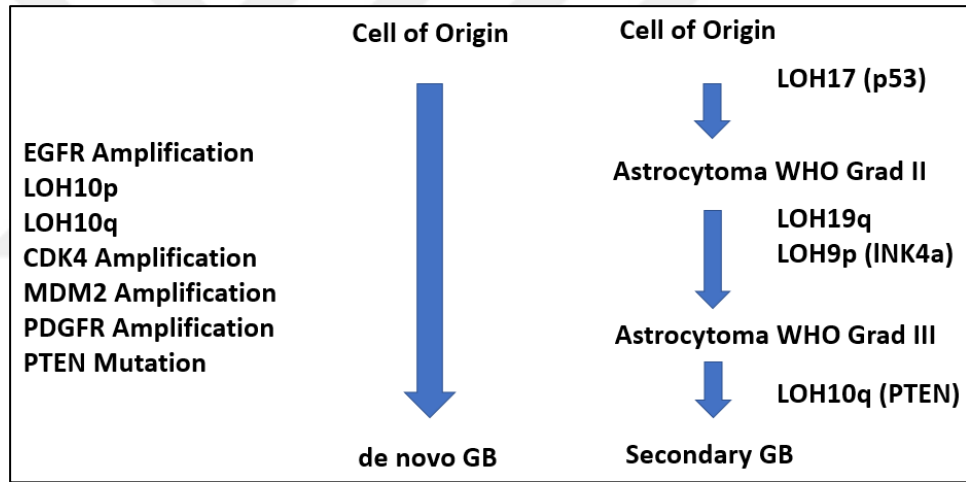
## **Mikroçevre ve İnterklonal Kooperatif Modeli**

Tümör, heterojenite, klonal evrim ya da KKH ile meydana gelse de heterojenitenin uzun zaman boyuca sürdürülmesi gerekmektedir. Tümör progresyonunun ve heterojenitenin sürdürülmesi için alternatif mekanizma olarak interklonal kooperatif modeli öne sürülmektedir. Bu modele göre, onkojenik mutasyonlar kazanan hücreler pro-onkojenik tümör mikroçevre fenotipinin oluşmasına sebep olmaktadır. Kanser hücre-kanser hücre etkileşimi ile bazı faktörlerin üretilmesi yakındaki farklı klonal hücrelere de avantajlar sağlamaktadır. Böylelikle popülasyonun tamamının davranışı fenotipik olarak farklı küçük miktar hücrelerden yoğun oranda etkilenmektedir. Bu model, metastazın uyarılmasıyla tümörejenik olmayan hücrelerin büyüme oranlarının artması üzerine yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Bir çalışmada *lnk4/Arf* null+ yabancı EGFR eksprese eden tümörejenik olmayan astrositler , *lnk4/Arf* null+ mutant EGFR eksprese eden tümörejenik astrositlerle farelere birlikte enjekte edildiğinde tümörejenik olmayan astrositlerin büyüme hızının arttığı gözlenmiştir (43).

### **4.2.1. Patogenezi**

Glioblastom (GB) patogenezi ile ilgili en önemli mutasyonlardan biri IDH1/2 mutasyonlarıdır. Öyle ki, DSÖ 2016' da en son gerçekleştirdiği sınıflandırmada GB'leri IDH yabancı tip ve IDH mutant olarak 2 gruba ayırmaktadır (Şekil 4.1.1.3). IDH sitrik asit döngüsünde rol oynayan bir enzimdir ve IDH1, IDH2 ve IDH3 olmak

üzere 3 formda bulunur. IDH mutasyonları nerdeyse tüm sekonder GB' lerde gözlemlenmektedir (44). Bununla birlikte GB' lerde PTEN, TP53, ATRX mutasyonları ve 10. kromozom kısa ve uzun kollarının kaybı gözlenmektedir. Genel olarak diğer kanser çeşitlerinde de gözlemlenen oldukça aktif EGFR sinyal yolağı ve artan EGFR düzeyleri GB patogenezi açısından önemli bir diğer durumdur. Fakat, GB' lerde EGFR artışının yanı sıra EGFR mutasyonlarından EGFRVIII mutasyonu da gözlemlenmektedir ki bu mutant reseptör GB' lerde yüksek seviyede eksprese olmaktadır. EGFRVIII' de EGFR geninin 2- 7 ekzonları delesyona uğramaktadır ve bu da ekstraselüler bölgesinde bazı kısımların kaybına (truncated) sebep olmaktadır (45) . Glioblastomların yaklaşık %50-60' ı yabancı tip EGFR ile birlikte EGFRVIII mutant varyantını eksprese etmektedir (46) . Glioblastom patogenezinde rol oynayan değişimler Şekil 4.2.1.1' de gösterilmektedir.



Şekil 4.2.1.1 GB patogenezi

#### 4.2.2. Güncel Tedavi Yaklaşımları

Glioblastomun mevcut tedavi yöntemlerini oluşturan radyoterapi ve kemoterapide hedef seçiciliği bulunmamaktadır. Buna ek olarak tümör dokusu kemoterapiye direnç göstermektedir. Ayrıca, cerrahi rezeksiyon sonucu çok hızlı bir şekilde tümör nüksü veya radyonekroz gözlemlenmektedir. Bu nedenle tümör dokusunu spesifik olarak hedefleyebilmek için GB ayırıcılığı bulunan özgün biyobelirteçlerin saptanması yönünde çalışmalar yapılmaktadır.

## **Reseptör Hedefleyen Terapötikler**

Son 20 yıl boyunca reseptör hedefleyen terapiler oldukça gelişmiş bulunmaktadır. Bu reseptörlerin ligandları çeşitli öldürücü ajanlarla füzyon edilerek, öldürücü ajanların hedef seçici olarak hücreye internalizasyonu hedeflenmektedir. Bu öldürücü moleküller çeşitli protein yapıdaki toksin molekülleri olmaktadır. Toksinler, immünotoksin veya sitotoksik konstraktlar olmak üzere hedefli toksinler halinde oluşturularak klinik öncesi ve bunu takip eden klinik araştırmalarda yer almaktadır [4]. Bu hedefli toksinler ile kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilen veya sadece kanser hücrelerinde ifade edilen reseptörlere yönelim sağlanarak, sağlıklı dokuya zarar vermeden kanser hücrelerine özgü hücre ölümünü sağlamak amaçlanmaktadır [5-8].

## **Terapötik Hücreler**

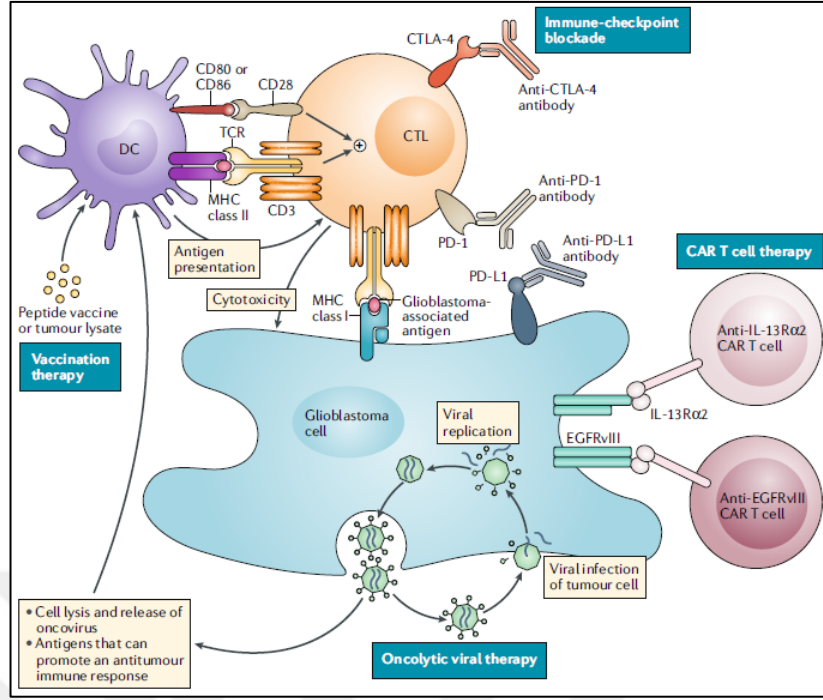
Çeşitli hücreler terapötik olarak GB tedavisine yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bunlardan en heyecan vericilerinden birkaçı CAR-T (Chimeric Antigen Receptor-T ) hücresel terapi, kök hücre terapisi ve kanser hücrelerine karşı kanser hücrelerinin kullanılması yaklaşımıdır. Bir çalışmada, CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) ile düzenlenmiş GB hücrelerinin, TRAIL salgısıyla hedef GB hücreleri öldürmesi sağlanmıştır (47). Bu çalışma kansere karşı kanser hücrelerinin terapötik olarak kullanılabileceğini gösteren gayet heyecan verici bir çalışmadır. Terapötik kanser hücreleri, hücresel terapi yaklaşımlarının hepsinde görüldüğü gibi intihar genleri ile yüklenmektedir. Tedavi sonrası görevini tamamlamış bu hücreler intihar genleri vasıtasıyla apoptoza sürüklenip yok edilebilmektedir. Bu sebeple, güvenlik endişelerini ortadan kaldırmaktadır.

T hücre reseptörü (THR) antijenleri MHCII proteinleri vasıtasıyla tanınmaktadır. CAR-T teknolojisinde THR ucuna kanser spesifik yüzey antijenleri yüksek seçicilikle tanıyan ligand ya da antikor fragmanları yerleştirilmektedir. Bu sayede MHC bağımlılığı olmadan kanser hücrelerini hedefleyebilmektedir. CAR-T terapi solid olmayan tümörler üzerine çok fazla çalışılmış olsa da günümüzde GB özgüllüğü bilinen IL13R $\alpha$ 2 gibi reseptörleri hedefleyen CAR-T' ler giderek gelişmektedir.

Kök hücrelerin terapötik olarak kullanılması ise daha çok terapötik ajanların vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Glioblastom açısından incelendiğinde nöral kök hücreler ön plana çıkmaktadır. Çünkü nöral kök hücrelerin tümör tropizma özelliği daha önce araştırmacılar tarafından saptanmıştır (48). Bu bağlamda çeşitli öldürücü ajanlar, toksinler, ligandlar kök hücrelerle hedef noktaları taşınabilmektedir.

## **İmmünoterapi**

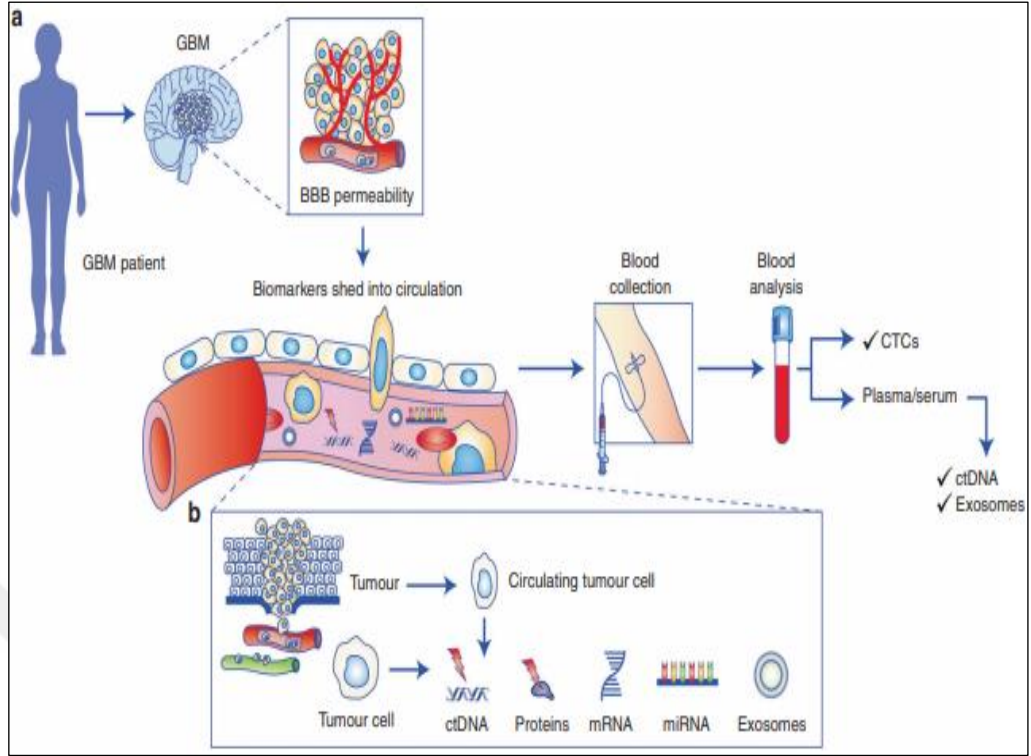
İmmünoterapide son yıllar birkaç umut verici yaklaşım gelişmiştir. Bunlar arasında immün modülatör antikoların kullanılması ile tümör dokunun immünsupresif etkisini engelleme çalışmaları bir hayli yol kat etmektedir. Anti-CTLA-4 ve anti- PDL-1 gibi immün kontrol noktalarını hedefleyen monoklonal antikolar çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kanserlerde gelişen yeni antijenlere karşı doğal immüniteden yararlanma fikri aşı çalışmalarının önünü de açmaktadır. Kanser vakalarında özellikle MHC' lerin ekspresyonunun azaldığı ve böylelikle kanser hücrelerinin T ve NK hücrelerinden kaçabildiği görülmektedir. Ayrıca antijen sunan hücrelerin (ASH) tümör dokusunda kendini kendinden olmayandan ayırma özelliklerini kaybederek tümör mikroçevre ilişkili hale gelmektedir. Bu sebeple günümüzde dendritik hücre aşılı, tümör antijen aşılı, RNA, DNA aşılı gelişmektedir. Bu yaklaşımların hepsi tümör hücrelerinin sunmadığı antijenleri bağışıklık sistemine *in vivo* ya da *ex vivo* yolla tanıtmayı amaçlamaktadır. Bununla birlikte, onkolitik virüsler vasıtasıyla GB tümör doku hedeflenebilmektedir. Hücre lizisi ile onkolitik virüslerin salınması immün sistemi tümör antijenlerine karşı harekete geçirmektedir. Glioblastom tedavisinde umut verici immünoterapötikler Şekil 4.2.2.1' de gösterilmektedir.



Şekil 4.2.2.1 Glioblastom tedavisinde immünoterapiklerin gelişimi (49).

### 4.2.3. Erken teşhis için biyobelirteç çalışmaları

Kanser hastalarında tümör bileşenlerinin kan ve omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarına döküldüğü gözlenmektedir (50). Bu sıvılardaki tümör bileşenlerinin belirlenmesi ve analizi biyobelirteç çalışmaları açısından önem arz etmektedir. Bu tümör bileşenleri sirküle olan nükleik asitler, ekstraselüler veziküller ve proteinlerdir (50). Bir tümörden kan beyin bariyeri boyunca vücut sıvılarına biyomolekülerin geçişi Şekil 4.2.3.1’ de görülmektedir.



Şekil 4.2.3.1 Bir tümörden vücut sıvılarına biyomoleküler transportasyon (50).

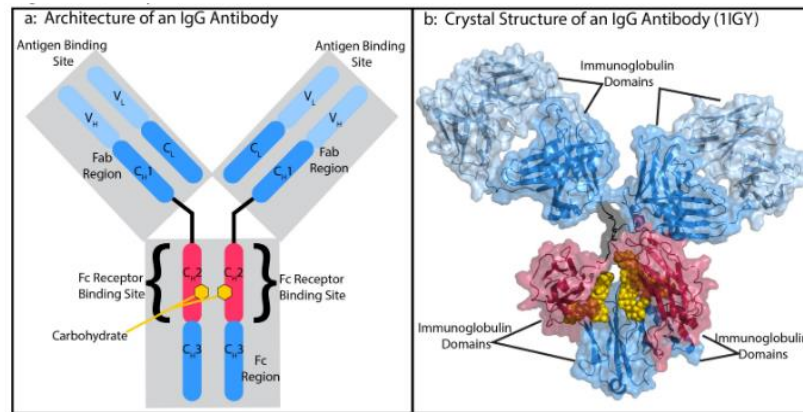
Sirküle olan nükleik asitler DNA ve RNA fragmentleridir. Yapılan çalışmalar sirküle olan DNA'ların apoptik hücre kaynaklı olduğunu göstermektedir (51). Bu DNA'lar salındıktan sonra fagositozla yok edilmekte ve dolayısıyla sağlıklı bireylerde çok düşük seviyelerde bulunmaktadır (52). Kanserli bireylerde sirküle olan DNA'ların içerisinde tümör DNA (tDNA) fragmanlarının bulunması da beklenmektedir. Fakat tDNA sayıları son aşama GB hastalarında artmaktadır (53). Bununla birlikte yarı ömürleri 1.5 saatten az olmaktadır. Bir çalışmada yeni GB teşhisi konulmuş hastalardan toplanan plazma numunelerinde EGFRvIII DNA fragmanlarına rastlanmıştır (54). RNA fragmanları da gliom hastalarının kan ve serumlarında daha önce tespit edilmiş olup biyobelirteç olarak kullanılabilirler belirtilmektedir (55,56). Bu doğrultudaki bir çalışmada, tedavi öncesi ve sonrası GB hasta plazmaları analiz edilmiş ve miR-128 ve miR-342-3p' nin sağlıklı kontrollere kıyas ile azaldığı gözlemlenmiştir (57).

Ekstraselüler veziküller hücreler tarafından salınmakta ve içerisinde RNA ,DNA ve hücresel proteinler gibi kargoları taşımaktadır (58,59). Bir çalışmada, GB

hastalarının tümör doku ve serumlarından izole edilen mikroveziküllerde EGFRvIII mutant varyantına rastlanmıştır, fakat sağlıklı kontrollerin mikroveziküllerinde bu mutant varyant gözlemlenmemiştir (60). Başka bir çalışmada ise ekstraselüler veziküllerin konsantrasyonunun GB hastalarında sağlıklı kontrole ve diğer MSS hastalıklarına kıyas ile arttığı gözlemlenmiştir (61). Bu çalışmaya göre farklı zaman noktalarında ekstraselüler veziküllerin konsantrasyonunun artışının tümör nüksü ile ilişkili olduğu saptanmıştır (61).

### 4.3. Biyobelirteç olarak otoantikorlar

Antikor üretimi adaptif immünitinin patojenlere karşı en önemli savunma mekanizmalarından biridir. Antikorlar plazma hücreleri olarak adlandırılan farklılaşmış B hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Her yapıdaki biyomolekülü yüksek hedef seçiciliği ile tanıyabilmektedir. B hücreleri antijen reseptör bağımlı sinyalleri aldıklarında B lenfoblastlar gelişmeye başlamakta ve immüoglobulin ‘class-switch recombination (CSR)’ a maruz kalarak antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmaktadır (62). Antikorlar immüoglobulin G (IgG) ailesinden ve 4 polipeptidten meydana gelmektedir. Bu 4 polipeptidten ikisi ağır zincir, diğer ikisi ise hafif zincir olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte bir antikor sabit (constant region) ve değişebilen (variable region) olmak üzere 2 bölgeye sahip bulunmaktadır. Değişebilen bölge antijene bağlanan kısımları içermektedir. Antijene bağlanan kısımlar hedef antijendeki epitop denenen spesifik bölgeleri tanımaktadır. Hedef antijen nükleik asit, protein ya da oligosakkarit yapıda olabilmektedir. Bir antikorun moleküler ve kristal yapısı Şekil 4.3.1’ de görülmektedir.



Şekil 4.3.1 IgG antikorları



Kanser hücreleri immünolojik yanıtları uyararak tümör ilişkili otoantikörlerin üretimine neden olmaktadır (63). Çünkü tümör hücrelerinde anormal olarak sentezlenen biyomoleküller adaptif immünitinin bunları neoantijen olarak tanınmasına neden olmaktadır (63). Otoantikörler bir çok malignant tümörde hastalığın erken ya da son dönemlerinde belirlenmiştir ve prognostik ya da diyagnostik ilişkiye sahip oldukları düşünülmektedir (9). Serum otoantikörlerinin ölçülmesinin meme kanseri (64), akciğer kanseri (65), gastrik kanser (66), prostat kanseri (67), kolorektal kanserde (68) klinik faydaları olabileceği düşünülmektedir. Otoantikörler klinik semptomlar ortaya çıkmadan 5 yıl öncesine kadar ölçülebilmektedir (69). Akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada otoantikörlerin erken dönem kanser tanımlamasında kullanılabileceği öngörülmektedir (65).

#### **4.3.1. Glioblastom ilişkili otoantikör çalışmaları**

Glioblastomlarda hastalığın tanısı ya da prognozu ile ilişkili olarak sirküle olan otoantikörlerin tespitine yönelik literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Anti-GB otoantikörleri ve onların hedeflediği GB antijenleri erken tanı ve tedavi için umut verici fırsatlar doğurmaktadır. Glioblastom dahil gliom alt tipleri birbirinden kökenlenebildiği için bu konuda yapılan çalışmalar genelde diğer gliomlar ile kıyaslamalı yürütülmektedir. Elde edilen sonuçlar ise hastalığın patolojisine göre değişim göstermektedir. Nitekim, otoantikör-otoantijen saptanmasına yönelik gliom serum ve dokularında yapılan bir çalışmada filamin C (FLCN)' nin yeni gliom antijeni olduğu ve anti-FLCN otoantikörün yüksek grad gliomlara kıyas ile düşük grad gliomlarda yükseldiği tespit edilmiştir (12). Bu sebeple serum anti-FLCN otoantikörü düşük grad gliomların erken dönem diyagnozu için serum biyobelirteci olarak tanımlanmaktadır (12).

Serum otoantikörlerin tespitine yönelik en büyük zorluklardan biri serumdaki az otoantikör miktarı olmaktadır. Kanser vakalarında gözlemlenen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan çok sayıda neoantijene karşı plazma hücrelerinin antikör üretimi sınırlı sayıda olabilmektedir. Bu sebeple bazı araştırmacılar GB patolojisinde önemli role sahip ve terapötik olarak hedeflenebilir spesifik proteinlere yönelik otoantikör gelişimi mevcut mu diye tarama alanlarını daraltma yolunu seçmektedir. Bu doğrultudaki bir çalışmada, araştırmacılar membran bağlı olarak bulunan GB

antijenlerine yönelik otoantikör taramaları gerçekleştirmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda VEGFR2' ye yönelik otoantikörler gliom hasta serumlarında belirlenmiştir (70).

Bir spesifik antijene karşı serumda birden fazla otoantikör gelişebilmektedir. Farklı otoantikörler farklı epitoplari tanımaktadır ve birbirinden farklı soylardan gelmektedir. Bu aynı antijeni tanıyan otoantikörlerin üretilmeye başlandığı evre ve GB diyagnozu ve/veya prognozu açısından oynadığı roller birbirinden farklı olabilmektedir. Bir çalışma da bu olasılıklari göz önünde bulundurularak GB spesifitesi bilinen otoantijenlerden peptid arrayleri geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu peptid arraylerle aynı antijen için gelişip farklı epitoplari tanıyan otoantikörler için tarama gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın bulgularina göre , anti-TNC 'VCEDGFTGPDCAE' otoantikörlerin IDH1 yabancı tip GB hasta serumlarında arttığı saptanmıştır (71). Bu çalışmanın sonuçlari IDH1 yabancı tip GB tiplerinde artan sağ kalım oranlari ile ilişkili biyobelirteçleri daha iyi anlamamızı sağlamaktadır.

#### **4.4. Solüt Taşıyıcı Proteinler**

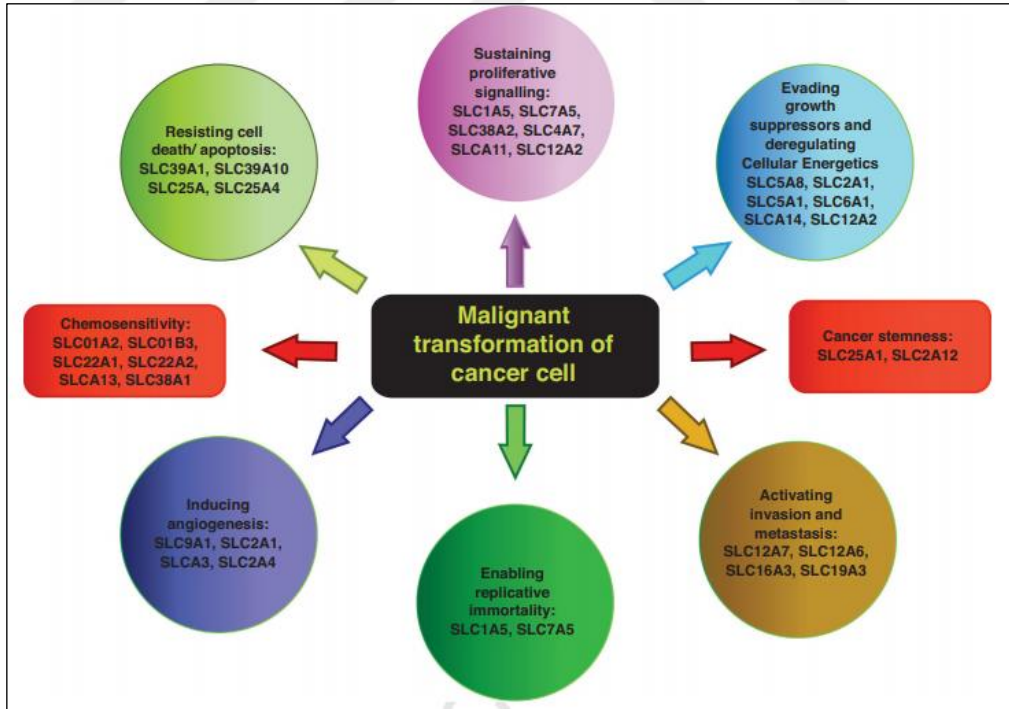
Her hücre membranında gömülü bulunan özelleşmiş protein bazlı kanallar vasıtasıyla çevresi ile moleköl alış verişinde bulunmaktadır (72). Hücre membranı seçici geçirgen bir yapıdadır ve patojenik ataklara karşı bariyer görevi görmektedir (73). Bu kanal ve transport proteinleri su, besin, transmitterler gibi temel tüm molekülleri import (hücre içine taşımakta) ve export (hücre dışına ihraç etmekte) etmektedir (74).

Transport proteinleri SLC'ler (solute carrier), ATP ile çalışan pompalar, iyon kanallari, su kanallari, ABC transport proteinleri ve benzeri proteinlerini kapsamaktadır (72). Bunlar arasından SLC'ler GPCR (G-protein coupled receptor)'lerden sonra en büyük ve en çeşitli grubu oluşturmaktadır (75). SLC' ler hücre membranı dışında organel membranlarında da bulunmaktadır ve moleküllerin transportuna olanak sağlamaktadır (76). Sekans homolojilere dikkate alındığında SLC'ler 4 aileye ayrılmaktadır (77).

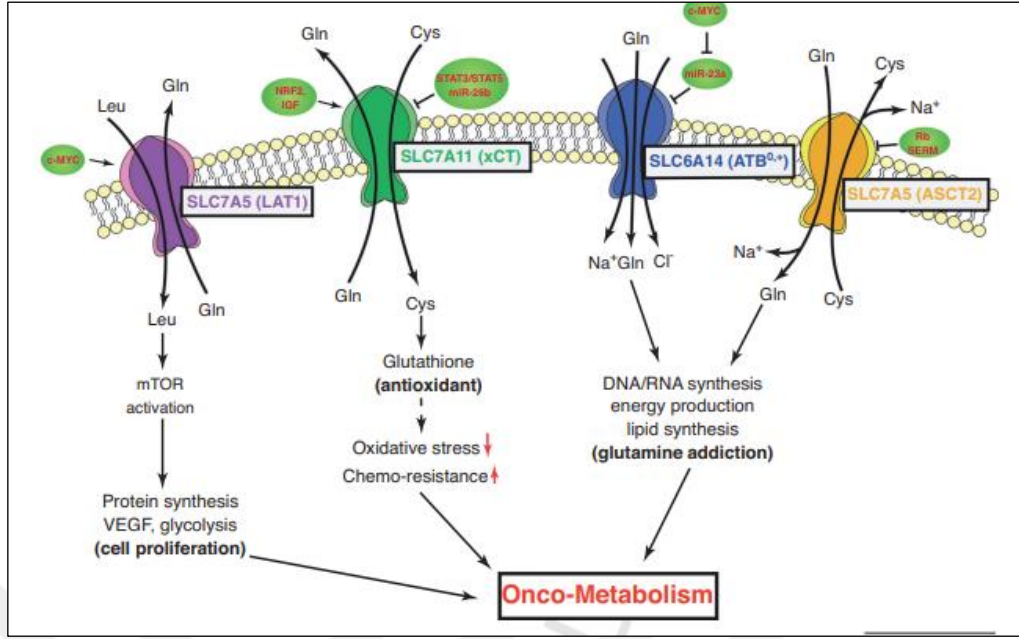
- a. Major Facilitator Superfamily SCL'lar (16 alt SLC ailesi)

- b. Aminoacid/Polyamine/Organo Cation (APC) Superfamily (11 alt SLC ailesi)
- c. Drug/Metabolite/ Transporter Superfamily (2 alt SLC ailesi)
- d. Cation:Proton Antiporter/Anion Transporter (CPA/AT) Superfamily (2 SLC ailesi)

Hücrel metabolizma moleküllerin içeri ve dışarı transportuna bağlı bulunmaktadır. Bu nedenle, SLC' ler yüksek oranda çalışan kanser metabolizması için önemli roller üstlenmektedir. Bu doğrultuda bazı SLC' ler kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir (76). Kanser hücrelerinde onkogenik malign transformasyonu düzenleyen SLC' ler Şekil 4.4.1' de gösterilmektedir. SLC1A5, SLC7A5, SLC6A14 ve SLC7A11 bazı kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir ve bu SLC'ler kanser hücrelerinin artan proliferasyonu ile onkometabolizma üzerinden ilişkili bulunmaktadır (78–80). Bu SLC' lerin detaylı görevleri Şekil 4.4.1 ve 4.4.2' de gösterilmektedir.



Şekil 4.4.1 Solüt taşıyıcı proteinler ve kanser malign transformasyon arasındaki bağlantı (72)



Şekil 4.4.2 Onkometabolizmada solüt taşıyıcı proteinlerin rolleri (72).

SLC'lerin hücre yüzeyinde bulunması kanser terapisi açısından onları önemli hedefler kılmaktadır. Çünkü bu SLC'ler hücre yüzeyinde eksprese olduklarından hücrel sitotoksititeye neden olmadan kolayca hücre dışından hedeflenebilir ve hedefleyici moleküller hücrel bariyerleri aşmak zorunda kalmamaktadır. Bununla birlikte kanser spesifikliği saptanmış SLC'ler hücrel terapi yaklaşımlarında tümör spesifikliği kazanmak için kullanılabilir görünmektedir.

#### 4.4.1. Solüt Taşıyıcı Protein 3A2 ( SLC3a2)

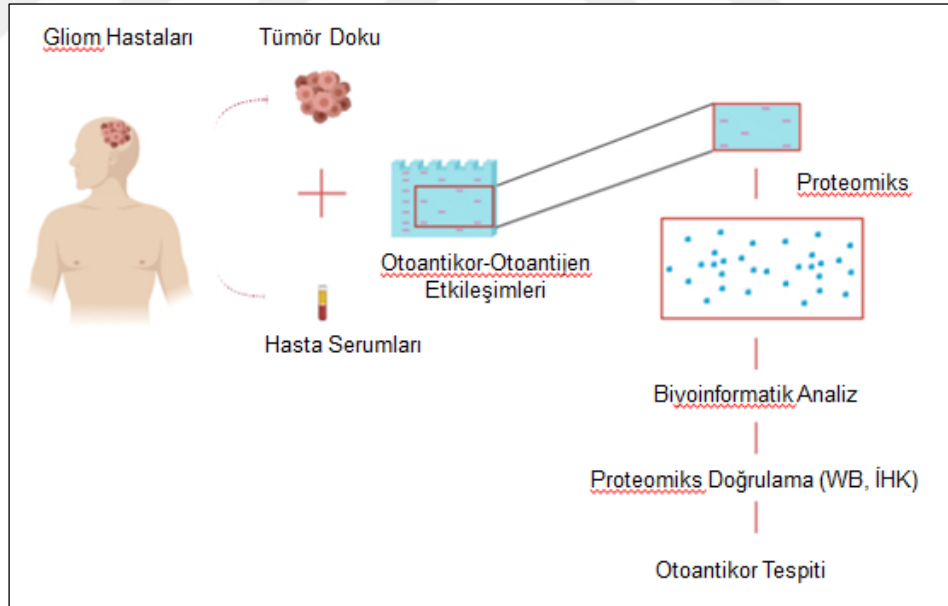
Amino asitler enerji kaynağı, metabolitlerin prekürsörleri, sinyal molekülleri ve proteinlerin yapı taşları olarak hücre içinde görevli önemli moleküllerdir (81). Bu nedenle hücre için temel amino asitlerin transportu hücrenin yaşamı açısından önem arz etmektedir. Amino asit transportuna amino asit transporterleri olarak adlandırılan membrana gömülü çeşitli SLC aileleri hizmet etmektedir. Bu proteinler hücre membranında birbirine disülfid köprüleri vasıtasıyla bağlanmış ağır ve hafif zincirden oluşan heterodimerik yapılar olarak bulunmaktadır (81). Ağır zincir SLC3 ailesine ait iken hafif zincir SLC7 ailesine ait bulunmaktadır (81). SLC3 ailesi 2 glikoproteinden (SLC3a1 ve SLC3a2) ve SLC7 ailesinin 15 amino asit taşıyıcısından oluşmaktadır (81).

Solüt Taşıyıcı Protein 3A2 (SLC3a2; 4F2; CD98), SLC3a2 geni tarafından kodlanmaktadır ve 4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc) olarak da bilinmektedir (82). Bu genin memeli hücrelerinde poliamin (PA) transportundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (83). SLC3a2 transprot görevini SLC7a5 (LAT1) ile kompleks oluşturarak gerçekleştirmektedir. LAT1' in yaygın tümör hücresinde fazla eksprese olduğu ve potansiyel antikanser ilaç hedefi olduğu saptanmıştır (84–86). SLC3a2 bu heterodimerik komplekste LAT1' in stabilizasyonundan ve onun membrana doğru bir şekilde lokalize olmasında sorumlu bulunmaktadır (85). Son yıllarda yapılan bir çalışmada SLC3a2' nin LAT1 ile oluşturduğu kompleks için temel olduğu gösterilmiştir (87).

Literatürde SLC3a2' nin gliomlardaki rolüne dair yeterli çalışmaya rastlanılmamaktadır. Mevcut çalışmaların birinde, SLC3a2/LAT1 ekspresyonunun gliomların proliferasyonu ve malignant fenotipleri ile çok yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (88). Ayrıca bu çalışmaya göre SLC3a2 gliom gradları ile korelasyon göstermemektedir (88). Bununla birlikte son 10 yılda SLC3a2' nin kanser hücrelerinin kemodirencini kırmada bir hedef olduğu gösterilmekle beraber tip II renal kanser için de bir biyobelirteç olduğu saptanmıştır (89).

## 5. YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışmada hasta tümör dokuları ve serumları kullanılarak yapılan analizlerle GB hastalarının moleküler patolojisi ile ilişkili olabilecek otoantikorlar varlığının keşfedilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kontrol, non-GB ve GB olmak üzere 3 deney grubu oluşturulmuştur. Hasta doku ve serumları kullanılarak Western Blot (WB) çalışmaları gerçekleştirilerek bu 3 grup arasında oluşan farklılıklar gözlemlenmiştir. Ayırt edici farklılıkların belirlenmesi ile doku numuneleri kütle spektrometrisinde analiz edilmiştir. Kütle spektrometrisi sonucu yüksek ekspresyon gösteren proteinler WB ve immünohistokimya çalışmaları ile doğrulanmıştır. Kütle spektrometrisinde anlamlılık gösteren adaylara karşı immüno-presipitasyon çalışmaları ile otoantikor gelişip gelişmediği analiz edilmiştir. İmmüno-presipitasyon sonuçları immüno-floresan çalışmaları ile desteklenmiştir. Çalışma sonucu tespit edilen otoantikorların modifikasyon statüleri incelenmiştir. Daha sonra otoantikor reaktivite pozitif ve negatif olmak üzere 2 grup oluşturulmuştur. Bu 2 grup için sağkalım analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın basamakları Şekil 5.1’ de ifade edilmektedir.



Şekil 5.1 Yöntem Akış Şeması

### 5.1. Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan sarf maddeleri marka ve katalog numaraları ile birlikte tablo 5.1.1.' de gösterilmektedir.

**Tablo 5.5.1** Kullanılan sarf malzemeleri

<b>Sarf Malzemeler</b>	<b>Firma Adı</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Akrilamid/BisAkrilamid	Ambion	AM9022
APS	Sigma	A3678
TEMED	Biofroxx	8027ML100
Trizmabase	Sigma	T1503-500G
HCl	Merck	109057
NaOH	Merck	106462
4X Laemli Yükleme Tamponu	BIO-RAD	1610747
Protein Belirteci	BIO-RAD	1610374
Glisin	Sigma	G8898
NaCl	Sigma	S9888
MetOH	Merck	100837
SDS	Sigma	L3771
RIPA	Thermo	89900
Proteaz/Fosfataz İnhibitörü	Roche	11836153001
10 µl pipet ucu	Gilson	F161631
200 µl pipet ucu	Gilson	F161931
1000 µl pipet ucu	Gilson	F161670
15 ml falkon	Nest	NST-601051
50 ml falkon	Nest	NST-602002
PVDF membran	GVS	1214429
FilterPaper	BIO-RAD	1703932
ECL	BIO-RAD	1705061
A/G Sefaroz boncuklar	GE Healthcare	17-0618-01
PBS	PanBiotech	P04-36500
Beta merkaptolanol	BIO-RAD	1610710
ComassiveBrillant Blue	Merck	115444
Aseton	Merck	100014
Yağsız Süt Tozu	AppliChem	A0830,0500
BSA	Bioshop	ALB001.100
Tween20	Sigma	P9416
Anti-SLC3a2 Rabbit	Sigma	HPA017980
Anti-Rabbit	CST	7074S
Anti-B-actin Mouse	Abbkine	A01010
Anti Mouse	GenDEPOT	W3903
a-tubulin	CST	2144S
Anti-Human HRP Konjuge	BIO-RAD	172-1050

## 5.2. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar: Tersfaz Işık Mikroskobu (Zeiss, ABD); Soğutmalı Santrifüj (ThermoScientific, ABD); Su Banyosu (Nüve, Türkiye);

Nanofotometre (Implen, Almanya); Western Blot Tankı (Invitrogen, ABD); Güç Kaynağı (Biorad, ABD); Transblot Turbo Transfer Sistemi (Biorad, ABD); Membran Görüntüleme Cihazı (BioRad, ABD); Vorteks (Stuart, İngiltere); Saf Su Cihazı (ELGA, İngiltere); Ultrasaf Su Cihazı (ELGA, İngiltere); Derin Dondurucu (-20°C, Siemens, Almanya); Derin Dondurucu (-80°C, Aucma, Çin); Isıtıcı blok (Techne, İngiltere); Çalkalayıcı (Stuart, İngiltere), Konfolal Mikroskobu (Zeiss, Almanya).

### 5.3. Tampon Çözeltiler

**Tablo 5.3.1** Ayırıştırma tamponu

<b>Stakleme Tamponu 4X (100 ml)</b>	
Trizma base	6.05 gr
SDS	0.4 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml' e tamamlanır
HCl	PH 6.8' e ayarlamak için

**Tablo 5.3.2** Depolama tamponu

<b>Ayırıştırma Tamponu 8X (100 ml)</b>	
Trizma base	36.3 gr
SDS	0.8 gr
dH <sub>2</sub> O	10 µl
HCl	PH 8.8' e ayarlamak için

**Tablo 5.3.3** Koşturma tamponu

<b>Koşturma Tamponu 10X (1000 ml)</b>	
Trizma base	30.3 gr
Glisin	144 gr
SDS	10 gr
dH <sub>2</sub> O	1 lt' ye tamamlanır

**Tablo 1.3.4** Transfer tamponu

<b>Transfer Tamponu 10X (1000 ml)</b>	
Trizma base	30.3 gr
Glisin	144 gr
dH <sub>2</sub> O	1 lt' ye tamamlanır



<b>Transfer Tamponu 1X (1000 ml)</b>	
Transfer tamponu (10X)	100 ml
Metanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	700 ml

**Tablo 5.3.5 TBST hazırlanışı**

<b>TBST 10X (1000 ml)</b>	
Trizma base	24 gr
NaCl	88 gr
Tween 20	10 ml
HCl	PH 7.6' ya ayarlamak için
dH <sub>2</sub> O	1lt' ye tamamlanır

**Tablo 5.3.6 Strip tamponu**

<b>Strip Tamponu (1000 ml)</b>	
Glisin	0.2 M
Tween 20	%0.1
HCl	PH 2.5' a ayarlamak için

**Tablo 5.3.7 1X PBS hazırlanışı**

<b>PBS 1X (1000 ml) PH:7.4</b>	
NaCl	8 gr
KCl	200 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	245 mg
HCl	PH 7.4' e ayarlamak için
dH <sub>2</sub> O	1 lt' ye tamamlanır

**Tablo 5.3.8 1X PBST hazırlanışı**

<b>PBST 1X (1000 ml)</b>	
NaCl	8 gr
KCl	200 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	245 mg
Tween 20	% 0.1
HCl	PH 7.4' e ayarlamak için
dH <sub>2</sub> O	1 lt' ye tamamlanır

**Tablo 5.3.9** Sodyum azidli PBS hazırlanışı

<b>Sodyum Azitli PBS (1000 ml)</b>	
NaCl	8 gr
KCl	200 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	245 mg
HCl	PH 7.4' e ayarlamak için
Sodyum azit	2 gr
dH <sub>2</sub> O	1 lt' ye tamamlanır

**Tablo 5.3.10** Bloklama tamponu hazırlanışı

<b>Bloklama Tamponu (100 ml)</b>	
BSA	5 gr
TBST	100 ml' e tamamlanır.

#### **5.4. Olguların toplanması**

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm hasta dokuları ve serumları (n=20 (GB), n=10 (grad III-IV gliom), n= 10 (grad I-II gliom), n=5 (epilepsi)) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Merkezi işbirliği vasıtasıyla toplanmış ve tanımlaması yapılmıştır. Hasta örnekleri ile çalışıldığı için İstanbul Medipol Üniversitesi Etik Kurulu' ndan 26.05.2016 tarihli ve 10840098-604.01.01-E.6985 sayılı etik onayı alınmıştır. Anamnez, fizik muayene ve gerektiğinde laboratuvar bulgularına dayanarak beyin tümörü dışında kronik nörolojik veya sistemik hastalığı olanlar, son 3 ay içinde immünsüpresan tedavi alanlar, 18-65 yaş aralığında olmayanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmamızda doku ve serumları kullanılan hastalara ait bilgiler tablo 5.4.1' de gösterilmektedir.

**Tablo 5.4.1** Hasta bilgileri

No	Tümör	DSÖ Grad	Yaş	Cinsiyet
1	Glioblastom	IV	64	Erkek
2	Glioblastom	IV	39	Erkek
3	Glioblastom	IV	59	Erkek
4	Glioblastom	IV	37	Erkek
5	Glioblastom	IV	54	Erkek
6	Glioblastom	IV	65	Erkek
7	Glioblastom	IV	60	Kadın
8	Glioblastom	IV	61	Erkek
9	Glioblastom	IV	65	Erkek
10	Glioblastom	IV	63	Erkek
11	Glioblastom	IV	53	Erkek
12	Glioblastom	IV	63	Kadın
13	Glioblastom	IV	55	Erkek
14	Glioblastom	IV	43	Erkek
15	Glioblastom	IV	46	Erkek
16	Glioblastom	IV	60	Kadın
17	Glioblastom	IV	48	Kadın
18	Glioblastom	IV	55	Erkek
19	Glioblastom	IV	47	Erkek
20	Glioblastom	IV	56	Erkek
21	Glioblastom	IV	61	Erkek
22	Glioblastom	IV	51	Erkek
23	Glioblastom	IV	53	Kadın
24	Oligodendrogliom	II	35	Kadın
25	Difüz Glial Tümör	II	44	Erkek
26	Oligodendrogliom	II	44	Erkek
27	Difüz Glial Tümör	II	37	Erkek
28	Oligodendrogliom	II	50	Kadın
29	Oligodendrogliom	II	60	Erkek

30	Düşük Dereceli Difüz Gliom	II	31	Erkek
31	Pilositik Astrositom	I	18	Erkek
32	Difüz Astrositom	II	41	Erkek
33	Oligodendrogliom	II	37	Erkek
34	Oligodendrogliom	III	59	Kadın
35	Anaplastik Oligodendrogliom	III	39	Erkek
36	Astrositom	III	37	Kadın
37	Anaplastik Oligodendrogliom	III	37	Kadın
38	Difüz Astrositom	III	41	Erkek
39	Difüz Glial Tümör	III	40	Kadın
40	Anaplastik Oligodendrogliom	III	51	Erkek
41	Yüksek Grad Glial Tümör	III-IV	60	Kadın
42	Glial Tümör	IV	61	Erkek
43	Yüksek Grad Glial Tümör	III	36	Erkek
44	Epilepsi (Tümör barındırmayan)	-	20	Kadın
45	Epilepsi (Tümör barındırmayan)	-	32	Erkek
46	Epilepsi (Tümör barındırmayan)	-	18	Erkek
47	Epilepsi (Tümör barındırmayan)	-	18	Kadın
48	Epilepsi (Tümör barındırmayan)	-	22	Kadın

### 5.5. Serum örneklerinden IgG İzolasyonu

Serumlardan IgG izolasyonu sırasında aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. 500 µl A/G sefaroz boncuklar 5 dk boyunca 1 ml PBS ile inkübe edilmiştir.
2. Kolondan PBS akıtılıp sadece A/G sefaroz boncukların toplanması sağlanmıştır.
3. Kolona 1 ml hasta serumu ilave edilmiştir.
4. Serum ve A/G sefaroz boncuk karışımı çalkalayıcıda düşük RPM' de 1 saat +4 C' de inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası kolondan serum akıtılmış, A/G sefaroz boncuklar 3 kez PBS ile yıkanmıştır.

6. A/G sefaroz boncuklardan Na-Nitrat Tamponu geçirilip ependorf tüplere toplanmıştır.
7. Tüplere 50 µl Tris-HCl PH:8.8 eklenerek PH'nin 7-7.5 arasına gelmesi sağlanmıştır.

Burada tüplerde IgG'lerin bulunması beklenmektedir.

## **5.6. Dokulardan Protein İzolasyonu**

Hastalardan toplanmış beyin dokularından total protein izolasyonu sırasında aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. Dokular 50-100 mg olacak şekilde hassas terazide tartılır.
2. Doku ağırlığının 3 katı hacimde RIPA/PIC tamponu dokulara eklenir.
3. İzolasyon çubukları vasıtasıyla dokular buz üzerinde ezilerek parçalanır.
4. Parçalanmış dokular buz üzerinde 30 dk inkübe edilir.
5. 10.000 g' de 10 dk santrifüj edilir.

Supernatan toplanır.

## **5.7. SDS PAGE Analizi**

Çalışmada %10 poliakrilamid jel kullanılmıştır. Serumdan izole edilen IgG'ler izolasyonun başarısını ve saflığını kontrol etmek amacı ile 10 ar µl olarak kuyulara yüklenmiştir. Yürümenin takibi protein belirteci vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Örnekler 70 V 15 dk, 140 V 1 saat boyunca yürütülmüştür. Yürüme bittikten sonra jel kasetlerden çıkartılıp dH<sub>2</sub>O ile 1 kez yıkandıktan sonra Comassive Brilliant Blue (CBB) ile 5 dk boyanmıştır. Boyanma işleminin ardından 30 dk boya çıkartıcı çözelti ile çalkalayıcıda düşük RPM' de inkübe edilmiştir. Protein bandları görünür olduktan sonra boya çıkartıcı çözelti dökülüp jel dH<sub>2</sub>O' da saklanmıştır.

## **5.8. Western Blot (WB)**

Çalışmamızda otoantikor-otoantijen etkileşimlerini göstermek üzere WB deneylerinden yararlanılmıştır. Sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

### 5.8.1. Örneklerin Yükleme Hazırlanması

Doku lizatları final konantrasyonları 2 mg/ml olacak şekilde 4x Laemli Tamponu ve dH<sub>2</sub>O ile seyreltilmiştir. İşlemin ardından 100 C' de 5 dk boyunca ısıtıcıda inkübe edilip proteinlerin linear forma dönmeleri sağlanmıştır.

### 5.8.2. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

WB analizlerinde kullanılan poliakrilamid jeller 2 kısımdan oluşmaktadır. Üst kısım proteinlerin aynı zamanda koşmaya başlaması için gerekli yoğunluğu daha düşük olan jelden oluşmaktadır. Alt kısım ise proteinlerin ağırlıklarına göre ayrıldığı alt jele göre daha yüksek yoğunluktaki jelden oluşmaktadır. Jellerin hazırlanması için gerekli materyaller tablo 5.8.2.1. ve 5.8.2.2.' de gösterilmektedir.

**Tablo 5.8.2.1** Üst jelin hazırlanışı

<b>Üst Jelin Hazırlanması (%4)- 2ml</b>	
%40 Akr-BisAkrilamid	200 µl
Stakleme Tamponu (4x)	500 µl
APS	10 µl
Temed	5 µl
dH <sub>2</sub> O	1285 µl

**Tablo 5.8.2.2** Alt jelin hazırlanışı

<b>Alt Jelin Hazırlanması (%10)-5 ml</b>	
%40 Akr-BisAkrilamid	1.25 µl
Ayrıştırma Tamponu (4x)	1.25 µl
APS	30 µl
Temed	6 µl
dH <sub>2</sub> O	2464 µl

### 5.8.3. Örneklerin Yüklmesi ve PVDF membrana Transferi

Örnekler 20-60 µg olarak kuyulara yüklenmiştir. Protein belirteci 4 µl yüklenmiştir. Yükleme ardından 70 V 15 dk örnekler koşturulduktan sonra, 120 V 1.5 saat koşturulmaya devam edilmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra jel dH<sub>2</sub>O ile yıkanıp 1X transfer tamponunda PVDF membran ve filtre kağıtları ile 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından sırasıyla 2 filtre kağıdı, PVDF membran, jel, 1 filtre kağıdı olmak üzere sandviç oluşturulup transfer tankına yerleştirilmiştir. Blotlama yarı

ıslak sistemde (semi-dry) gerçekleştirilmiştir. Transfer aşaması bittikten sonra proteinlerin geçtiği membran 1x TBST de 10 sn çalkalanıp bloklama tamponuna alınmıştır.

#### **5.8.4. Primer ve Sekonder Antikor Muamelesi**

Bloklama işlemi %5 yağsıt süt tozu veya BSA ile 1 saat oda sıcaklığında 25 rpm' de gerçekleştirilmiştir. İnsan serumları 1:200,  $\beta$ -aktin 1:5000,  $\alpha$ -tubulin 1:5000, SLC3a2 0.8:1000 dilüsyonları ile +4 de 25 rpm' de gece boyu inkübe edilmiştir. Primer antikorların kullanımından sonra 3x5 dk 1x TBST ile membranlar yıkanmıştır. Keçi-anti-insan 1:5000, keçi-anti-tavşan 1:2000, keçi-anti-fare 1:2000 dülüsyonlarına sahip sekonder antikorlarla 1 saat oda sıcaklığında 25 rpm' de membranlar inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından membranlar 3x5 dk 1x TBST ile yıkanıp görüntülemeye hazır hale getirilmiştir.

#### **5.8.5. Görüntüleme**

Görüntüleme için ECL solüsyonu kullanılmıştır. Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde solüsyonlar 1:1 karıştırılıp membran bu karışımla 5 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra BIO-RAD Chemidoc cihazında görüntü alınmıştır.

#### **5.9. Kütle Spektrometrisi**

Bu tez çalışmasında kütle spektrometrisi analizleri İstanbul Koç Üniversitesi Proteomiks Laboratuvarları bünyesinde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 75  $\mu$ g örnek kullanılmıştır.

#### **5.10. İmmünpresipitasyon**

İmmünpresipitasyon deneyler aşağıdaki basamaklar takip edilerek yerine getirilmiştir.

1. 500  $\mu$ g üzerine 20  $\mu$ l A/G sefaroze boncuklar ilave edilip 1 saat +4 C de 25 rpm' de inkübe edilmiştir.
2. Örnekler 3000 rpm' de 2 dk santrifüj edilip supernatan başka bir tüpe alınmıştır.

3. Supernatanın üzerine 1 µg anti-SLC3a2 ya da insan IgG'leri 1 saat +4 C ve 25 rpm'de muamele edilmiştir.
4. Karışımın üzerine 30 µl A/G sefaroze boncuklar ilave edilip gece boyu +4 C de 25 rpm' de inkübe edilmiştir.
5. Ertesi gün tüpler 3000 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir.
6. Pellet 2 kez 1 ml 1x PBS ile yıkanmıştır.
7. Karışım 3000 rpm' de 2 dk santrifüj edilip supernatan atılmıştır.
8. Pellet 10 µl 4x Laemli tamponu ile muamele edilip 100 C' de 10 dk kaynatılmıştır.
9. Bu aşamadan sonra örnekler poliakrilamid jele yüklenmeye hazır hale gelip WB yapılmıştır.

Anti-SLC3a2 ile çöktürülen örnekler WB deneylerinde primer antikor olarak insan serumu kullanılarak (1:200), insan IgG' si ile çöktürülen örnekler primer antikor olarak anti-SLC3a2 antikorları (0.8:1000) kullanılarak analiz edilmiştir.

### **5.11. İmmünohistokimya (İHK)**

Çalışmamızda kullanılan dokular İstanbul Üniversitesi Tıbbi Patoloji laboratuvarları tarafından parafinize edilmiştir ve doku kesitleri de yine bu birim tarafından alınmıştır. Çalışmada kontrol, non-GB ve GB olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Sağlıklı kontrol doku elde edilemeyeceğinden epilepsi hastalarından elde edilen beyin dokuları kontrol olarak kullanılmıştır. Boyamalar ise SLC3a2 proteini için yapılmıştır. İmmünohistokimya (İHK) deneylerinde sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

1. Önceden parafinize edilmiş dokulardan cam slaytlara kesitler alınır.
2. Doku kesitleri 37 °C' de geceboyu inkübe edilerek deparafinize edilir.
3. Doku numuneleri ksilende 2 kez 10 dk bekletilir.
4. Doku numuneleri sırasıyla %96, %90, %70 etanolde 2 kez 5' er dk bekletilir.
5. SLC3a2 antikor (Sigma/HPA017980) 1:3500 oranında antikor dilüsyon solüsyonunda dilüe edilir.
6. Doku numuneleri ddH<sub>2</sub>O' da 3 kez 3' er dk yıkanır.
7. Doku numuneleri tank içinde 1X sitrat solüsyonuna yerleştirilir ve tank solüsyonu mikrodalgada kaynayanaya kadar ısıtılır. Kaynama başladığı



mikrodalganın ısısı düşürülür ve numuneler 10 dk boyunca ısınmaya devam eder.

8. Doku numuneleri oda sıcaklığında 10 dk soğumaya bırakılır.
9. Doku numuneleri ddH<sub>2</sub>O' da 3 kez 3' er dk yıkanır.
10. Doku numuneleri 160 ml metanol and 40 ml %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren solüsyonda 20 dk inkübe edilir.
11. Doku numuneleri ddH<sub>2</sub>O' da 2 kez 3' er dk yıkanır.
12. 1X PBS solüsyonunda doku numuneleri 2 kez 5'er dk yıkanır.
13. Yaklaşık 50 µl antikor dilüenti numunelerin üzerine eklenir ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyondan sonra , solüsyon numunelerden uzaklaştırılır.
14. 25 µl primer antikor numunelere uygulandı. Gece boyu inkübe edildi.
15. 1X PBS solüsyonunda doku numuneleri 3 kez 5'er dk yıkanır.
16. 25 µl sekonder antikor numunelere uygulandı 30 dk inkübe edildi.
17. 1X PBS solüsyonunda doku numuneleri 3 kez 5'er dk yıkanır.
18. 50 µl streptavidin peroksit numunelere uygulanır ve sonra oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir.
19. 1X PBS solüsyonunda doku numuneleri 3 kez 5'er dk yıkanır.
20. DAB solüsyonu numunelere uygulanır ve oda sıcaklığında 10 dk beklenir.
21. Numuneler 5 dk ddH<sub>2</sub>O' da yıkanır.
22. Numuneler hemotoksilen eosine 2 kez 5 er saniye daldırılır.
23. Numuneler musluk suyuyla 10 dk yıkanır.
24. Slaytlar sırasıyla %70, %90, %96 etanolla 2 kez 2 şer dk inkübe edilir.
25. Numunelerin kuruması için, slaytlar oda sıcaklığında bekletilir.
26. Numuneler 2 kez 10' ar dk ksilene koyulur.
27. Slaytlar oda sıcaklığında kuruyana kadar bekletilir.
28. Mikroskop altında numuneler görüntülenir.

## **5.12. İmmü floresan Boyama (İF)**

Hasta serumlarında SLC3a2' ye karşı gelişen otoantikorların varlığını göstermek üzere Ln229 GB hücre hatlarında SLC3a2 boyamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kontrol, kontrol serum, grad I-II serum, grad III-IV serum ve GB serum olmak üzere

5 grup oluşturulmuştur. Çalışmamızda kontrol serum grubu için 5 kontrol serumu, grad I-II serum grubu için 4 grad I-II serumu, grad III-IV serum grubu için 5 grad III-IV serumu, GB serum grubu için ise 5 GB serumu birleştirilip Ln229 GB hücre hatları ile 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra İF deney prosedürleri izlenmiştir.

### **Boyama Protokolü**

1. Medyum çekilip atılır, 1X PBS ile hücreler 2 kez yıkanır.
2. %4 PFA eklenir oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir.
3. PFA solüsyonu çekip atılır, 1X PBS ile hücreler 2 kez yıkanır.
4. Her petriye 500 µl bloklama solüsyonu (Thermo / 37520) eklenir ve 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.
5. 1x PBS ile 2 kez yıkanır.
6. Her petriye 200 µl SLC3a2 1:500 dölüsyon (Sigma / HPA017980) primer antikor solüsyonu eklenir ve sallayıcıda gece boyu inkübe edilir.
7. Primer atılır ve petriyer 1X PBS ile 2 kez yıkanır.
8. 200 µl 1:500 dilüsyon sekonder antikor solüsyonu 1.5 saat oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde inkübe edilir.
9. Sekonder antikor atılır ve petriyer 1X PBST ile 4 kez 4' er dk sallayıcı üzerinde yıkanır.
10. Petri başına 500 µl DAPI eklenir ve sallayıcıda 3 dk bekletilir.
11. DAPI atılır ve 1X PBST ile sallayıcı üzerinde 5 dk yıkanır.
12. 1 kez 1X PBS ile yıkanır.
13. PBS/Sodyum Azid ile 4 °C' de petriyer saklanır. Eğer görüntü alınacaksa konfokal mikroskobunda görüntü alınır.

### **5.13. Biyoistatistik Analizler**

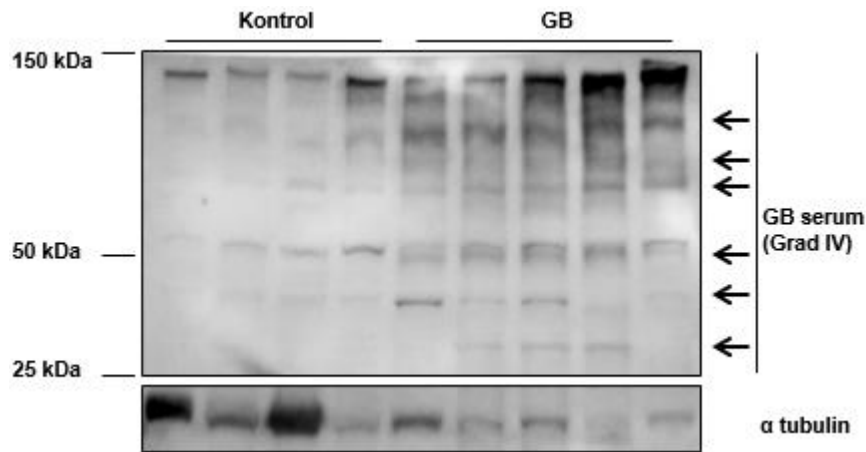
Çalışmamızdaki tüm analizler Graphpad programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. WB ve immünopresipasyon analizleri için ANOVA yöntemi kullanılmıştır.  $P < 0.0001$  ve  $P < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. Sağkalım analizleri için Kaplan Meier yaşam analizi yöntemi kullanılmıştır.

## 6. BULGULAR

Çalışmamızda, GB ayırıcı tanı imkanı sağlayabilecek biyobelirteçlerin keşfi için GB hasta serumlarında GB dokusunda yüksek ekspresyon gösteren proteinlere karşı otoantikör taramaları gerçekleştirildi.

### 6.1. Gliom Hastalarının Doku ve Serumlarında Otoantikör-Otoantijen Etkileşimlerinin Glioblastom Özgünlük Göstermesi

Çalışmamızda 20 GB, 10 grad III-IV gliom, 10 grad I-II gliom ve 5 tümör barındırmayan epilepsi dokusundan protein izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışma gereği olarak sağlıklı kontrol beyin dokusu temin edilemeyeceği için tümör tanısı olmayan epilepsi hastalarından elde edilen dokular ve serum örnekleri kontrol olguları olarak kullanıldı. WB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde primer antikör yerine olgu serumları kullanıldı. WB öncesi örnek hazırlanmasında deney dizaynı gereği olarak  $\beta$ -merkaptoetanol kullanılmadı. Çünkü serumda mevcut olabilecek otoantikörler eğer kompleks yapılara özgü ise  $\beta$ -merkaptoetanol tarafından yıkılması engellenerek bu otoantikörlerin belirlenebilmesi amaçlandı. Yapılan analizler sonucu GB olgularıyla GB serumlarının ayırt edici etkileşim modeli gösterdiği gözlemlendi (Şekil 6.1.1).



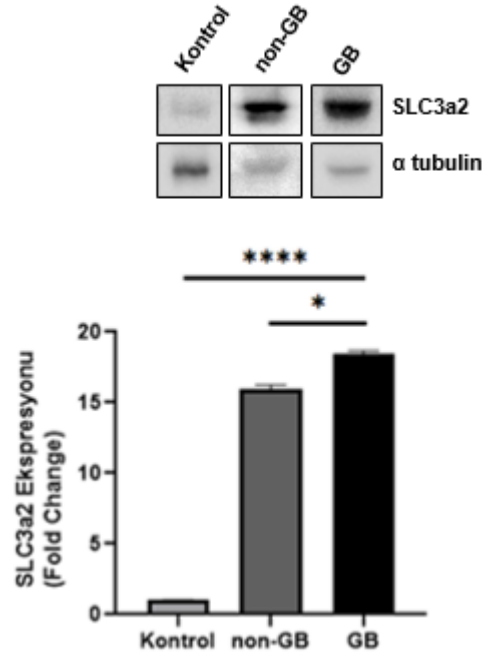
**Şekil 6.1.1** Glioblastom serum-GB dokusu etkileşimlerinde kontrol dokularına kıyas ile özgünlük gözlemlenmesi. Glioblastom ve epilepsi dokularından protein izolasyonu gerçekleştirildi. Glioblastom hasta serumları primer antikör olarak kullanıldı. Yükleme kontrolü olarak ise  $\alpha$  tubulin kullanıldı. GB dokuları ile ayırt edici etkileşim gösteren bandlar siyah oklar ile gösterilmiştir.

## **6.2. Kütle Spektrometri Analizleri Sonucu Glioblastomlarda SLC3a2 Ekspresyon Artışının Tespiti**

Çalışmamızda 5 kontrol, 5 non-GB gliom ve 5 GB hasta dokularından elde edilen lizatlarla kütle spektrometrisi analizi yapıldı. Analizler sonucunda 3014 protein tanımlandı. Proteomiks analizler “Thermo Orbitrap Exactive-Bottom up” stratejisi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk analizlerde Max Quant ve Perseus programı kullanıldı ( $p < 0.05$ , fold change  $\geq 2$ ). Biyoinformatik analizler için DAVID (GO ve yolak analizi) ve String (protein-protein etkileşimi) programları kullanıldı. Biyoinformatik analizlerde kontrol ve non-GB gliomlar GB hastalarının verileri ile kıyaslandı. Kütle spektrometrisi çalışmaları ile elde edilen sonuçların biyoinformatik analizi ile 10 proteinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Analizler sonucu belirlenmiş 10 aday proteinin hiçbirinin birbiriyle etkileşmediği String analizleri ile belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanan bu 10 proteinden western blot analizlerimizle tespit ettiğimiz aralıkta (30-70 kDa) moleküler ağırlığa sahip olan en yüksek skorlu proteinler belirlenerek bu çalışma kapsamında öncelikli çalışıldı.

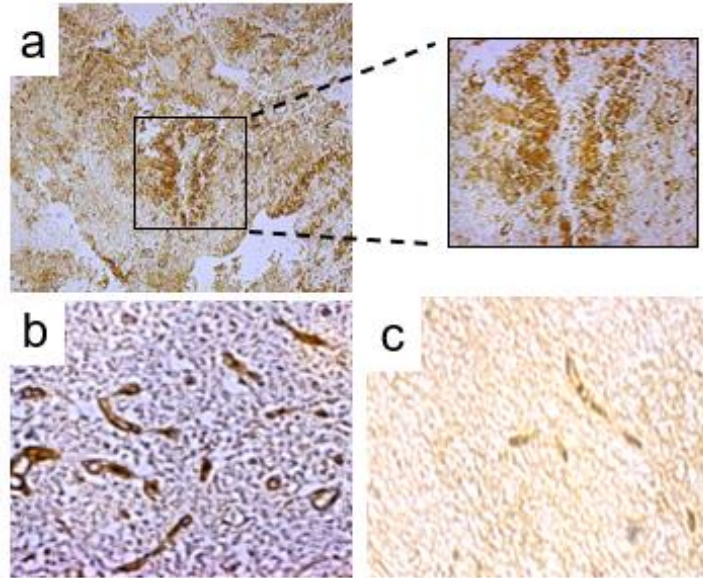
## **6.3. Glioblastom Hasta Dokularında SLC3a2 Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot ve İmmünohistokimya ile Doğrulanması**

Kütle spektrometrisi analizleri sonucu SLC3a2 ekspresyonunda kontrol dokularına kıyas ile 39 kat artış gözlemlendi. Dolayısıyla bu artışın hasta serumları ile yapılan western blot (WB) analizlerindeki band yoğunlukları ile ilişkili olup olmadığı araştırıldı. SLC3a2 ekspresyonunun başka metodlarla da kütle spektrometri sonuçları ile uyumlu olup olmayacağını test etmek için kontrol, non-GB ve GB deney grupları ile WB ve immünohistokimya (İHK) çalışmaları gerçekleştirildi. WB analizleri sonucu SLC3a2 ekspresyonunun kontrole kıyas ile GB dokularında 18.6 kat artış gösterdiği gözlemlendi (Şekil 6.3.1).



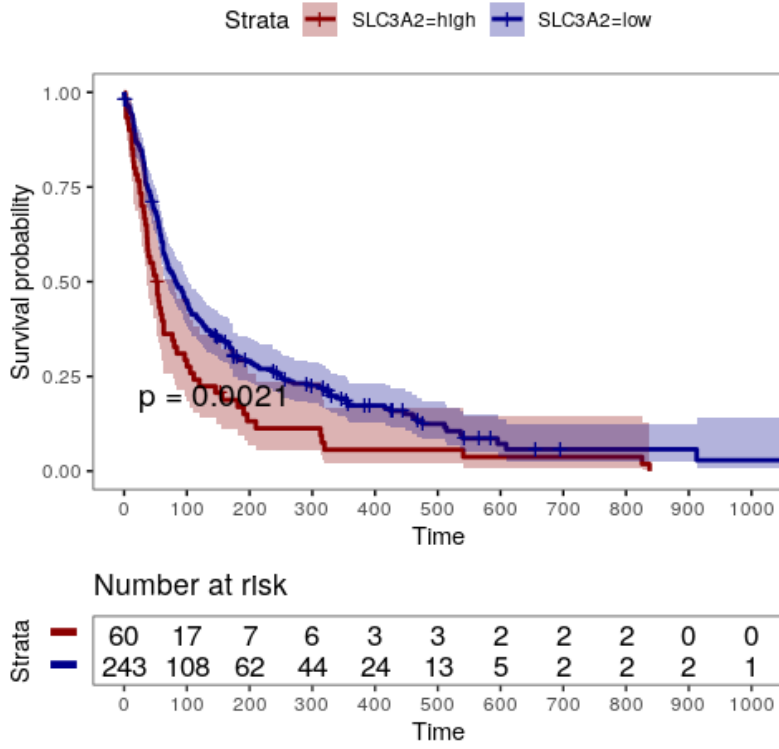
**Şekil 6.3.1** SLC3a2 GB'lerde yüksek seviyede ekspresyon göstermektedir. Kütle spektrometrisi sonuçları WB ile değerlendirildi ve sonuçlar analiz edildi (n=9 (GB), n=6 (non-GB), n=3 (kontrol);  $p^* < 0.05$ , ve  $p^{****} < 0.001$ ).

Kütle spektrometrisi ve WB analizlerinin yanı sıra İHK çalışmalarında da GB dokularında kontrol dokulara kıyas ile belirgin oranda yüksek SLC3a2 boyaması saptandı.



**Şekil 6.3.2** Glioblastom dokuları SLC3a2' yi epilepsi kontrol dokuları ve GB olmayan gliomlara göre yüksek seviyede ekspresyon etmektedir. a. GB, b. Grad IV gliom, c. epilepsi kontrolü ifade etmektedir.

3 farklı metotla SLC3a2 ekspresyonunun kontrol dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıkması SLC3a2'ye karşı hastalarda gelişen otoantikorların varlığını desteklemekte olduğu saptandı. Bununla birlikte R2: Genomic Analysis and Visualization Platform veritabanı kullanılarak gliom hastalarının ekspresyon verileri elde edildi. GSE16011 aksesiyon numaralı hasta kohortundan (n=284) R programlama dili kullanılarak SLC3a2 ekspresyonlarına göre hastaların sağkalım süreleri belirlendi. Böylelikle, SLC3a2'yi düşük oranda eksprese eden gliomların yüksek eksprese edenlere göre sağkalım sürelerinin yaklaşık 1 sene fazla olduğu saptandı (Şekil 6.3.3).



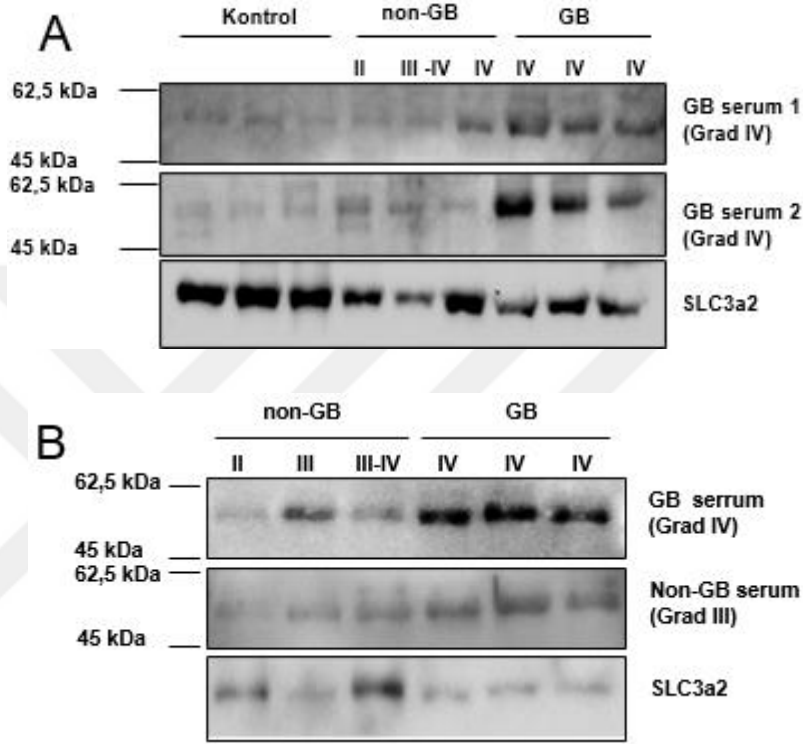
Şekil 6.3.3 SLC3a2'yi yüksek ve düşük eksprese eden hastaların Kaplan Meier Analizi

Bu sebep ile, SLC3a2 ticari antikorunun da kullanıldığı immünpresipitasyon deneyleri ile anti-SLC3a2 otoantikorlarının varlığı araştırıldı.

#### 6.4. İmmünpresipitasyon ile anti-SLC3a2 Otoantikorlarının Tespiti

Glioblastom dokularında fazla ekspresyon gösteren SLC3a2'ye karşı GB serumlarında otoantikorların varlığını tespit etmek için immünpresipitasyon çalışmaları

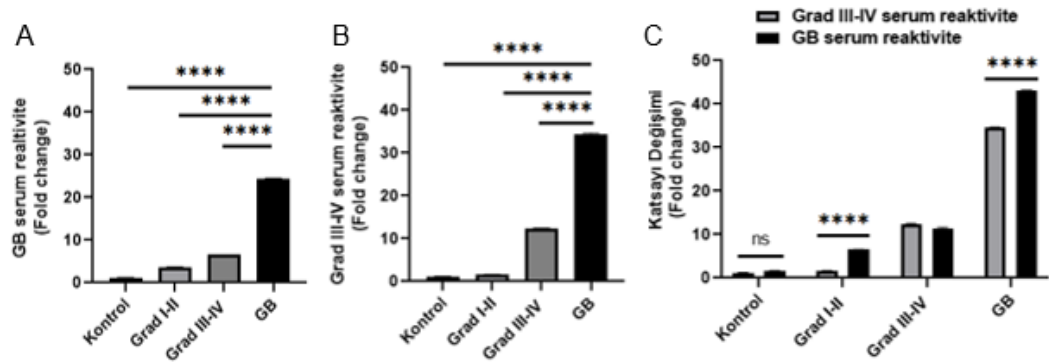
yapıldı. Bu amaçla, 40 µg kontrol, non-GB ve GB doku lizatları ticari SLC3a2 antikoruna ile (Sigma / HPA017980) çöktürüp WB analizlerinde primer antikor olarak GB serumları kullanılarak analiz edildi (Şekil 6.4A). Çeşitli GB serumları ile yapılan analizler sonucu GB serumlarının GB doku lizatları ile güçlü bir biçimde, non-GB ve kontrol doku lizatları ile ise zayıf olarak etkileştiği gözlemlendi (Şekil 6.4A).



**Şekil 6.4.1** Glioblastom serumları, GB doku lizatları ile güçlü bir biçimde, non-GB ve kontrol doku lizatları ile ise zayıf olarak etkileşmektedir. A-B) Farklı evrelerde gliom olgu serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikorunun ve SLC3a2 ticari antikorunun dokular ile etkileşimi

Glioblastom serumlarında bulunan otoantikorların diğer gliom hasta serumlarında mevcut olup olmadığını anlamak için immünpresiptasyon çalışmaları non-GB hasta serumları kullanılarak da gerçekleştirildi (Şekil 6.4B). Yapılan çalışmalar sonucu yüksek grad non-GB serumlarının (grad III ve IV) GB doku lizatları ile GB serumlarına kıyas ile zayıf etkileşim gösterdiği gözlemlendi (Şekil 6.4B). Düşük grad serumları ise (grad I ve II) doku lizatları ile tespit edilebilir bir etkileşim göstermedi (Şekil 6.4B). Hasta serumları ve SLC3a2 etkileşim yoğunlukları analiz edildi. Analizlerde GB serum reaktivite ve grad III-IV serum reaktivite olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Analizler sonucunda GB serumlarının GB doku SLC3a2'leri ile

kontrol doku SLC3a2'lerine kıyas ile yaklaşık 25 kat fazla reaktivite gösterdiği saptandı (Şekil 6.4.2A). Bununla birlikte, grad III-IV non-GB serumlarının ise GB doku SLC3a2'leri ile kontrol doku SLC3a2'lerine kıyasla yaklaşık 34.5 kat fazla reaktivite gösterdiği saptandı (Şekil 6.4.2B). Fakat, bu 2 çalışma grubu istatistiksel olarak birlikte değerlendirilip grad III-IV serumlarının kontrol doku SLC3a2'leri ile reaktivitelerine göre normalize edildiğinde GB serumlarının GB doku SLC3a2'leri ile 43 kat fazla reaktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 6.4.2C). Grad III-IV non-GB serumları ise GB doku SLC3a2'leri ile yine 34.5 kat fazla reaktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 6.4.2C).



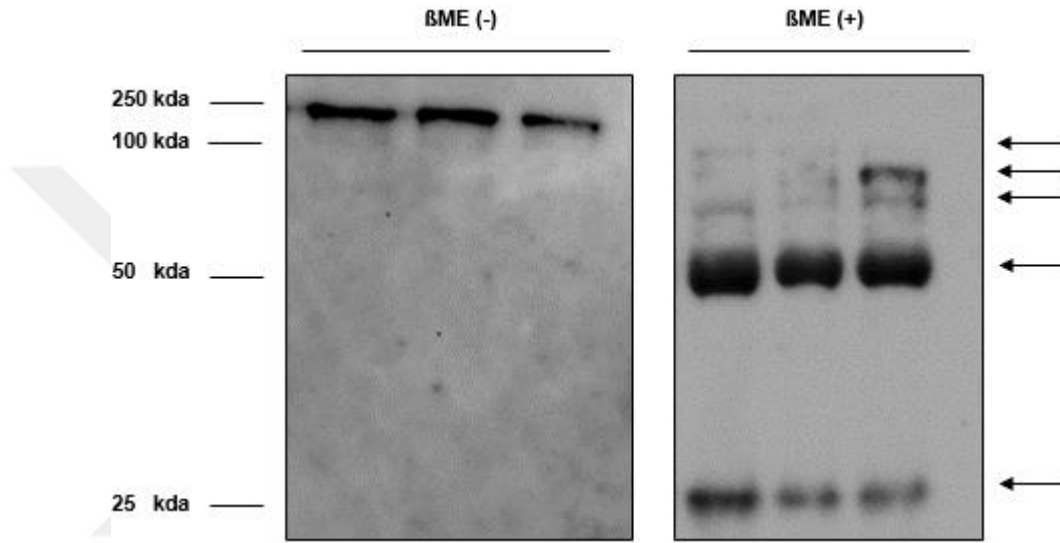
**Şekil 6.4.2** Glioblastom (grad IV) ve non-GB (grad III-IV) gliom serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikörlerinin doku etkileşimi analizleri. A) Glioblastom serumları GB dokuları ile güçlü etkileşim gösterirken grad III-IV, grad I-II ve kontrol gruplara daha az reaktivite göstermektedir. B) Grad III-IV serumları GB dokuları ile kontrol, grad I-II ve grad III-IV dokularına nazaran daha güçlü reaktivite göstermektedir. C) Glioblastom ve Grad III-IV serumlarının kontrol, grad I-II, grad III-IV ve GB dokularıyla gösterdiği reaktivite kıyaslandığında GB serumlarının GB dokuları ile daha güçlü reaktivite gösterdiği görülmektedir (p=\* < 0.05; \*\*\*\* < 0.001).

Sonuç olarak, GB serumlarının GB dokularındaki SLC3a2'ler ile grad III-IV serumlarına göre %24.6 daha yüksek reaktivite gösterdiği belirlendi. Grad III-IV serumları grad III-IV dokularındaki SLC3a2'ler ile GB serumlarına kıyas ile yaklaşık %8 fazla reaktivite gösterdiği saptanırken, GB serumlarının grad I-II dokularındaki SLC3a2'ler ile grad III-IV serumlarına kıyasla yaklaşık 4 kat yüksek reaktivite gösterdiği belirlendi.

İmmünpresipitasyon çalışmalarında ticari antikorla SLC3a2 çöktürülüp WB analizlerinde çöken proteinler lineerize edilmektedir. Bu nedenle, GB serumlarında GB doku SLC3a2'leri ile yüksek oranda reaktivite gösteren anti-SLC3a2



otoantikörleri aslında lineer formdaki SLC3a2'leri tanımaktadır. Bu çalışmamızda, GB serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikörlerinin SLC3a2' nin 3 boyutlu yapısını tanıyıp tanımadığını anlamak için deneylerde  $\beta$ ME (-) ve  $\beta$ ME (+) gruplar gruplar oluşturularak GB serumları ile SLC3a2' lerin immünopresipitasyon ile çöktürülüp WB yöntemi ile analizi yapıldı. Bu yeni çalışmada 3 GB doku lizatı kullanıldı. WB analizleri öncesi çöktürülen örnekler  $\beta$ -merkaptoetanol ile ve  $\beta$ -merkaptoetanolsüz lineerize edildi (Şekil 6.4.3).

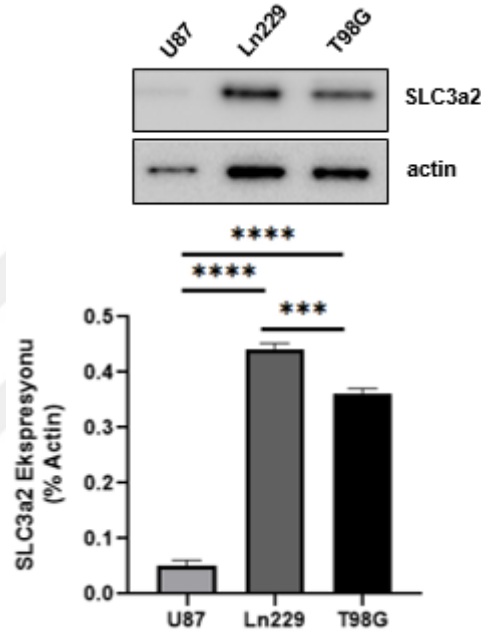


**Şekil 6.4.3** GB serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikörler 3 boyutlu SLC3a2 yapısını tanımaktadır.  $\beta$ ME kullanılmadığı deney grubunda serum IgG' leri ve SLC3a2 yapışık durumda kaldığı için 250 kda' a yakın band görülmektedir.  $\beta$ ME kullanıldığında ise çeşitli SLC3a2 izoformları belirgin hale gelmektedir.

Yapılan çalışma sonucu SLC3a2' nin GB serumu ile çöktüğü ve GB serumundaki anti-SLC3a2 otoantikörlerinin SLC3a2' nin lineerize formunun yanı sıra 3 boyutlu yapısını da tanıdığı saptanmıştır.  $\beta$ ME (-) ve  $\beta$ ME (+) gruplar kıyaslandığında GB serumundaki otoantikörlerin SLC3a2' nin hücre içi oluşturabileceği kompleks yapılara özgü olmayıp yalnızca SLC3a2' ye özgü olduğunu işaret etmektedir. Bununla birlikte,  $\beta$ ME (+) gruplarda birkaç bandın gözlemlenmesi GB serumundaki anti-SLC3a2 otoantikörlerinin birkaç SLC3a2 izoformunu tanıyabileceğini göstermektedir.

## 6.5. Otoantikörlerin SLC3a2'ye Özgü Bağlanma Profilinin İmmünfloresan Boyama ile Hücre Hatlarında Gösterilmesi

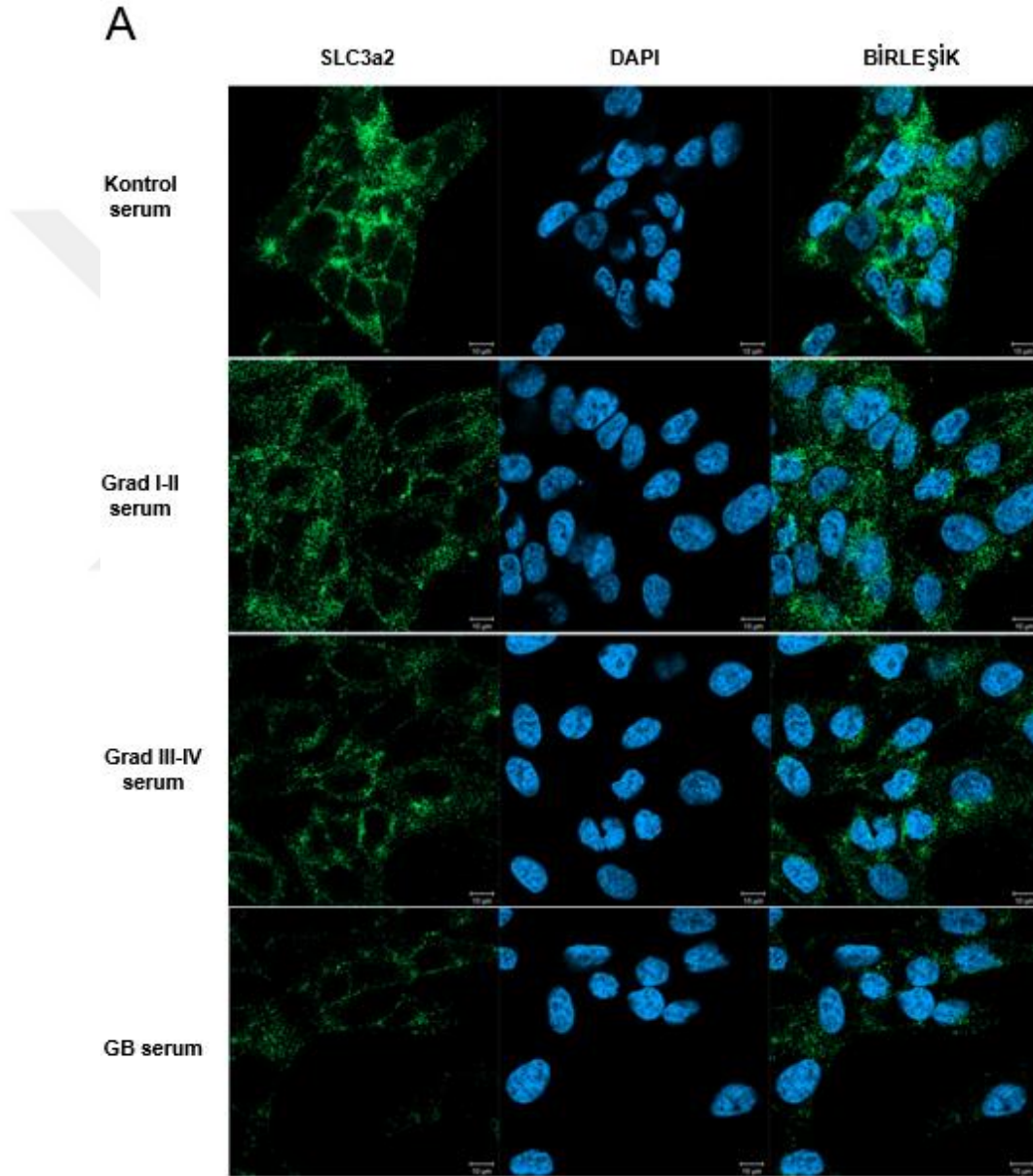
Glioblastom dokularında SLC3a2' nin yüksek seviyede eksprese olduğunun tespit edilmesi ile, GB hücre hatlarında da SLC3a2 ekspresyonu WB yöntemi ile analiz edildi. Çalışmada LN229, T98G ve U87 glioblastom hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarında SLC3a2' ye yönelik gerçekleştirilen WB analizi Şekil 6.5.1' de görülmektedir.

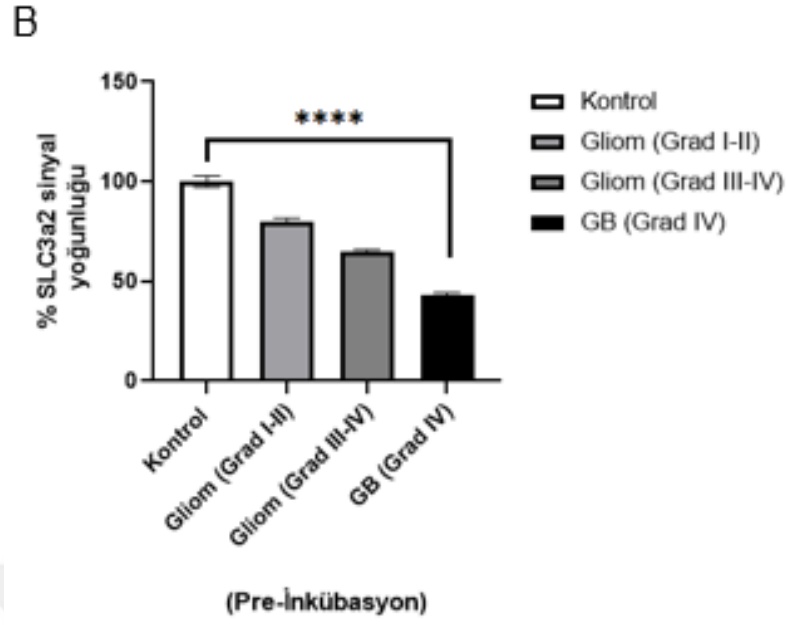


Şekil 6.5.1 Glioblastom hücre hatlarında SLC3a2 ekspresyonunun belirlenmesi

Glioblastom hücre hatlarında SLC3a2 ekspresyonunun belirlenmesinden sonra anti-SLC3a2 otoantikörlerinin SLC3a2' ye özgü bağlanma profilinin gözlemlenmesi amacı ile 5 deney grubu oluşturuldu. Bu deney gruplarında 5 kontrol, 5 grad I-II gliom, 5 grad III-IV gliom ve 5 GB olgusunun serumları ayrı ayrı birleştirildi. LN229 hücre hatları 35' lik cam petrilere ekildikten sonra bu serumlar ile 24 saat inkübe edildi. Ek olarak serum inkübasyonu yapılmayan negatif kontrol grubu oluşturuldu. 24 saatlik serum inkübasyonun ardından hücreler %4 PFA ile fikse edilip SLC3a2 için floresan boyama gerçekleştirildi. Boyamalar konfokal mikroskop altında görüntülendi. SLC3a2 boyamaları sonucu GB serumları ile inkübe edilen gruplarda SLC3a2

boyaması anlamlı derecede azalırken, negatif kontrol ve kontrol serum grubunda preinkübasyon yapılmayan gruplar ile aynı oranda ışımaya saptandı. Dolayısıyla serum inkübasyonunun SLC3a2 floresan ışımada glioblastomlarda anlamlı azalışa sebep olduğu saptandı. Preinkübasyon yapılan gruplardan, grad III-IV non-GB grubunun sonuçları incelendiğinde, glioblastomlara nazaran anlamlı düzeyde fazla; grad I-II gliomlara kıyas ile ise daha az floresan ışımaya gözlemlendi (Şekil 6.5.2).





**Şekil 6.5.2** Otoantikorların SLC3a2' ye özgü bağlanma profilinin immünfloresan yöntemi ile belirlenmesi.

## 6.6. Glioblastomlarda SLC3a2 Modifikasyonlarının ve İzomerlerinin İncelenmesi

İmmünpresipitasyon çalışmaları ile GB serumlarının ayırt edici bir şekilde GB doku lizatlarıyla etkileştiğini gösterdi. Bununla birlikte, GB serumları zayıf da olsa non-GB ve kontrol doku lizatları ile de etkileşti (Şekil 6.4). İmmünpresipitasyon çalışmalarında yükleme kontrolü kullanıldığından bu etkileşim modelindeki farklılığın SLC3a2 miktarından ziyade SLC3a2 izoformlarına, modifikasyonlarına veya mutasyonlarına özgü olabileceği araştırıldı. SLC3a2 GB' lerde çok fazla çalışılmadığı için literatürde GB' ye özgü mutasyon, modifikasyon ya da izomer bulgularına rastlanılmadı. Bu sebep ile, genel olarak görülen SLC3a2 izomerleri ve modifikasyonları UniProt veritabanı kullanılarak araştırıldı. UniProt veritabanında 10 farklı potansiyel SLC3a2 izoformu saptandı (Şekil 6.6.1).

Computationally mapped potential isoform sequences<sup>1</sup>

There are 10 potential isoforms mapped to this entry. [BLAST](#) [Align](#) [Show all](#) [Add to basket](#)

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Length
<input type="checkbox"/> J3KPF3	J3KPF3_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2 hCG_2016598	631
<input type="checkbox"/> F5GZS6	F5GZS6_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	599
<input type="checkbox"/> F5H0E2	F5H0E2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	145
<input type="checkbox"/> F5H867	F5H867_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	135
<input type="checkbox"/> H0YFS2	H0YFS2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	247
<input type="checkbox"/> F5GZI0	F5GZI0_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	175
<input type="checkbox"/> H0YFX4	H0YFX4_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	122
<input type="checkbox"/> F5GZR9	F5GZR9_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	47
<input type="checkbox"/> F5H056	F5H056_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	67
<input type="checkbox"/> H0YH36	H0YH36_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chai...	SLC3A2	24

Şekil 6.6.1 Uniprot veritabanı kullanılarak SLC3a2 izoformlarının belirlenmesi

Bu izoformlardan yalnız 3 tanesinin çalışmamızda saptadığımız moleküler ağırlıklara sahip olduğu belirlendi (H0YFS2, 25 kda; F5GZS6; 64 kda, J3KPF3, 68 kda). Bu 3 adaydan veritabanı giriş ismi F5GZS6 ve J3KPF3 olan 2 izoform immünpresipitasyon çalışmalarında yoğun reaktivite gördüğümüz 50-75 aralığına daha uygun olduğu gözlemlendi.

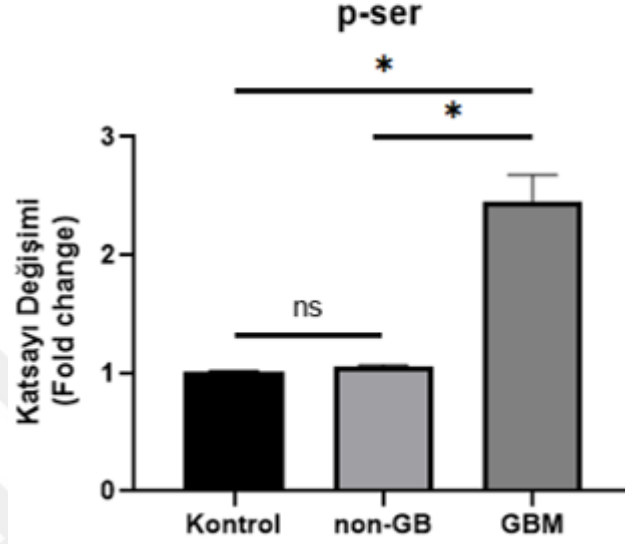
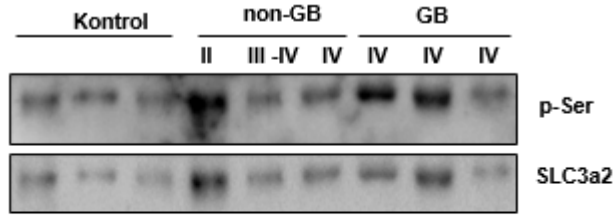
İlerleyen incelemelerde UniProt veritabanında SLC3a2' nin çeşitli amino asit modifikasyon statülerinin tanımlandığı belirlendi (Şekil 6.6.2). Bu modifikasyon statüleri incelendiğinde SLC3a2' nin çeşitli amino asit pozisyonlarında özellikle serin reziduları üzerinden SLC3a2 fosforilasyonu belirlendi (Şekil 6.6.2).

Amino acid modifications		
Feature key	Position(s)	Description
Modified residue <sup>i</sup>	1	N-acetylmethionine <a href="#">Combined sources</a> <a href="#">1 Publication</a>
Modified residue <sup>i</sup>	103	Phosphoserine <a href="#">Combined sources</a>
Modified residue <sup>i</sup>	106	Phosphothreonine <a href="#">By similarity</a>
Modified residue <sup>i</sup>	134	Phosphoserine <a href="#">Combined sources</a>
Cross-link <sup>i</sup>	147	Glycyl lysine isopeptide (Lys-Gly) (interchain with G-Cter in ubiquitin)
Modified residue <sup>i</sup>	165	Phosphoserine <a href="#">Combined sources</a>
Cross-link <sup>i</sup>	166	Glycyl lysine isopeptide (Lys-Gly) (interchain with G-Cter in SUMO2) <a href="#">Combined sources</a>
Disulfide bond <sup>i</sup>	210	Interchain (with C-164 in SLC7A5) <a href="#">1 Publication</a> <a href="#">1 Publication</a>
Glycosylation <sup>i</sup>	365	N-linked (GlcNAc...) asparagine <a href="#">Combined sources</a> <a href="#">4 Publications</a>
Glycosylation <sup>i</sup>	381	N-linked (GlcNAc...) asparagine <a href="#">Combined sources</a> <a href="#">5 Publications</a>
Modified residue <sup>i</sup>	406	Phosphoserine <a href="#">1 Publication</a>
Modified residue <sup>i</sup>	408	Phosphoserine <a href="#">1 Publication</a>
Modified residue <sup>i</sup>	410	Phosphoserine <a href="#">1 Publication</a>
Glycosylation <sup>i</sup>	424	N-linked (GlcNAc...) (complex) asparagine <a href="#">Combined sources</a> <a href="#">5 Publications</a>
Glycosylation <sup>i</sup>	506	N-linked (GlcNAc...) asparagine <a href="#">Combined sources</a> <a href="#">3 Publications</a>
Modified residue <sup>i</sup>	527	Phosphoserine <a href="#">1 Publication</a>
Modified residue <sup>i</sup>	531	Phosphoserine <a href="#">1 Publication</a>
<b>Isoform 2 (identifier: P08195-2)</b>		
Modified residue <sup>i</sup>	2	N-acetyls erine <a href="#">Combined sources</a>
Modified residue <sup>i</sup>	2	Phosphoserine <a href="#">Combined sources</a>

Şekil 6.6.2 Uniprot veritabanında SLC3a2 modifikasyonlarının araştırılması

## 6.7. Glioblastomlarda SLC3a2' nin Fosforilasyon Durumunun Belirlenmesi

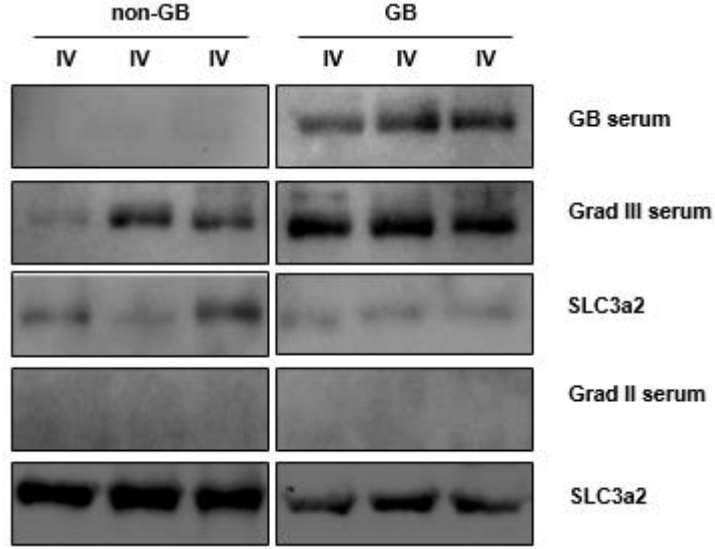
Çalışmamızda yüksek fosforilasyon statüsüne sahip SLC3a2' ye karşı GB serumlarında gelişen anti-SLC3a2 otoantikorlarının SLC3a2 fosforilasyon seviyesi ile ilişkili olup olmadığını anlamak için kontrol, non-GB gliom ve GB doku lizatlarından ticari SLC3a2 antikorunu kullanılarak immüno-presiptasyon deneyi yapıldı. Daha sonra WB analizlerinde primer antikor olarak p-ser antikor kullanıldı. Yükleme kontrolü olarak ticari SLC3a2 kullanıldı. Sonuç olarak, GB dokularında eksprese olan SLC3a2' nin, non-GB ve kontrol dokularına kıyas ile yaklaşık 2.5 kat fazla fosforile olduğu saptandı (Şekil 6.7.1). non-GB ve kontrol dokularındaki SLC3a2' nin aynı fosforilasyon seviyesine sahip olduğu ve aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (Şekil 6.7.1).



**Şekil 6.7.1** Glioblastomda SLC3a2'nin fosforilasyon durumunun kıyaslamalı analizi. Kontrol, non-GB gliom ve GB SLC3a2'leri ticari SLC3a2 antikorunu ile çöktürüldükten sonra fosforilasyon seviyeleri incelenmiştir. GB (n=9) SLC3a2'lerinin kontrol ve non-GB gliomlara kıyas ile yaklaşık 2.5 kat fazla fosforile olduğu saptanmıştır. SLC3a2 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

## 6.8. SLC3a2 Otoantikorlarının Gliom Grad Seviyesi İle İlişkilendirilmesi

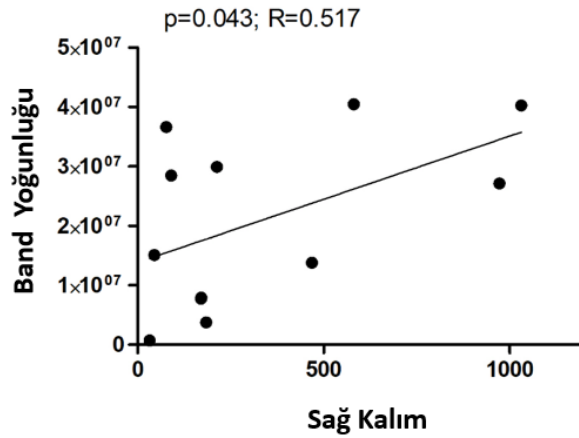
Gliom hasta serumlarında anti-SLC3a2 otoantikorlarının varlığının saptanmasına ilişkin deneylerde grad I-II (düşük grad) gliom serumlarının anti-SLC3a2 otoantikorlarını tespit edilebilir düzeyde barındırmadığı gözlemlendi. Otoantikor varlığı non-GB gruplarından ileri evreli gliomlarda ve glioblastomlarda tespit edildi. Ancak glioblastomlarda sadece glioblastom dokuları ile etkileşimin görüldüğü, otoantikor özgünlüğü açısından bir GB alt grubu tespit edildi. Bununla birlikte grad III-IV serumlarının ve bazı GB serumlarının grad III doku lizatlarından itibaren güçlü reaktivite gösterdiği saptandı. Buna ilişkin bulguların elde edildiği immünpresipitasyon verileri Şekil 6.8.1' de gösterilmiştir.



Şekil 6.8.1 anti-SLC3a2 otoantikorları yalnızca ileri evreli gliomlarda tespit edilmektedir.

## 6.9 Glioblastom Serumları-SLC3a2 Otoantikor Reaktivitesi ile Sağ Kalım Korelasyonu

Çalışmamızda, serum ve doku örnekleri alınan GB hastalarının sağ kalım süreleri hesaplandı. 60 aylık period içerisinde GB hastaları otoantikor reaktivitelerine göre değerlendirildiğinde otoantikor reaktivitesi ile sağkalım arasında pozitif korelasyon saptandı (Şekil 6.9.1).



Şekil 6.9.1 Glioblastom serumlarındaki otoantikorların SLC3a2 ile reaktivitesi GB sağ kalımları ile pozitif korelasyon göstermektedir.



## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma kapsamında yüksek grad gliom (grad III-IV ve GB) hasta serumlarında anti-SLC3a2 otoantikörleri tespit edilmiştir. Glioblastom hasta serumlarında bulunan anti-SLC3a2 otoantikörlerinin ayırıcı nitelikte profil sergilediği belirlenmiştir. Anti-SLC3a2 otoantikörlerinin lineer ve 3 boyutlu yapıdaki SLC3a2' yi tanıyabildiği saptanmıştır. Bununla birlikte, GB SLC3a2' lerinin diğer gliom ve tümör barındırmayan epilepsi kontrol olgularına göre serin rezidularından 2.5 kat fazla fosforile olduğu gösterilmiştir. Glioblastom hasta serumlarında bulunan anti-SLC3a2 otoantikörlerinin hastaların sağ kalımı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Glioblastom (GB) tanı ve tedavisine imkan sağlayabilecek otoantikörleri tespit etmek üzere gliom hastalarından GB ve non-GB (Grad I-IV arası GB olmayan gliomlar) olarak iki grup oluşturulmuş, tümör tanısı konulmayan epilepsi hastalarının dokuları da kontrol olgusu olarak kullanılmıştır. Western blot yöntemi ile 37-70 kDa aralığında GB dokusuna özgü otoantijenler saptanması GB' lerde gelişen bir mutasyon, modifikasyon ya da fazla ekspresyon sonucu olabilir. Bu bağlamda, 37-70 kDa aralığında tespit edilen GB dokusuna özgü otoantijenleri tanımlamak üzere proteomiks çalışmaları sürdürülmüştür. Böylelikle GB' lerde 37-70 kDa aralığında olup anlamlı bir biçimde yüksek ekspresyon gösteren proteinler saptanmıştır. Belirlenen 10 aday proteinden western blot ile tespit edilen moleküler ağırlığa en yakın ve ilişkili olabilecek yüksek skorlu SLC3a2 proteini aday otoantijen olma yönüyle araştırılmıştır. Çünkü, yüksek SLC3a2 ekspresyonu hasta bağışıklık sistemi açısından yeni antijen olarak algılanmış olabilir. Kütle spektrometrisi sonuçları WB ve İHK çalışmaları ile doğrulanmıştır. Bu 2 yöntemle de SLC3a2' nin GB dokularından kontrol ve non-GB gliom dokularına göre yüksek ekspresyon profiline sahip olduğu saptanmıştır.

Hasta serumlarında ortaya çıkan otoantikörlerin SLC3a2' ye özgü olup olmadığı immünpresiptasyon (İP) yöntemi ile 20 GB, 10 non-GB gliom ve 10 kontrol olgusu serum örneklerinde analiz edilmiştir. Bu çalışmalarda SLC3a2 ekspresyon düzeylerinin otoantikör etkileşim profili üzerine etkisi dışlanmak istenmiştir. Bu amaçla ticari SLC3a2 antikoru ile SLC3a2' ler çöktürülüp, WB analizlerinde primer antikör yerine hasta serumları kullanılmıştır. Yükleme kontrolü olarak ise ticari

SLC3a2 antikoru kullanılarak her örnek için eşit yükleme yapılması sağlanmıştır. Böylelikle GB serumlarında GB SLC3a2'lerine özgü gelişen otoantikörlerin varlığı belirlenmiş ve GB anti-SLC3a2 otoantikörlerinin SLC3a2 ekspresyon düzeylerinden bağımsız olarak ayırıcı bir profil sergilediği saptanmıştır. SLC3a2 otoantikörlerinin yalnızca yüksek grad gliomlarda (grad III-IV ve GB) belirlenmesi otoantikör gelişiminin hastalığın progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, düşük gradlardan yüksek gradlara geçişle beraber tümör daha agresif bir hal almaktadır. Bu sebeple metabolik faaliyetleri de artmaktadır. Ayrıca, solüt taşıyıcılar onkometabolizma ile ilişkili görevler üstlenmektedir. SLC3a2 bir solüt taşıyıcı protein olduğu için bu geçişle beraber ekspresyon düzeyi artmış olabilir. Bununla birlikte, GB serumunda bulunan anti-SLC3a2 otoantikörünün GB dokusundaki SLC3a2'ye non-GB gliomlara göre daha yüksek affinite ile bağlandığı saptanmıştır. Böylelikle bu otoantikörlerin SLC3a2'nin lineer formunu tanıdığı belirlenmiştir. Bu sebeple, GB serum otoantikörlerinin 3 boyutlu SLC3a2'yi tanıyıp tanımadığını anlamak için GB dokularından GB serumları ile otoantijenlerin çöktürülmüştür. Daha sonra WB analizlerinde ticari SLC3a2 antikoru kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda, GB serumunda bulunan SLC3a2 otoantikörlerinin SLC3a2'nin 3 boyutlu yapısını da tanıyabildiği saptanmıştır.

İmmünpresipitasyon deneylerinde otoantikörlerin SLC3a2'nin 3 boyutlu yapısını tanıyabildiği gösterilebilmektedir fakat bu tanıma profilinin SLC3a2 ekspresyonu ile orantılı olup olmadığı belirlenememektedir. Dolayısıyla, İP deneyleri ile lineer SLC3a2'ye karşı yüksek reaktivite gösteren GB otoantikörlerinin 3 boyutlu SLC3a2'ye karşı da aynı profili sergileyip sergileyemeyeceği araştırılmıştır. Bu bağlamda, anti-SLC3a2 otoantikörlerinin 3 boyutlu SLC3a2'yi tanıma profilinin belirlenmesi amacı ile GB hücre hatlarında immünfloresan deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla önce Ln229, T98G, U87 hücre hatlarında SLC3a2 ekspresyon profili WB analizleri ile değerlendirilmiştir. Floresan boyama çalışmalarında SLC3a2 eksprese ettiği gösterilen Ln229 hücre hatları kullanılarak 5 deney grubu (negatif kontrol, kontrol serum, Grad I-II serum, Grad III-IV serum, ve GB serum) oluşturulmuştur. Bu deney grupları tasarlanırken, farklı olgu serumları ile preinkübasyon yapıldığında otoantikörün bağlandığı olgularda SLC3a2 boyamasında ışımının ne yönde değişeceği tespit edilmiş ve grad seviyesi arttıkça ışımalarda azalma görülmüştür. Kontrol

serumu, Grad I-II serumu ve negatif kontrol grubu aynı oranda ışığa vermiştir. En az floresan ışığa GB serumları ile inkübe edilen deney grubunda gözlemlenmiştir. Böylelikle, anti-SLC3a2 otoantikörlerinin SLC3a2' nin lineer formunun dışında 3 boyutlu yapısını da tanıyabildiği ve GB serumlarındaki anti-SLC3a2 otoantikörlerinin diğer serumlardaki anti-SLC3a2 otoantikörlere kıyas ile belirgin bir biçimde güçlü olarak SLC3a2' ye bağlandığı saptanmıştır. Otoantikörlerin lineer SLC3a2' yi tanıyabilmesi proteinin yapısındaki beta levha veya alfa heliks sekonder yapıları vasıtasıyla ortaya çıkmış olabilir. Ayrıca, antijen sunan hücrelerin MHC proteinlerine bağlı yüksek düzeydeki SLC3a2 peptidleri, lineer formdaki SLC3a2' lere karşı B hücreleri tarafından otoantikör gelişimine sebep olmuş olabilir. Bu durumda, anti-SLC3a2 otoantikörleri NK ve T hücreleri ile MHC bağlı lineer formdaki SLC3a2' ye bağlanma açısından rekabete giriyor olabilir. Bu doğrultuda, kanser hücrelerinin gelişim sürecinde NK ve T hücrelerinden kaçabilmesi otoantikör rekabeti ile sağlanabilir. Bununla birlikte otoantikörlerin 3 boyutlu yapıdaki SLC3a2' yi de tanıyabilmesi ve SLC3a2' nin bir hücre yüzey proteini olması anti-SLC3a2 otoantikörlerinin antikör bağımlı hücre sitotoksitesine (antibody dependent cellular cytotoxicity = ADCC) katkı sağlıyor olabilir. Dolayısıyla klinik yönden ele alındığında, SLC3a2 otoantikörlerinin 3 boyutlu SLC3a2' ye karşı da GB' lerde özgünlük göstermesi bu otoantikörlerin GB tedavisinde hedefli terapi ve hücresel terapi yaklaşımlarında kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Glioblastom otoantikörlerinin GB SLC3a2' lerine özgün bir biçimde bağlanması, otoantikörün tanıdığı SLC3a2' nin GB dokusunda ayırıcı bir nitelikte ortaya çıkan modifikasyon, izoform veya mutasyon durumu ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenle, SLC3a2' nin post-translasyonel modifikasyon durumu ve izoformları UniProt veritabanı vasıtası ile incelenmiştir. UniProt incelemeleri sonucu SLC3a2' ye ait tanımlanmış 10 izoformdan 3 tanesinin çalışmamızda saptanan GB' lere özgü band profiliyle uyumluluk gösterdiği belirlenmiştir. Post-translasyonel modifikasyonlar açısından incelendiğinde ise SLC3a2' nin en çok özellikle serin reziduları üzerinden olmakla birlikte threonin reziduları üzerinden fosforile olduğu belirlenmiştir. İmmünpresipitasyon çalışmaları sonucu SLC3a2' nin GB' lerde kontrol ve non-GB dokularına kıyas ile 2.5 kat fazla fosforile olduğu saptanmıştır. Glioblastom SLC3a2' lerinin fosforilasyon durumundaki bu artışın GB serumlarında gelişen otoantikör

profili ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. İlerleyen çalışmalarda SLC3a2'nin modifikasyon durumunun ve bunun otoantikor ile ilişkisi olup olmadığının detaylı araştırılması, GB'ler için ayırıcı bir biyobelirteç belirlenmesine öncülük edebilir.

Çalışmanın ilerleyen bölümünde SLC3a2' lere karşı gelişen otoantikorların hastaların sağ kalımları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda, IP band yoğunlukları temel alınarak yapılan analizlerde GB reaktivitesi ile sağ kalım arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu nedenle, GB serumlarında gelişen SLC3a2 otoantikorlarının hastalığın ilerlemesini engellemek için geliştirildiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile GB hasta serumlarında GB dokusuna özgü anti-SLC3a2 otoantikorunun varlığı gösterilmiş, bu otoantikorun doku ile spesifik etkileşimi açısından tanıya yönelik güçlü bir biyobelirteç olduğu belirlenmiş ve temel araştırmalara dayanan bu projenin çıktılarının klinik değeri ortaya konulmuştur. Devam çalışmaları ile SLC3a2'yi tanıyan otoantikorların GB'ye özgü profilinin moleküler altyapısının araştırılması, GB'ye yönelik biyobelirteç tanımlanmasına öncülük edebilecek niteliktedir.

## 8. KAYNAKLAR

1. Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: Advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med.* 2015;3(7):1–13.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics , 2009 BOTH SEXES FEMALE BOTH SEXES ESTIMATED DEATHS. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):1–25.
3. Ichimura K, Narita Y, Hawkins CE. Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):789–808.
4. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:97–117.
5. Dellaretti M, Touzet G, Reyns N, Dubois F, Gusmão S, Pereira JLB, et al. Correlation between magnetic resonance imaging findings and histological diagnosis of intrinsic brainstem lesions in adults. *Neuro Oncol.* 2012;14(3):381–5.
6. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):161–71.
7. Norden AD, Wen PY. Glioma therapy in adults. *Neurologist.* 2006;12(6):279–92.
8. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1745–59.
9. Kobold S, Lütken T, Cao Y, Bokemeyer C, Atanackovic D. Autoantibodies against tumor-related antigens: Incidence and biologic significance. *Hum Immunol.* 2010;71(7):643–51.
10. Vincent A, Bien CG, Irani SR, Waters P. Autoantibodies associated with

diseases of the CNS: New developments and future challenges. *Lancet Neurol* [Internet]. 2011;10(8):759–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70096-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70096-5)

11. Tüzün E, Dalmau J. Limbic encephalitis and variants: Classification, diagnosis and treatment. *Neurologist*. 2007;13(5):261–71.
12. Adachi-Hayama M, Adachi A, Shinozaki N, Matsutani T, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Circulating anti-filamin C autoantibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1–10.
13. Melchior K, Tholey A, Heisel S, Keller A, Lenhof HP, Meese E, et al. Proteomic study of human glioblastoma multiforme tissue employing complementary two-dimensional liquid chromatography- and mass spectrometry-based approaches. *J Proteome Res*. 2009;8(10):4604–14.
14. Syed P, Gupta S, Choudhary S, Pandala NG, Atak A, Richharia A, et al. Autoantibody profiling of glioma serum samples to identify biomarkers using human proteome arrays. *Sci Rep*. 2015;5(September):1–13.
15. Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, et al. Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):67–76.
16. Llaguno SRA, Parada LF. Cell of origin of glioma: Biological and clinical implications. *Br J Cancer* [Internet]. 2016;115(12):1445–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.354>
17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
18. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941–53.
19. Rajesh Y, Pal I, Banik P, Chakraborty S, Borkar SA, Dey G, et al. Insights into

- molecular therapy of glioma: Current challenges and next generation blueprint. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(5):591–613.
20. Fred H Hochberg. *Physiol Behav.* 2017;176(12):139–48.
  21. Chittenden TW, Chittenden TW, Howe E a., Howe E a., Culhane a. C, Culhane a. C, et al. Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics* [Internet]. 2008;455(7216):1061–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754308000591>
  22. Van Den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJB, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: A report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1597–604.
  23. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499–508.
  24. Yang LJ, Liu YL, Wang S Bin, Jin ZG. [Clinical observation on common peroneal nerve palsy treated with comprehensive therapy]. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2014;34(4):334–6.
  25. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* [Internet]. 2015;47(5):458–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3273>
  26. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2019;15(7):405–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0220-2>
  27. Villa C, Miquel C, Mosses D, Bernier M, Di Stefano AL. The 2016 World

Health Organization classification of tumours of the central nervous system. Press Medicale [Internet]. 2018;47(11-12P2):e187–200. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.04.015>

28. Batchelor TT, Gilbert MR, Supko JG, Carson K a, Nabors LB, Grossman S a, et al. Interactions of the allogeneic effector leukemic T cell line, TALL-104, with human malignant brain tumors. *Neuro Oncol*. 2004;6(1):21–7.
29. Peter de Blank, Maryam Fouladi J, Huse T. Molecular markers and targeted therapy in pediatric low-grade glioma. *J Neurooncol*. 2020;
30. Merchant TE, Kun LE, Wu S, Xiong X, Sanford RA, Boop FA. Phase II trial of conformal radiation therapy for pediatric low-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2009;27(22):3598–604.
31. Pierce SM, Loeffler JS, McGinn C, Tarbell NJ, Barnes PD. Definitive radiation therapy in the management of symptomatic patients with optic glioma. Survival and long-term effects. *Cancer*. 1990;65(1):45–52.
32. Claus EB, Walsh KM, Wiencke J, Annette M, Wiemels JL, Schildkraut JM, et al. information. 2016;38(1):1–19.
33. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. 2005STUPP rt + tmz. *N Engl J Med* [Internet]. 2005;352:987–96. Available from: [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
34. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol*. 2009;11(3):281–91.
35. Zhang C, Burger MC, Jennewein L, Genßler S, Schönfeld K, Zeiner P, et al. ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(5):1–12.
36. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*.



2016;131(6):803–20.

37. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: Results of three consecutive radiation therapy oncology group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;26(2):239–44.
38. Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Fine HA, Black PM, et al. Sociodemographic indicators and risk of brain tumours. *Int J Epidemiol.* 2003;32(2):225–33.
39. Ali Kahn A, O'Brien DF, Kelly P, Phillips JP, Rawluk D, Bolger C, et al. The anatomical distribution of cerebral gliomas in mobile phone users. *Ir Med J [Internet].* 2003;96(8):240–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14653376>
40. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
41. Mourad PD, Farrell L, Stamps LD, Chicoine MR, Silbergeld DL. Why are systemic glioblastoma metastases rare? Systemic and cerebral growth of mouse glioblastoma. *Surg Neurol.* 2005;63(6):511–9.
42. Laks DR, Visnyei K, Kornblum HI. Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma. *Yonsei Med J.* 2010;51(5):633–40.
43. Bonavia R, Inda MDM, Cavenee WK, Furnari FB. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: A social network. *Cancer Res.* 2011;71(12):4055–60.
44. Rajaratnam V, Islam MM, Yang M, Slaby R, Ramirez HM, Mirza SP. Glioblastoma: Pathogenesis and current status of chemotherapy and other novel treatments. *Cancers (Basel).* 2020;12(4).
45. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(7):2965–9.

46. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2000;60(5):1383–7.
47. Reinshagen C, Bhare D, Choi SH, Hutten S, Nesterenko I, Wakimoto H, et al. CRISPR-enhanced engineering of therapy-sensitive cancer cells for self-targeting of primary and metastatic tumors. *Sci Transl Med.* 2018;10(449).
48. Zhao D, Najbauer J, Garcia E, Metz MZ, Gutova M, Glackin CA, et al. Neural stem cell tropism to glioma: Critical role of tumor hypoxia. *Mol Cancer Res.* 2008;6(12):1819–29.
49. Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2018;15(7):422–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>
50. Müller Bark J, Kulasinghe A, Chua B, Day BW, Punyadeera C. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2020;122(3):295–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0603-6>
51. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017;14(9):531–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
52. Wang J, Bettegowda C. Applications of DNA-Based Liquid Biopsy for Central Nervous System Neoplasms. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2017;19(1):24–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.08.007>
53. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224).
54. Salkeni MA, Zarzour A, Ansay TY, McPherson CM, Warnick RE, Rixe O, et al. Detection of EGFRvIII mutant DNA in the peripheral blood of brain tumor patients. *J Neurooncol.* 2013;115(1):27–35.

55. Santangelo A, Imbrucè P, Gardenghi B, Belli L, Agushi R, Tamanini A, et al. A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker. *J Neurooncol* [Internet]. 2018;136(1):51–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-017-2639-x>
56. Rynkeviciene R, Simiene J, Strainiene E, Stankevicius V, Usinskiene J, Kaubriene EM, et al. Non-coding RNAs in glioma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):1–35.
57. Wang Q, Li P, Li A, Jiang W, Wang H, Wang J, et al. Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2012;31(1):1. Available from: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*
58. Kahlert C. Exosomes in Tumor Microenvironment Influence Cancer Progression and Metastasis. *J Mol Med*. 2014;91(4):431–7.
59. Hallal S, Ebrahimkhani S, Shivalingam B, Graeber MB, Kaufman KL, Buckland ME. The emerging clinical potential of circulating extracellular vesicles for non-invasive glioma diagnosis and disease monitoring. *Brain Tumor Pathol* [Internet]. 2019;36(2):29–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10014-019-00335-0>
60. MA Gillentine, LN Berry, RP Goin-Kochel, MA Ali, J Ge, D Guffey, JA Rosenfeld, V Hannig, P Bader, M Proud, M Shinawi, BH Graham1, A Lin, SR Lalani, J Reynolds, M Chen, T Grebe, CG Minard, P Stankiewicz, AL Beaudet and C, Schaaf. 氢气和蛛网膜下腔出血HHS Public Access. *J Autism Dev Disord*. 2017;47(3):549–62.
61. Osti D, Bene M Del, Rappa G, Santos M, Matafora V, Richichi C, et al. Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*. 2019;25(1):266–76.
62. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(3):160–

71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3795>
63. Macdonald IK, Parsy-Kowalska CB, Chapman CJ. Autoantibodies: Opportunities for Early Cancer Detection. *Trends in Cancer* [Internet]. 2017;3(3):198–213. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2017.02.003>
64. Fernández Madrid F, Maroun MC, Olivero OA, Long M, Stark A, Grossman LI, et al. Autoantibodies in breast cancer sera are not epiphenomena and may participate in carcinogenesis. *BMC Cancer*. 2015;15(1):1–15.
65. Doseeva V, Colpitts T, Gao G, Woodcock J, Knezevic V. Performance of a multiplexed dual analyte immunoassay for the early detection of non-small cell lung cancer. *J Transl Med*. 2015;13(1):1–15.
66. Werner S, Chen H, Tao S, Brenner H. Systematic review: Serum autoantibodies in the early detection of gastric cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(10):2243–52.
67. Mintz PJ, Rietz AC, Cardó-Vila M, Ozawa MG, Dondossola E, Do KA, et al. Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(8):2515–20.
68. Chen H, Werner S, Tao S, Zörnig I, Brenner H. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2014;346(2):178–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.007>
69. Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA. Profiling Tumor-Associated Antibodies for Early Detection of Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2006;1(6):513–9.
70. Iizuka A, Komiyama M, Oshita C, Kume A, Ashizawa T, Mitsuya K, et al. Anti-vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 2 autoantibody identification in glioblastoma patient using single B cell-based antibody gene cloning. *Immunol Lett* [Internet]. 2014;159(1–2):15–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.02.004>

71. Mock A, Warta R, Geisenberger C, Bischoff R, Schulte A, Lamszus K, et al. Printed peptide arrays identify prognostic TNC serumantibodies in glioblastoma patients. *Oncotarget*. 2015;6(15):13579–90.
72. Panda S, Banerjee N, Chatterjee S. Solute carrier proteins and c-Myc: a strong connection in cancer progression. *Drug Discov Today* [Internet]. 2020;00(00):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.02.007>
73. El-Gebali S, Bentz S, Hediger MA, Anderle P. Solute carriers (SLCs) in cancer. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2013;34(2–3):719–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.007>
74. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2015;14(8):543–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4626>
75. Schlessinger A, Matsson P, Shima JE, Pieper U, Yee SW, Kelly L, et al. Comparison of human solute carriers. *Protein Sci*. 2010;19(3):412–28.
76. Hediger MA, Cléménçon B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2013;34(2–3):95–107. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009>
77. Höglund PJ, Nordström KJV, Schiöth HB, Fredriksson R. The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Mol Biol Evol*. 2011;28(4):1531–41.
78. Cormerais Y, Massard PA, Vucetic M, Giuliano S, Tambutté E, Durivault J, et al. The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *J Biol Chem*. 2018;293(8):2877–87.
79. Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type

amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* 2012;103(2):382–9.

80. Dixon SJ, Patel D, Welsch M, Skouta R, Lee E, Hayano M, et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife.* 2014;2014(3):1–25.
81. Fotiadis D, Jeckelmann JM. The structure of the human 4F2hc-LAT1 heteromeric amino acid transporter. *Sci China Life Sci.* 2019;62(6):848–50.
82. Palacín M, Kanai Y. The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2004;447(5):490–4.
83. Walker JM. Polyamines: Methods and Protocols. *Life Sci.* 2011;720(5):523.
84. Scalise M, Galluccio M, Console L, Pochini L, Indiveri C. The human SLC7A5 (LAT1): The intriguing histidine/large neutral amino acid transporter and its relevance to human health. *Front Chem.* 2018;6(JUN):1–12.
85. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2001;1514(2):291–302.
86. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, et al. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2002;1565(1):112–22.
87. Yan R, Zhao X, Lei J, Zhou Q. Structure of the human LAT1–4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature* [Internet]. 2019;568(7750):127–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1011-z>
88. Zhen H, Kawai N, Okada M, Okubo S, Tamiya T, Zhang X, et al. Relation of 4F2hc expression to pathological grade proliferation and angiogenesis in human brain gliomas. *Chinese J Clin Oncol.* 2012;39(16):1161–4.

89. Prager GW, Poettler M, Schmidinger M, Mazal PR, Susani M, Zielinski CC, et al. CD98hc (SLC3A2), a novel marker in renal cell cancer. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(4):304–10.



## 9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.6985  
Konu : Etik Kurulu Hk.

26/05/2016

**Sayın Yrd. Doç. Dr. Nihal KARAKAŞ**

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 21/04/2016 tarihli 204 karar no ile onay verilen "Glioblastoma multiforme beyin tümörünün erken tanı ve tedavisine imkan sağlayabilecek anti-glial otoantikörlerin araştırılması" isimli çalışma başlığının "Glioblastoma multiforme beyin tümörünün erken tanı ve tedavisine imkan sağlayabilecek anti-GBM otoantikörlerin araştırılması" olarak değiştirilmesi talebiniz uygun bulunmuş olup, kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 26.05.2016 tarihinde e-İmzalanmıştır.  
Evrakımız <http://eys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden F3B1FA10X8 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**  
Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)

### İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ PLANI	12.04.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
HİLGİLİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	12.04.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	Karar No: 204	Tarih: 20/04/2016				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

### İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Doç. Dr. Haneî ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kararı	Çesneyer		Araştırma ile İlgili		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Haneî ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Balanıza