T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA OLGULARINDA PD-L1, PD-L2 ve JAK2 GENLERİNİN EKSPRESYON PATERNLERİNİN VE GENOMİK KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MERVE ÖZLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

Eskişehir, 2022

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA OLGULARINDA PD-L1, PD-L2 ve JAK2 GENLERİNİN EKSPRESYON PATERNLERİNİN VE GENOMİK KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MERVE ÖZLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

Eskişehir, 2022

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kuralar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifar yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dıında özgün olduğunu, Prof. Dr. Sevilhan ARTAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Merve ÖZLÜ

ÖZET

Başlık: Glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon paternlerinin ve genomik kopya sayısı değişikliklerinin değerlendirilmesi

Amaç: Glioblastoma en yaygın primer beyin tümörü olarak bilinmekte olup, yetişkinlerde insidansı ve nüks oranı yüksek olan bir kanser tipi olarak bilinmektedir. Tüm malign santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinin %45'ini, tüm primer malign santral sistemi tümörlerinin %80'ini ve tüm malign gliomaların yaklaşık %54,4'ünü oluşturmaktadır. Fakat glioblastoma için henüz etkili bir tedavi stratejisi olmadığı bilinmektedir. Programlanmış Ölüm Ligandı 1 (PD-L1,CD274)'in, glioblastoma, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, melanoma, hematolojik maligniteler dahil olmak üzere birçok malign tümörde yaygın olarak bulunduğu ve yüksek ekspresyon gösterdiği belirtilmektedir. Programlanmış Ölüm Ligandı 2 (PD-L2,CD273)'nin ise gliolastoma, düşük dereceli gliomalar (LGG), akciğer, renal hücreli karsinomlarda da eksprese olduğu bilinmektedir. Janus Kinaz 2 (JAK2) geninin, birçok hücresel süreçte görev yaptığı bilinmektedir. Çalışmamızda diğer kanser tiplerinde oldukça önemli fonksiyonları olan PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin glioblastomada genomik kopya sayısı değişiklikleri ile ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin ortaya konmasını amaçladık.

Yöntem: 27 parafine gömülü glioblastoma doku örneği ile kontrol grubunu oluşturan 20 parafine gömülü düşük gradeli glial tümör (Grade 1, 2, 3) doku örneğinde PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genomik kopya sayısı değişiklikleri FISH yöntemi, ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile tespit edilip, iki yöntem arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonucunda, 47 olgunun 44'ü PD-L1, PD-L2 gen bölgeleri açısından en az bir aberasyon gösterirken, 25 olgu amplifikasyon açısından pozitif olarak saptanmıştır. JAK2 gen bölgesi 17 olguda yeniden düzenlenme pozitif olarak tespit edilmiştir. Glioma dereceleri ve PD-L2 gen ekspresyon seviyesi arasında anlamlı bir fark saptanmıştır. Ek olarak, grade 2 ve 3 olgularında PD-L2 gen amplifikasyonu ve ekspresyon düzeyi arasında ilişki saptanmıştır.

Sonuç: Glioblastomadan bağımsız olarak PD-L2 gen amplifikasyon ve ekspresyon seviyelerine grade 2 ve 3 glial tümörlerde bakılması teşhis ve tedavi açısından etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, PD-L1, PD-L2, JAK2, RT-PCR, FISH

ABSTRACT

Title: Evaluation of expression patterns and genomic copy number changes of PD-L1, PD-L2 and JAK2 genes in glioblastoma cases

Aim: Glioblastoma is known as the most common primary brain tumor and is known as a cancer type with a high incidence and recurrence rate in adults. It constitutes 45% of all malignant central nervous system (CNS) tumors, 80% of all primary malignant central system tumors and approximately 54.4% of all malignant gliomas. However, it is known that there is no effective treatment strategy for glioblastoma yet. It has been reported that Programmed Death Ligand 1 (PD-L1,CD274) is widely found and highly expressed in many malignant tumors, including glioblastoma, non-small cell lung cancer, melanoma, and hematological malignancies. Programmed Death Ligand 2 (PD-L2,CD273) is known to be expressed in gliolastoma, low-grade gliomas (LGG), lung, and renal cells. The Janus Kinase 2 (JAK2) gene is known to be involved in many cellular processes. In our study, we aimed to investigate the relationship between genomic copy number changes and expression levels of PD-L1, PD-L2 and JAK2 genes, which have very important functions in other cancer types, and to reveal their relationship with clinical data of the cases.

Method: PD-L1, PD-L2 and JAK2 genomic copy number changes in 27 paraffin-embedded glioblastoma tissue samples and 20 paraffin-embedded low-grade glial tumor (Grade 1, 2, 3) tissue samples in the control group FISH method, expression levels of related genes with RT -PCR was determined and the relationship between the two methods was evaluated.

Results: As a result of the study, 44 of 47 cases showed at least one aberration in terms of PD-L1, PD-L2 gene regions, while 25 cases were positive for amplification. Rearrangement was positive in 17 cases for the JAK2 gene region. A significant difference was found between glioma grades and PD-L2 gene expression level. In addition, a correlation was found between PD-L2 gene amplification and expression level in grade 2 and 3 cases.

Conclusion: As glioblastoma predicts predictability and predictability in PD-L2 gene amplification and expression levels in 2 and 3 class 2 and 3 insights.

Keys: **Glioblastoma, PD-L1, PD-L2, JAK2, RT-PCR, FISH**

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI……

ETİK BEYAN.....

ÖZET..... i

ABSTRACT..... iii

TABLOLAR DİZİNİ..... viii

ŞEKİLLER DİZİNİ..... ix

GRAFİKLER..... xii

1. GİRİŞ VE AMAÇ..... 1

2. GENEL BİLGİLER..... 4

2.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri ve Güncel Sınıflama..... 4

2.2. Glioblastoma Multiforme..... 9

2.2.1. Epidemiyoloji..... 9

2.2.2. Etiyoloji..... 9

2.2.3. Histopatoloji ve klinikopatoloji..... 10

2.2.4. Genetik profil..... 11

2.2.5. Prognoz..... 12

2.2.6. Tedavi..... 13

2.3. PD1/PD-L1 İmmün Kontrol Noktası..... 14

2.3.1. Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD1)..... 18

2.3.2. Programlanmış ölüm ligandı 1-2 (PD-L1, PD-L2)..... 19

2.4. Janus Kinaz 2 (JAK2)..... 21

3. **GEREÇ VE YÖNTEM..... 25**

3.1. Hasta Grubu..... 25

3.2. Gereçler..... 26

3.2.1. Kullanılan aletler..... 26

3.2.2. Kullanılan malzemeler..... 27

3.2.3. Kullanılan problar..... 28

3.3. Yöntem..... 28

3.3.1. FISH analizi..... 28

3.3.1.1. Preperatların ön yıkanması..... 28

3.3.1.2. Denatürasyon ve hibridizasyon..... 29

3.3.1.3. Hibridizasyon sonrası yıkamalar..... 29

3.3.1.4. Hibridize olan bölgelerin görünür kılınması..... 30

3.3.1.5. Preperatların mikroskopta incelenmesi 31
3.3.1.6. FISH sinyal analizi 31
3.3.2. Gen ekspresyon analizleri 32
3.3.2.1. RNA izolasyonu 32
3.3.2.1.1. Parafine gömülü dokudan RNA izolasyonu 32
3.3.2.1.1.1. Deparafinizasyon ve lizis aşaması 32
3.3.2.1.1.2. Bağlanma aşaması 33
3.3.2.1.1.3. Yıkama aşaması 33
3.3.2.1.1.4. Elüsyon aşaması 33
3.3.2.2. Real Time PCR ile gen ekspresyon analizi 34
3.3.2.2.1. cDNA sentezi 34
3.3.2.2.2. RT-PCR protokolü 35
4. BULGULAR 38
4.1. Hasta Grubuna Ait Bilgiler 38
4.2. Kontrol Grubuna Ait Bilgiler 41
4.3 FISH Analizine Ait Bulgular 44
4.3.1. PD-L1 ve PD-L2 genlerinin kopya sayısı değişiklikleri 44
4.3.2. JAK2 gen bölgesi kopya sayısı değişiklikleri 49
4.3.3. PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genleri arasındaki kopya sayısı değişikliklerinin ilişkisi 55
4.4. Gen Ekspresyon Analizine Ait Bulgular 56
4.4.1. İstatistiksel analiz sonucunda elde edilen bulgular 60
4.4.1.1. PD-L1 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular 60
4.4.1.2. PD-L2 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular 60
4.4.1.3. JAK2 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular 61
4.4.1.4. PD-L1 genomik kopya sayısı değişiklikleri ve PD-L1 ekspresyonunun durumu 62
4.4.1.5. PD-L2 genomik kopya sayısı değişiklikleri ve PD-L2 ekspresyonunun durumu 65
4.4.1.6. JAK2 genomik kopya sayısı değişiklikleri ve JAK2 ekspresyonunun durumu 68
4.4.1.7. Glioblastoma olgularında IDH mutasyon durumu ve ekspresyon ilişkisi 71
5. TARTIŞMA 75
5.1. Çalışmamızda Elde Edilen Bulguların Literatür Verileri ile Karşılaştırılması 75

5.1.1. Genomik kopya sayısı değişiklikleri 75
5.1.2. PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen ekspresyonları 77
5.1.3. IDH mutasyon durumu ve ekspresyon ilişkisi 78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 81
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 83
8. EKLER DİZİNİ 90
EK-1. Karar Formu
EK-2. Turnıtın Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ 90
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI 90

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. 2021 DSÖ merkezi sinir sistemi sınıflaması (Komori 2022)…….7

Tablo 2.2. Majör primer MSS tümörlerinde diagnostik genler, moleküller, pathwaylar ve/veyakombinasyonlar(Louis et al.2021) ……..…...8

Tablo 3.1. Preperatların Ön Yıkama Solüsyonları……..……...29

Tablo 3.2. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar……...……30

Tablo 3.3. DAPI solüsyonu……..……..31

Tablo 3.4. Reverse (ters) transkripsiyon miksi için gerekli reaktifler ve miktarlar...34

Tablo 3.5. Reverse (ters) transkriptaz reaksiyon koşulları……...……..35

Tablo 3.6. RT-PCR reaktifleri……...…….36

Tablo 3.7. RT-PCR sıcaklık koşulları……..……...36

Tablo 3.8. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve baz çifti uzunlukları……..…….37

Tablo 4.1. Glioblastoma olgularına ait cinsiyet, yaş, IDH mutasyon durumu, O.S ve tanı bilgileri……...……...…39

Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait cinsiyet, yaş, tümör dereceleri, O.S ve tanı bilgileri…….42

Tablo 4.3. Glioblastoma olgularına ait PD-L1/PD-L2 genleri için FISH sonuçları..45

Tablo 4.4. Kontrol grubuna ait PD-L1/PD-L2 genleri için FISH sonuçları……...47

Tablo 4.5. Glioblastoma olgularına ait JAK2 gen bölgesi için FISH sonuçları…….50

Tablo 4.6. Kontrol grubu olgularına ait JAK2 gen bölgesi için FISH sonuçları…....52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yetişkin tip diffüz gliomaların sınıflandırılması ve genetik parametreler (Yuan, Wang, and Ma 2022)…….....6

Şekil 2.2. Glioblastoma'da tedavi algoritması (Tan et al. 2020)…….....14

Şekil 2.3. İmmün kontrol noktası(Conway et al. 2018)…….....15

Şekil 2.4. PD1'in ana sinyal yolakları (Bardhan et al. 2016)……17

Şekil 2.5. Programlanmış ölüm reseptörü 1 (PD1) ligandının yeniden düzenlenmesi ve bağışıklığı önlemek için kanser hücreleri tarafından kullanılan iki yol (Guan, Lim, Mekhail and C. C. Chang 2017)……...18

Şekil 2.6. PD-1 ligasyonunun T hücresi bağışıklık fonksiyonu üzerindeki biyolojik ve klinik etkileri (Bardhan et al. 2016)……..…21

Şekil 2.7. Bağışıklık kontrol noktası blokajına yanıtı öngören bağışıklıkla ilgili özellikler ve ilgili yolaklar (Conway et al. 2018)…….....….23

Şekil 4.1. PD-L1, PD-L2 genleri için FISH yöntemi ile saptanan kopya sayısı değişiklikleri……..…….49

Şekil 4.2. JAK2 gen bölgesi için FISH yöntemi ile saptanan kopya sayısı değişiklikleri……54

Şekil 4.3. Olgu 11'e ait PD-L1/2 ve JAK2 gen bölgeleri için FISH yöntemiyle saptanan co-amplifikasyon görüntüsü……..….55

Şekil 4.4. Olgu 42 ve 30'a ait PD-L1/2 gen bölgelerinin amplifikasyon ve JAK2 gen bölgesinin yeniden düzenlenme pozitif olan FISH görüntüleri……..56

Şekil 4.5. B-aktin (kontrol gen) ve JAK2 genine ait amplifikasyon görüntüsü….....58

Şekil.4.6. PD-L1 ve PD-L2 genlerine ait amplifikasyon görüntüsü……...59

Şekil 4.7. Tümör derecelerinin ve PD-L1 gen eskpresyon düzeylerinin karşılaştırılması……..……....60

Şekil 4.8. Beyin tümör dereceleri ve PD-L2 gen ekspresyon seviyesi……...…61

Şekil 4.9. Tümör dereceleri ve JAK2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması……..62

Şekil 4.10. Grade 4 amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……...…….63

Şekil 4.11. Grade 2 amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki…….……...63

Şekil 4.12. Grade 1 amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……...……..……64

Şekil 4.13. Olgu ve kontrol grubu amplifikasyon düzeyleri ve PD-L1 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması……..……...64

Şekil 4.14. Grade 4 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……..……...66

Şekil 4.15. Grade 3 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……..…….....66

Şekil 4.16. Grade 2 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……...67

Şekil 4.17. Grade 1 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……....67

Şekil 4.18. Olgu ve kontrol grubu amplifikasyon düzeyleri ve PD-L2 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması……..……...68

Şekil 4.19. Grade 4 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……..……..69

Şekil 4.20. Grade 3 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……..……..69

Şekil 4.21. Grade 2 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……..……..70

Şekil 4.22. Grade 1 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki……..……..70

Şekil 4.23. Olgu ve kontrol grubu JAK2 yeniden düzenleme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması……..……....71

Şekil 4.24. IDH-wild tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması……...72

Şekil 4.25. IDH-mutant tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması…….…..73

Şekil 4.26. IDH-wild tip ve IDH-mutant tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2, JAK2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması……..74

GRAFİKLER

Grafik 1. Glioblastoma olgularında IDH mutasyon durumu yüzdesi……41

Grafik 2. Düşük dereceli glial tümör dereceleri ve olgu dağılımı…….44

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	:	Antijen Sunan Hücre
DC	:	Dentritik Hücre
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
FFPE	:	Formalinle Sabitlenmiş Parafine Gömülü Doku
FISH	:	Floresan In Situ Hibridizasyon
GBM	:	Glioblastoma Multiforme
IDH	:	İzositrat dehidrogenaz
IFN	:	İnterferon gama
JAK	:	Janus Kinaz
JAK2	:	Janus Kinaz 2
MDM2	:	Mouse Double Minute 2
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
NOS	:	Başka bir şekilde tanımlanmamış
PD1	:	Programlanmış Hücre Ölüm Proteini
PD-L1	:	Programlanmış Ölüm Ligandı 1
PD-L2	:	Programlanmış Ölüm Ligandı 2
RB	:	Retinoblastoma
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı PCR
TCR	:	T Hücre Reseptörü
Treg	:	Düzenleyici T Hücreleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma multiforme (GBM), yüksek agresif davranış ve yüksek nüks oranı ile karakterize edilen, yetişkinlerde en sık görülen primer malign beyin tümörüdür (Hao et al. 2020). Glioblastoma, tüm malign santral sistemi (SSS) tümörlerinin %45'ini ve tüm primer malign santral sinir sistemi tümörlerinin %80'ini, tüm malign gliomaların da yaklaşık %54,4'ünü oluşturmaktadır (Ann et al. 2019). İnsidansı yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir (Tan et al. 2020). Ortalama tanı yaşı 65'tir ve erkek/kadın oranı 1.7 olarak bildirilmektedir (Le Rhun et al. 2019). Glioblastomanın yıllık insidansı 100.000'de 3.19'dur ve bu malign beyin ve santral sinir sistemi tümörleri arasında en yüksek insidans oranı olarak bilinmektedir (Ann et al. 2019). Glioblastoma hastalarında 1 yıllık sağ kalım oranı %37,2, 5 yıllık sağ kalım oranı %5,1 ve ortalama sağ kalım süresi ise yaklaşık 10 aydır (Taylor, Brzozowski, and Skelding 2019). Glioblastoma için cerrahi, radyoterapi, sistemik tedavi (kemoterapi, hedefe yönelik tedavi) ve destekleyici bakımı içeren multimodalite tedavisindeki son gelişmelere rağmen, genel prognoz hala kötüdür ve uzun süreli sağ kalım nadirdir (Tan et al. 2020). Tüm tedavi çalışmalarına rağmen hastaların ancak %3,3'ü 2 yıl ve %1,2'si 3 yıl sağ kalabilmektedir (Weller et al. 2015).

CD279 olarak da bilinen, CD28 ailesinin bir üyesi olan Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 1 (PD1), tümörün progresyonu (ilerlemesi) sırasında bağışıklık kaçışında çok önemli bir rol oynayan ko-inhibitör reseptördür (Inoue et al. 2016). PD1'in ligandları olan, PD-L1 (CD274) ve PD-L2 (CD273), B7 ailesi üyeleridir ve sitotoksik T hücrelerini bloke ettikleri tümör hücrelerinin yüzeylerinde aşırı eksprese oldukları bilinmektedir (Inoue et al. 2016). PD1, ligandları olan PD-L1 (CD274, 9. kromozomda PDCD1LG1) ve PD-L2 (CD273, 9. kromozomda PDCD1LG2)'ye bağlanarak ilgili sinyal yolağını aktive ederek etki gösterir (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017).

Programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1, CD274) tümör hücreleri, tümör infiltre eden immün hücreler ve çeşitli periferik dokuların yüzeyinde bulunan ve immün sistemi baskılamada önemli rol oynayan bir transmembran proteinidir. PD-L1, T ve B hücreleri, makrofajlar, düzenleyici T hücreleri (Treg), dentritik hücrelerin yanı sıra bazı immün olmayan hücre tiplerinde de (vasküler endotelyal hücreler, pankreatik hücreler) geniş ölçüde eksprese edilmektedir. Programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2, CD273)'nin

ekspresyonu ise büyük ölçüde makrofajlar ve dentritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerde meydana gelmektedir (Guan, Lim, Mekhail, and C.-C. Chang 2017; X. Wang et al. 2019).

PD-L1, melanoma, glioblastoma, akciğer kanseri, pankreatik kanser, meme kanseri, mide kanseri, servikal ve ovaryan kanser ile hematolojik malignitelerde de (multiple myeloma, lenfoma ve çeşitli lösemi tiplerinde) eksprese olmaktadır (Sun, Mezzadra, and Schumacher 2018). PD-L2 ekspresyonu ise genellikle B hücreli lenfomalar gibi hematopoetik tümörlerde gözlenmektedir (Guan, Lim, Mekhail, and C.-C. Chang 2017).

Kanser hücreleri bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğradığında PD-L1, PD-L2 ekspresyonu artmakta, T hücrelerinin baskılanmasına ve immün kaçışa neden olmaktadır (Nallasamy et al. 2018). Kanser hücrelerinde PD-L1'in PD-L2'ye göre daha yüksek oranda eksprese olduğu görülmüştür (Sharpe and Pauken 2018a).

Janus Kinaz 2 (JAK2), hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, mitotik rekombinasyon, genetik instabilite ve heterokromatin modifikasyonları dahil olmak üzere çeşitli işlemleri düzenleyen sitoplazmik sinyal kaskadlarını başlattığı bilinen reseptör olmayan tirozin kinazdır (Baumann 2009). Hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını destekleyen proteinlerin yapılması için gerekli talimatları sağlamakta ve ekstraselüler proteinlerden hücre içerisine oluşturulan kimyasal sinyallerin iletilmesinde etkin olan JAK/STAT sinyal yolağının bir üyesi olarak görev yapmaktadır (Anon n.d.).

PD-L1 ekspresyonu, yalnızca doğrudan PD-L1'in amplifikasyonu yoluyla değil, aynı zamanda daha aktif bir JAK/STAT yolu ile dolaylı olarak da arttırılmaktadır (Conway et al. 2018; Inoue et al. 2016). JAK/STAT sinyali, interferon gama (IFN) gibi enflamatuar sitokinlere yanıt olarak PD-L1'in upregülasyonunda önemli kabul edilmektedir. JAK2 aktivitesinin sadece klasik JAK/STAT yolu üzerinden PD-L1'in transkripsiyonel aktivastonuna yol açmakla kalmayıp PD-L1'in taşınmasını da kontrol ettiği bilinmektedir (Seiichi Ikeda et al., 2016).

PD-L1 ve PD-L2 gen ekspresyon düzeylerinin glioblastoma hasta örneklerinde yüksek olduğu, prognozu olumsuz yönde etkilediği önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Aşırı PD-L1 ekspresyonu olan hastaların, nispeten daha düşük PD-L1 ekspresyonu olan hastalara göre daha kısa süreli bir sağkalım süresine sahip olduğu belirtilmektedir (Hao et

al. 2020). Ayrıca, PD-L2 ekpresyonuna sahip GBM hastalarının, düşük ekspresyona sahip hastalara göre daha az hastalıksız sağkalım (DFS) gösterdiği, düşük ve yüksek dereceli gliomalarda artan PD-L2 ekspresyonunun kötü klinik sonuçlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Z. liang Wang et al. 2019a).

JAK2 geninin ekspresyon artışının PD-L1 ve PD-L2 genlerinin ekspresyonunu güçlendirdiği yönde veriler olduğu bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada, farklı kanser türlerinde PD-L1, PD-L2 ile birlikte JAK2 genini içeren 9p24.1 bölgesinin amplifikasyonu bilinmektedir. Buradan yola çıkarak; PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinde meydana gelen genomik kopya sayısı kazanımlarının ilgili genlerin artan ekspresyon seviyelerinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık; gliomaların yaklaşık %40'ını oluşturan glioblastomada PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin kopya sayısı değişiklikleri ve ekspresyon paternleri arasındaki ilişkinin; insidans ve prognoz üzerine etkisi henüz net olarak ortaya konmamıştır.

Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızın hipotezi,

H1. ‘’PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin yüksek grade glial tümörlerde, düşük grade tümörlere göre ekspresyonlarının artmasıyla birlikte gen kopya sayılarında da normalden sapmalar bulunmaktadır’’

Yukarıda belirtilen hipotez doğrultusunda; diğer kanser tiplerinde oldukça önemli fonksiyonları olan PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin glioblastomada genomik kopya sayısı değişiklikleri ile ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılarak ortaya konması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda glioblastoma doku örnekleri ile düşük dereceli glial tümör dokuları arasında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen kopya sayılarında farklılık olup olmadığının belirlenmesi, tümör gradeleri ve gen ekspresyonları ile ilişkilerinin ortaya konması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri ve Güncel Sınıflama

Gliomalar en yaygın primer beyin tümörleridir. Histolojik olarak normal glial hücrelerin özelliklerini paylaşırlar ve benzerliklerine göre isimlendirilirler (Chen et al. 2017). 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), en yaygın malign primer beyin tümörü türü olan gliomaların sınıflandırmasında, histolojik sınıflandırmaya ek olarak genetik özellikler (moleküler parametreler) de ilk kez entegre edilmiştir (Dewitt, Mock, and Louis 2017). 2016 DSÖ sınıflandırmasının, glial tümörlerin bir çoğunun sınıflandırılmasında, klinik deneylerin tasarımında ve yorumlanmasında önemli etkileri bulunmaktadır. Fakat, 2021 yılında DSÖ, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) sınıflandırmasında; tümörlerin adlandırılması, derecelendirmesinde yapılan değişikliklerin yanısıra altın standart olan histopatolojik özelliklere göre değerlendirmede tümör heterojenitesine bağlı olarak 2016 sınıflandırmasında dahil edilen moleküler belirteçlere tanısal, prognostik ve tedaviye yönelik çok sayıda yeni moleküler belirteçler de eklenmiş, moleküler sınıflandırma ağırlık kazanmıştır. Ayrıca tümör metilom profili oluşturma, MSS tümörlerinin sınıflandırılması ve teşhisi için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır ve 2021 DSÖ sınıflandırması, birçok SSS tümör tipi ve alt tipi için metilom sınıflandırmasını desteklemektedir (Gritsch, Batchelor, and Gonzalez Castro 2022).

2021 DSÖ glioma sınıflandırmasındaki ana güncellemeler şunlardır:

1- MSS tümörlerinin sınıflandırılması, moleküler genetik değişikliklerin ve gliomaların doğru bir şekilde sınıflandırılması için önemli olan klinik patolojik uygulamaların kombinasyonuna dayanmaktadır.
2- ‘varlık’ terimi yerine ‘tip’, ‘varyant’ terimi yerine ‘alt tip’ terimi kullanılmaktadır.
3- Roma rakamları (I, II, III) yerine Arap rakamları (1, 2, 3) kullanılmakta ve neoplazmla türler içinde derecelendirilmektedir.
4- Pediatrik tip diffüz gliomalar sınıflandırmaya eklenmiştir.
5- NOS terimi standardize edilmiş ve ek olarak, NEC (not elsewhere classified) eklenmiştir (Yuan et al. 2022).

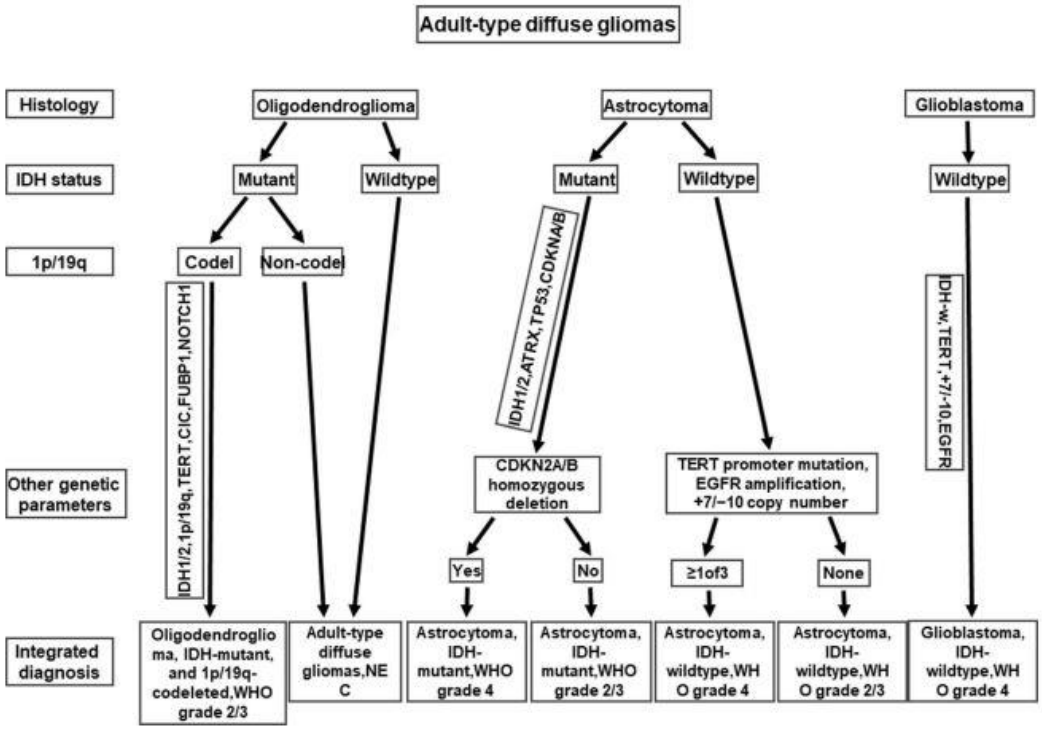
2016 yılında WHO MSS tümörleri Sınıflandırmasının güncellenmiş dördüncü baskısının yayınlanmasından bu yana, bu tümörlerin çoğunun moleküler temellerine ilişkin bilgiler hızlı bir şekilde gelişmeye devam etmiştir. 2021 DSÖ'nun MSS tümörleri sınıflandırmasının beşinci baskısı, bu yeni görüşlerin çoğunu içerecek şekilde revize edilmiştir. Güncellemelerin birçoğunun klinik uygulama ve hasta yönetimi için önemli etkileri olacağı belirtilmektedir.

Değişiklikler arasında en önemlileri; yüksek klinik etkiye sahip olanlar arasında yer alan difüz astrositik gliomalarda, ileri evre histolojik bulgular olmasa dahi IDHwt (IDH geni wild-type) GBM veya IDHm (IDH mutant) astrositoma, DSÖ grade 4 tanısı konabilecek ve bu doğrultuda hasta yönetimi yapılabilecektir.

2016 sınıflamada primer GBM (IDHwt, evre IV diffüz astrositom) IDHwt, evre II diffüz astrositomdan farklı bir hastalık olarak sınıflandırılmıştı. Diffüz astrositom, (IDHwt,GIV tümör (glioblastoma) olarak derecelendirilmesi öncelikle histopatolojik ileri evre özelliklerin (nekroz ve/veya mikrovasküler proliferasyon) varlığına dayanıyordu. Ancak grade II ve III astrositomların (IDHwt) genomik değişiklikleri ve klinik özelliklerinin grade IV primer GBM ile çok benzerlik göstermesi nedeniyle ileri evre GBM olarak değerlendirilmesi 2021 sınıflandırmada önerilmiştir.

Histopatolojik evre II veya III yaygın astrositik gliomalarda (IDH wt) kromozom +7/−10, EGFR amplifikasyonu ve/veya TERT promoter mutasyonunun herhangi birisinin varlığının histolojik olarak teşhis edilen GBM'le aynı prognozu taşıdığını ortaya konmuştur. Bu nedenle WHO 2021'de IDH, kromozom 7,10, EGFR ve TERT analiz verilerinin değerlendirilmesi öneriliyor.

Yetişkin tip diffüz gliomaların sınıflandırılması ve genetik parametreler Şekil 2.1.'de yer almaktadır ve 2021 DSÖ merkezi sinir sistemi tümörleri sınıflaması Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Yetişkin tip diffüz gliomaların sınıflandırılması ve genetik parametreler (Yuan et al. 2022)

Tablo 2.1. 2021 DSÖ merkezi sinir sistemi sınıflaması (Komori 2022)

Tümör tipi	MSS DSÖ Derecesi
Yetişkin-tip Diffüz Gliomalar	
• Astrositoma. IDH-mutant	2/3/4
• Oligondendrioglioma, IDH-mutant ve 1q19q kodelesyonu	2/3
• Glioblastoma, IDH-wild tip	4
Pediatrik-tip Diffüz Düşük Dereceli Gliomalar	
• Diffüz astrositoma, MYB- ya da MYBL1-değiştilmiş	1
• Anjiyosentrik glioma	1
• Gençlerde polimorf düşük dereceli nöroepitelyal tümör	1
• Diffüz düşük dereceli glioma, MAPK yolağı değiştirilmiş	NA
Pediatrik-tip yüksek dereceli gliomalar	
• Diffüz midline glioma, H3 K27 değiştirilmiş	4
• Diffüz hemisferik glioma, H3 G34-mutant	4
• Diffüz pediatrik tip yüksek dereceli glioma, H3-wild tip ve IDH-wild tip	4
• Infant tip hemisferik glioma	NA
Meningioma	1/2/3

2021 DSÖ MSS sınıflandırmasında, moleküler biyobelirteçler teşhis bilgilerinin tanımlanmasında büyük önem kazanmıştır. Bu nedenle sınıflandırma, neoplazmların doğru bir şekilde sınıflandırılması için önemli olan klinikopatolojik özelliklere ek çok sayıda moleküler değişikliği içermektedir. Merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması için önemli olan tanısal değişiklikler için analiz edilen genler, moleküller ve yolaklar Tablo 2.2.'de gösterilmiştir (Louis et al. 2021).

Tablo 2.2. Majör primer MSS tümörlerinde diagnostik genler, moleküller, pathwaylar ve/veya kombinasyonlar (Louis et al. 2021)

Tümör Tipi	Genler,Moleküler Profiller
Astrositoma, IDH-mutant	*IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B*
Oligodendrioglioma, IDH-mutant ve 1p/19q kodelesyonu	*IDH1, IDH2, 1p/19q, TERT promoter, CIC, FUBP1, NOTCH1*
Glioblastoma, IDH-wild tip	IDH-wild tip, *TERT* promotor, kromozom 7/10, *EGFR*
Diffüz astrositoma, MYB- ya da MYBL1-değiştirilmiş	*MYB, MYBL1*
Anjiyosentrik glioma	*MYB*
Gençlerde polimorf düşük dereceli nöroepitelyal tümör	*BRAF, FGFR* ailesi
Diffüz düşük dereceli glioma, MAPK yolağı değiştirilmiş	FGFR1, BRAF
Diffüz midline glioma, H3 K27-değiştirilmiş	*H3 K27, TP53, ACVR1, PDGFRA, EGFR, EZHIP*
Diffüz hemisferik glioma, H3 G34-mutant	*H3 G34, TP53, ATRX*
Diffüz pediatrik tip yüksek dereceli flioma, H3-wild tip, IDH-wild tip	IDH-wild tip, H3-wild tip, *PDGFRA, MYCN, EGFR* (methylome)
Infant tip hemisferik glioma	NTRK ailesi, *ALK, ROS, MET*
Pilositik astrositoma	*KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1*
Piloid özellikli yüksek dereceli astrositoma	*BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B (methylome)*
Pleomorfik ksantoastrositoma	*BRAF, CDKN2A/B*
Subependimal dev hücreli astrositoma	*TSC1, TSC2*
Kordoid glioma	*PRKCA*
Astroblastoma, MN1- değiştirilmiş	*MN1*
Ganglion hücre tümörleri	*BRAF*
Disembriyoblastik nöroepitelyal tümör	*FGFR1*
Oligodendroglioma benzeri özelliklere ve nükleer kümelere sahip yaygın glionöronal tümör	Kromozom 14
Papiller glionöronal tümör	*PRKCA*
Rosette-forming glionöronal tümör	*FGFR1, PIK3CA, NF1*
Miksoid glionöronal tümör	*PDGFRA*
Diffüz leptomeningeal glionöronal tümör	KIAA1549-BRAF füzyon, 1p (methylome)
Multinodüler ve vakuolasyon nöronal tümör	MAPK yolağı
Displastik serebellar gangliositoma (Lhermitte-Duclos hastalığı)	*PTEN*
Ekstraventriküler nörositom	*FGFR* (FGFR1-TACC1 fusion), IDH-wild tip
Supratentoryal ependimomlar	*ZFTA, RELA, YAP1, MAML2*
Posterior fossa ependimomlar	H3 K27me3, *EZHIP* (methylome)
Spinal ependimomlar	*NF2, MYCN*
Medullablastoma, WNT-aktive edilmiş	*CTNNB1, APC*
Medullablastoma, SHH-aktive edilmiş	*TP53, PTCH1, SUFU, SMO, MYCN, GLI2 (methylome)*
Medullablastoma, WNT-olmayan/SHH-olmayan	*MYC, MYCN, PRDM6, KDM6A (methylome)*
CNS nöroblastoma, FOXR2-aktive edilmiş	*FOXR2*
Meningiomlar	*NF2, AKT1, TRAF7, SMO, PIK3CA; KLF4, SMARCE1, BAP1* alt tipleri; *H3K27me3; TERT promotor, CDKN2A/B* MSS DSÖ derece 3
Meningeal melanositik tümörler	*NRAS (diffüz); GNAQ, GNA11, PLCB4, CYSLTR2* (sınırlı)
Papiller kraniyofarenjiyom	*BRAF*

2.2. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM), glioblastomaların en malign formu olup merkezi sinir sisteminde yüksek oranda damarlanan, hızlı ve invaziv gelişim gösteren bir tümördür. Glioblastoma, tüm gliomların yaklaşık olarak %57'sini ve tüm merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinin %48'ini temsil eden en yaygın malign primer beyin tümörüdür (Ann et al. 2019; Tan et al. 2020). Glioblastomanın yıllık insidansı 100.000'de 3.19'dur ve bu malign beyin ve santral sinir sistemi tümörleri arasındaki en yüksek insidans oranı olarak bilinmektedir (Ann et al. 2019). Glioblastoma kötü prognozu nedeniyle etkilenen hastaların yaşamını önemli ölçüde etkilemekte ve glioblastoma tedavisine yönelik radyoterapi, sistemik tedavi (hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi) yaklaşımlarındaki önemli gelişmelere rağmen, yeni tanı konmuş hastalarda ortalama sağkalım süresinin 12-18 ay olduğu bilinmektedir (Razavi et al. 2016).

2.2.1. Epidemiyoloji

Glioblastomada insidans yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir(Tan et al. 2020). İnsidans yaşla birlikte artmaktadır ve 75-84 yaşlarında en yüksek orana sahiptir (Montemurro 2020). Ortalama tanı yaşı 65'tir ve erkekler, kadınlardan yaklaşık 1.7 kat daha yüksek bir insidans oranıyla glioblastoma'dan sık etkilenmektedirler (Le Rhun et al. 2019).

2.2.2. Etiyoloji

Gliomaların çoğu için altta yatan karsinogenetik nedenler tam olarak tanımlanmamıştır. Ancak, şu ana kadar, bildirilen tek çevresel risk faktörü, iyonize radyasyona maruz kalmaktır ve glioblastoma ile ilişkili en yüksek risk faktörü olarak bilinmektedir (Tan et al. 2020). Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, artan glioma riski ile şiddetli kafa travması, diyet risk faktörleri, mesleki risk faktörleri ve elektromanyetik alanlara maruz kalma gibi diğer çevresel faktörler arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Fakat yapılan diğer çalışmalarda önerilen risk faktörleri ile glioma gelişimi arasında herhangi bir bağlantı bulunmamıştır (Ohgaki 2009). Ayrıca, glioblastoma ile atopi öyküsü (alerji, astım, egzama) ve diğer bağışıklıkla ilgili durumlar arasında bir ilişki olduğu tanımlanmış (Tan et al. 2020; Wen et al. 2020), fakat altında yatan biyolojik nedenler tam olarak tespit edilememiştir (Tan et al. 2020).

Glioblastoma hastalarının büyük çoğunluğunun ailesinde kanser öyküsü olmamasına rağmen tüm gliomaların yaklaşık %5 kadarının ailesel olduğu gözlenmektedir. Ayrıca, Mendeliyen kalıtım gösteren herediter kanser sendromları arasında yer alan Nörofibromatozis 1 ve 2, Li-Fraumeni, Lynch, Retinablastoma (RB) sendromlarında glial tümörler gözlenmekte olup tüm glial tümörlerin <%1'ini oluşturmaktadır (Ph et al. 2010; Tan et al. 2020). İlgili sendromlardan etkilenmeyen ailelerde de gliomalar rapor edilmekle birlikte ilgili duyarlılık genlerine ilişkin bilgiler henüz çok sınırlıdır (Ph et al. 2010).

2.2.3. Histopatoloji ve klinikopatoloji

Glioblastomaların, diğer gliomalarla beraber nöroglial kök veya progenitör hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (Le Rhun et al. 2019; Tan et al. 2020). 2021'de DSÖ'nün santral sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırmasında moleküler genetik değişiklikler ile birlikte klinik patolojik uygulamaların kombinasyonu ile gliomalar yeniden sınıflandırılmış (Gritsch et al. 2022).

The Cancer Genome Atlas (TCGA)'ta Verhaak GBM'leri, karakteristik genetik değişikliklere ve gen ekspresyon profillerine dayalı olarak; pronöral, nöral, klasik ve mezenkimal olarak dört alt tipte sınıflandırmıştır (Soomro et al. 2017; TAMIMI and JUWEID 2017). Pronöral GBM'ler daha düşük insidans oranına ve oligodendroglial hücrelerin özelliklerine sahiptir (TAMIMI and JUWEID 2017). Nöron gelişimi ile korelasyon gösteren genleri ifade etmektedir ve genellikle 40 yaşlarında ortaya çıkmakta, iyi prognozla ilişkilendirilmektedir. Pronöral alt tipte, CDK4, CDK6, PDGFRA, MET ve IDH1 mutasyonları en sık görülen mutasyonlardır (Soomro et al. 2017). Nöral GBM'lerin, astrosit ve oligodendrosit hücrelerden meydana geldiği, nöronla ilgili genlerin ekspresyonunu gösterdiği bilinmektedir. Mezenkimal alt tip, astrositlerin gen ekspresyon paterninde ve ayrıca mikroglial belirteçlerde zenginleştirilmiştir ve anjiyogenez veya mezenşim ile korelasyon gösteren genleri ifade etmektedir. 50 yaşın üzerinde ortaya çıkmakta ve kötü prognozla ilişkilidir. TP53, NF1 ve CDKN2A gen mutasyonları ve/veya kaybı, mezenkimal alt tipte görülen mutasyonlardır (Soomro et al. 2017). Ayrıca, diğer alt tiplere oranla, mezenkimal alt tipin daha yüksek derecede NF1

mutasyonlarına ve PTEN değişikliklerine, histolojik olarak daha yüksek derecede nekroza sahip olduğu saptanmıştır (Montemurro 2020). Klasik GBM'ler kök hücrelerin belirteçlerini ifade etmektedirler ve bu tümörlerde TP53, IDH1, LOH 10q, PTEN, CDKN2A ve EGFR mutasyonları sıklıkla izlenmektedir (Soomro et al. 2017).

2.2.4. Genetik profil

Güncel 2021 sınıflamayla birlikte, GBM sınıflandırmasının güncellenmesi klinik olarak en büyük pratik öneme sahiptir. Glioblastoma sadece IDH-wild tip astrositomu içerir. Tüm yetişkin IDH mutant diffüz astrositom tek tip olarak kabul edilir (IDH-mutant astrositom, DSÖ derece 2-4). Ayrıca moleküler genetik parametreler, klinikopatolojik derecelendirme ve prognoz değerlendirmesi için etkili biyobelirteçler olarak kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (Yuan et al. 2022). IDH-wild tip olan ve GBM'nin moleküler özelliklerine sahip olan diffüz gliomalar, histolojik olarak yüksek dereceli özelliklere sahip olmasalar bile, glioblastoma'nın ikincisi olarak sınıflandırılmaktadır. IDH-mutant astrositomda CDKN2A/B homozigot delesyonu ve TERT promotor mutasyonu, EGFR gen amplifikasyonunun kombinasyonunu içermektedir ve IDH-wild tip diffüz astrositomda kromozom 7'de kazanım ve 10. kromozomun delesyonu gibi kopya sayısı değişiklikleri yer almaktadır (Melhem et al. 2022).

Genel olarak glioblastomalarda;

- EGFR geninin amplifikasyonu tüm gliomalarda yüksek insidansa sahiptir ve aynı zamanda yüksek dereceli malignite, kötü prognoz ve daha kısa OS ile ilişkilendirilmektedir (Montemurro 2020).
- PTEN delesyonu, GBM'lerin %31-44'ünde bulunmaktadır (Li, Cai, and Liu 2016). Ayrıca, IDH-wild tip GBM'de PTEN delesyonuna sahip olan hastaların kötü prognoz gösterdiği bilinmektedir (Montemurro 2020).
- MGMT promotör metilasyonunun GBM'lerde insidansı %30 ila 60'ı arasında değişmektedir (Li et al. 2016).
- 10q'da heterozigosite kaybı (LOH 10q23) glioblastomaların yaklaşık olarak %70'inde meydana gelmektedir (Li et al. 2016)
- TERT promotör mutasyonları, GBM'lerin %70-80'inde görülmektedir ve onkogenezde önemli bir rol oynamaktadır (Tan et al. 2020).

- Mouse double minute 2 homolog (MDM2)'nin over ekspresyonu, glioma oluşumunda önemli önemli bir rol oynarken, GBM'lerin yaklaşık olarak %10-14'ünde bulunmaktadır (Richterová and Kolarovszki 2016).
- TP53 mutasyonu ve/veya delesyonu, genel olarak GBM'lerin %35'inde bulunur (Richterová and Kolarovszki 2016).
- Kromatin modülasyonunda ve telomerlerin korunmasında rol oynayan ATRX mutasyonu, gliomalarda prognostik bir faktörü temsil etmektedir (Montemurro 2020). ATRX mutasyonları genellikle IDH ve TP53 mutasyonlarıyla birlikte gözlemlenmektedir (Richterová and Kolarovszki 2016).
- IDH gen mutasyonu, α-ketoglutarik asitten anormal 2-hidroksiglutarik asit oluşumuna yol açarak, fonksiyonları α-ketoglutarik aside bağlı olan enzimleri inhibe etmektedir. Buna bağlı olarak, birçok gende hipermetilasyona neden olup, farklı gen ekspresyon profillerinin oluşmasına ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonun yol açar. Sonuç olarak, glioblastoma'ların oluşumuna neden olur (Soomro et al. 2017).
  Ek olarak, GBM'li hastalarda IDH1 mutasyonu ile OS arasında da bir ilişki olduğu belirtilmektedir (Richterová and Kolarovszki 2016).
- VEGFR2 amplifikasyonu GBM olgularının %6-17'sinde bulunmaktadır ve kötü prognoz gösterdiği bilinmektedir (Qin et al. 2021).
- GBM'de yüksek ERBB2 ekspresyonu kısa sağ kalım ile ilişkilendirilmektedir (Qin et al. 2021).

2.2.5. Prognoz

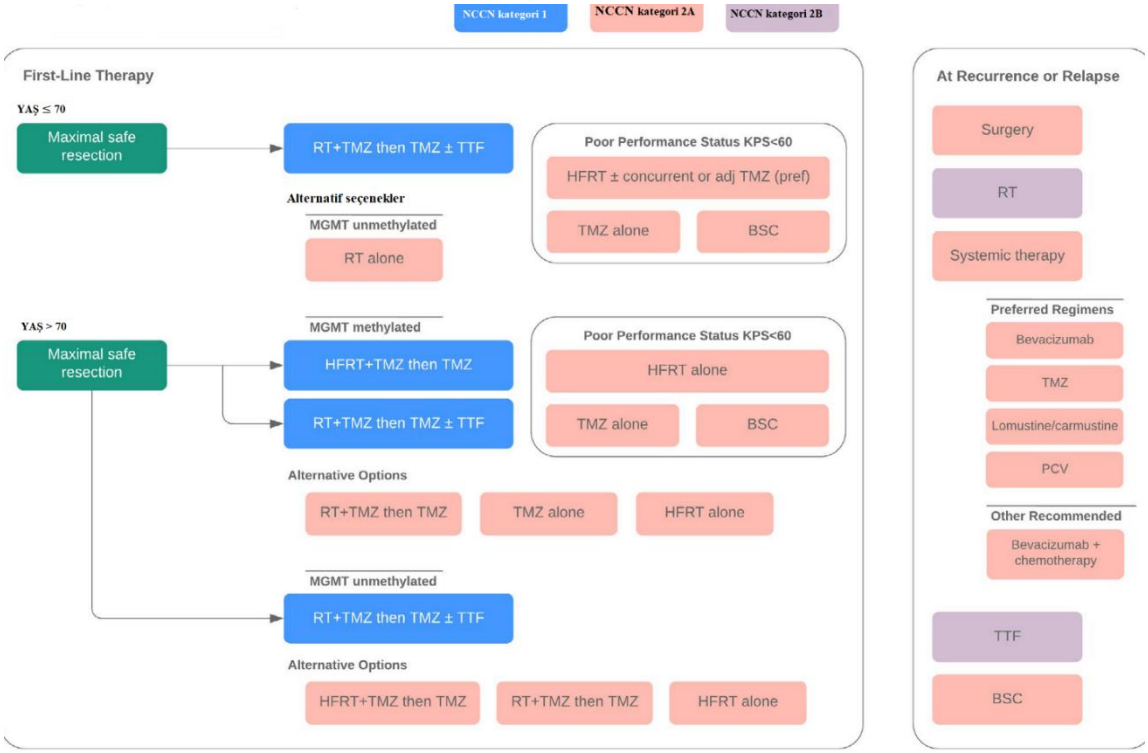
Glioblastoma kötü prognoza sahip bir tümör tipidir ve uzun süreli sağ kalım gözlenmektedir (Tan et al. 2020). Glioblastoma hastalarında 1 yıllık sağ kalım oranının %37,2, 5 yıllık sağ kalım oranının %5,1 ve ortalama sağ kalım süresinin ise yaklaşık 10 ay olduğu bilinmektedir (Taylor et al. 2019).

Yaşlı hastalarda, en iyi destekleyici bakım ile ortalama sağ kalım süresi 4 aydan fazla değildir. Bununla birlikte, MGMT promotör metilasyonu gibi moleküler özelliklerin, daha iyi prognoz sağladığı bilinmektedir (Tan et al. 2020). Yüksek EGFR

amplifikasyonu, PTEN mutasyonu, TERT mutasyonu ve 10q delesyonuna sahip olan hastalar kötü prognoza sahip olma eğilimindedir (Montemurro 2020).

2.2.6. Tedavi

Yeni teşhis edilmiş glioblastomalı hastaların tedavi standardını, cerrahinin ardıdan ilaçlarla eşlik eden radyoterapi kombinasyonu ve 6 kür'e kadar temozolomid kemoterapi oluşturmaktadır (Le Rhun et al. 2019). Glioblastoma tedavisine yönelik kemoterapi ve radyoterapi yaklaşımlarındaki önemli gelişmelere rağmen, hastalarda genel sağkalım yaklaşık 15-18 ay arasındayken, 5 yıllık sağkalım süresinin ise %10'dan az olduğu bilinmektedir (Razavi et al. 2016; Wen et al. 2020). Glioblastoma tedavisinde, koruyucu kemoterapinin ardından, cerrahi rezeksiyon yararlı olsa da glioblastomanın lokalizasyonu dolayısı ile cerrahi rezeksiyon ile tümörlü dokunun tamamını almak mümkün değildir ve bu durum sonrasında nükse yol açmaktadır (Narayan et al. 2011). Glioblastoma'da bir kez nüks meydana geldiğinde, ortalama sağkalım süresinin 22-24 hafta olduğu tahmin edilmektedir (Wen et al. 2020). Glioblastoma hastaların yönelik tedavi algoritması Şekil 2.2.'de özetlenmiştir (Tan et al. 2020).



Şekil 2.2. Glioblastoma'da tedavi algoritması (Tan et al. 2020)

2.3. PD1/PD-L1 İmmün Kontrol Noktası

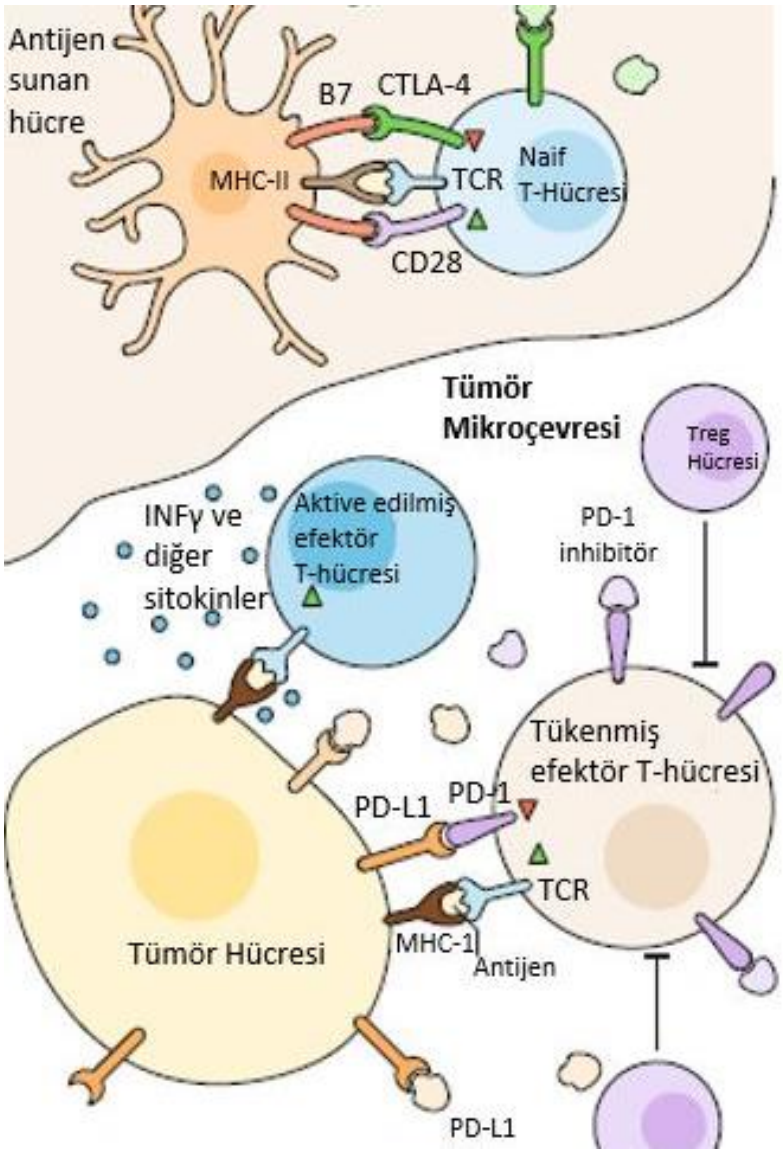
T lenfositleri efektör olarak işlev görür ve bağışıklık sistemini düzenlemede önemli bir göreve sahiptir (Bardhan, Anagnostou, and Boussiotis 2016). T hücresi bağışıklık sistemi, patojenle enfekte olmuş hücreler ve/veya kanser hücreleri gibi anormal hücreleri tanımada ve yok etmede önemli bir rol oynamaktadır (Sun et al. 2018).

T hücresinin tam olarak aktive olması için iki farklı sinyale ihtiyacı vardır:

1. T hücre reseptöründen (TCR) türetilen bir sinyal
2. Kostimülatör reseptörlerden türetilen ikinci bir sinyal (Wang et al. 2021).

Bir T hücresi reseptörü (TCR), makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) gibi profesyonel antijen sunan hücrelerin (APC'ler) ana histo-uyumluluk kompleksi (MHC) üzerinde sunulan bir antijene bağlandığında T hücresi aktivasyonu başlatılır. Aktivasyon süreci, T hücreleri üzerindeki ortak uyarıcı moleküller CD28'in ve profesyonel APC'ler üzerindeki B7 ligandlarının (CD80/86) etkileşimi yoluyla tamamlanır (Şekil 2.3.)

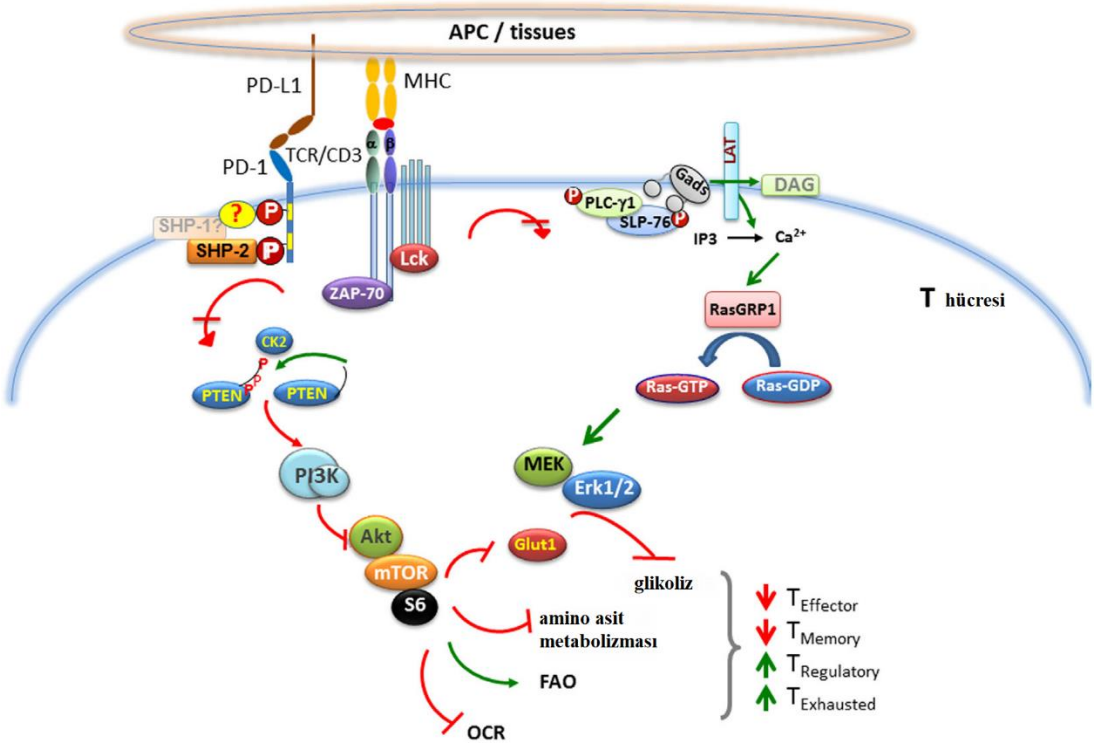
(Conway et al. 2018). CTLA-4, PD1 gibi inhibitör reseptörleri, uygun T hücresi aktivitesini düzenlemek ve bağışıklık toleransının kırılmasını önlemek için bağışıklık kontrol noktaları olarak hizmet etmektedir (Bardhan et al. 2016). PD-1 yoluyla immün yanıtın inhibisyonu, PD1'in ligandları olan PD-L1 ve PD-L2 ile etkileşime girmesiyle gerçekleşir (Conway et al. 2018).



Şekil 2.3. İmmün kontrol noktası (Conway et al. 2018)

Antijen sunan hücreler, MHC-II kompleksi/TCR ve B7(CD80/86)/CD28 ortak uyarıcı bağlanması yoluyla naif T hücrelerini aktive etmektedir. Aktive edilmiş efektör T hücreleri, tümör hücrelerine odaklanır ve anti tümör bağışıklık tepkisini artıran IFN-y ve diğer sitokinleri serbest bırakır. Tümör hücreleri, tümör hücresi MHC-1 kompleksi üzerinde sunulan hedef tümör antijenlerinin TCR tarafından tanınmasına rağmen, T hücresi PD-1 reseptörlerine bağlanarak bağışıklık aktivitesini inhibe eden PD-L1'i eksprese etmektedir ve aynı zamanda, düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) ayrıca T hücre aktivitesini inhibe eder ve "tükenmiş" bir efektör T hücre fenotipine yol açar. PD-1 inhibitörleri ve PD-L1 inhibitörleri, tümör hücresi PD-L1 ligandları ve T hücresi PD-1 reseptörleri arasındaki bağlanmayı keserek anti tümör immün tepkisini arttırmaktadır (Conway et al. 2018).

Programlanmış hücre ölüm proteini 1 ligasyonu, TCR aracılı sinyalleşmeyi azaltır ve T hücresi aktivasyonunu başlatmak için gerekli olan PI3K/Akt ve Ras/MEK/Erk yolağı olmak üzere iki sinyal yolağının aktivitesini bozar. Ayrıca**,** PI3K/Akt/mTOR ve Ras/MAPK/Erk yolaklarının inhibisyonuna neden olarak glikoliz ve amino asit metabolizmasının aşağı regülasyonu ve T hücrelerinde yağ asidi oksidasyonunda artışa yol açmaktadır. T hücresi metabolik yeniden programlamasındaki bu değişiklik, T hücresi farklılaşmasının seyrini değiştirebilir, efektör ve hafıza T hücrelerinin farklılaşmasının bozulmasına yol açarken, T düzenleyici hücrelerin ve tükenmiş T hücrelerinin farklılaşmasını arttırır (Şekil 2.4.) (Bardhan et al. 2016).

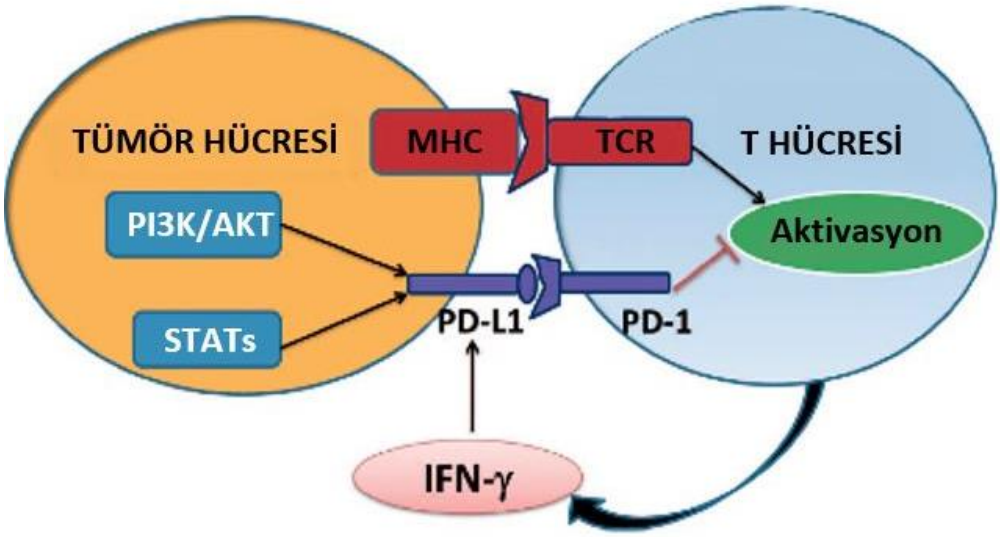


Şekil 2.4. PD1'in ana sinyal yolakları (Bardhan et al. 2016)

Tümör hücreleri üzerindeki immün kontrol noktası ligandlarının ekspresyonunu açıklayan iki ana mekanizma bulunmaktadır:

1- Adaptif immün direnç: Tümör hücresi yüzeyindeki PD-L1 ekspresyonu, aktif T hücreleri tarafından salgılanan IFN-γ gibi inflamatuar sinyaller tarafından indüklenmektedir.

2- Doğuştan gelen immün direnç: EGFR mutasyonları, ALK yeniden düzenlemeleri, PTEN kaybı gibi onkojenik değişikliklerin ardından, PI3K-AKT yolağının aktivasyonu, bağışıklık hücreleri tarafından tümör hücrelerinin inhibisyonuna neden olan PD-L1 ekspresyonunu indüklemektedir(Şekil 2.5.) (Inoue et al. 2016).



Şekil 2.5. Programlanmış ölüm reseptörü 1 (PD1) ligandının yeniden düzenlenmesi ve bağışıklığı önlemek için kanser hücreleri tarafından kullanılan iki yol

(Guan, Lim, Mekhail and C. C. Chang 2017)

2.3.1. Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD1)

Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD1, CD279), ümmünoglobulin süper gen ailesine (CD28) ait olan bir hücre yüzey reseptörüdür ve kromozom 2q37.2'de bulunan *PCDC1* geni tarafından kodlanır (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017). İlk olarak, 1992 yılında Ishida ve arkadaşları, murin bağışıklık hücreleri üzerinde PD1'i tanımlamış ve ilgili proteinin klasik tipte programlanmış hücre ölümünü indükleyebileceğini bildirmişlerdir (Makuku et al. 2021). Apoptozla ilişkili olabileceği düşünüldüğü için PD1 (Programlanmış Ölüm) adını almıştır.

PD1, ligandları olan PD-L1 (CD274, 9. kromozomda PDCD1LG1) ve PD-L2 (CD273, 9. kromozomda PDCD1LG2)'ye bağlanarak ilgili sinyal yolağını aktive ederek etki gösterir (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017). PD-1'in ligandlardan birine bağlanması, T hücre aktivitesini inhibe eder, T hücre toleransını indükler, proliferasyonu baskılar, T hücrelerinin bağışıklık tepkisini azaltır ve hücre ölümünü indükler (Makuku et al. 2021).

PD1, makrofajlar, monositler, B hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler (DC), düzenleyici T hücreleri (Treg), miyeloid progenitör hücreler de dahil olmak üzere aktive edilmiş T hücreler üzerinde eksprese edilmektedir (Bardhan et al. 2016; Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017; Makuku et al. 2021; Wang et al. 2021).

Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 1 (PD1), naif T hücrelerinde eksprese edilmezken, aktive edilmiş B ve T hücrelerinde up regüle edilmektedir. Ayrıca, erken aktive edilmiş T hücreleri ve efektör T hücrelerindeki PD1 ekspresyonu, viral enfeksiyonlara karşı bağışıklığı inhibe etmektedir (Wang et al. 2021).

CD279 olarak da bilinen PD1'in, tümörün ilerlemesi sırasında immün sistemden kaçışta çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Inoue et al. n.d.). Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD1)'in ana işlevi, aktif yolak üzerinden T hücre çoğalması, adezyonu, sitokin üretimi ve/veya salınımı dahil inhibitör kinazların aktivasyonunu sağlamaktadır (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017; Xue, Hu, Li, et al. 2017). Aynı zamanda, T hücresi anti tümör aktivitesini sınırlamak ve T hücre tepkisini sınırlayan, hiper bağışıklığa karşı koruyan düzenleyici T hücre (Treg) aktivasyonunu düzenlemek te ana işlevleri arasına yer almaktadır (Litak et al. 2019).

2.3.2. Programlanmış ölüm ligandı 1-2 (PD-L1, PD-L2)

Programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1), 9. kromozom üzerinde lokalize olan *PDCDL1* geni tarafından kodlanır. PD-L1, 1999'd Dong ve arkadaşları tarafından, B7 protein ailesinin bir olası olarak keşfedilmiş ve tanımlanmıştır (Litak et al. 2019).

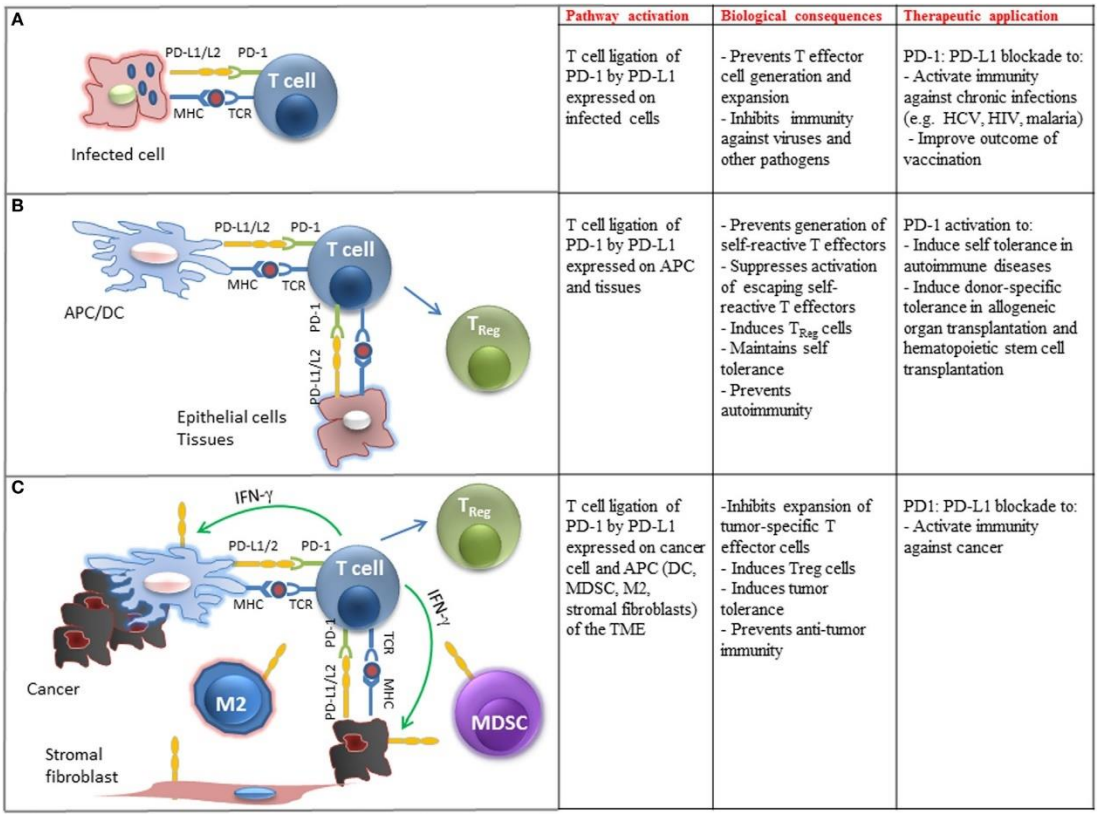
Programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1, CD274) tümör hücreleri, tümör infiltre eden immün hücreler ve çeşitli periferik dokuların yüzeyinde bulunan ve immün sistemi baskılamada önemli rol oynayan bir transmembran proteinidir. PD-L1, T hücreleri, B hücreleri, mezenkimal kök hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler, düzenleyici T hücrelerin (Treg) yanı sıra bazı immün olmayan hücre tiplerinde de (vasküler endotelyal hücreler, pankreatik hücreler, keratinositler, astrositler) geniş ölçüde eksprese edilmektedir (Şekil 2.6) (Bardhan et al. 2016; Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017; Sun et al. 2018; Wang et al. 2021). Ayrıca, plasental sinsityotrofoblastlarda eksprese edildiği ve plasentadaki fonksiyonlarının fetal-maternal toleransı indüklediği bilinmektedir (Bardhan et al. 2016).

PD-L1, melanoma, glioblastoma, akciğer kanseri, meme kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, böbrek kanseri, mide kanseri, kolorektal, rahim ağzı ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere birçok solid kanser türünde eksprese edilmektedir (Sharpe and Pauken 2018b; Sun et al. 2018; Wang et al. 2021). Aynı zamanda, multiple miyeloma, lenfoma, lösemiler gibi hematolojik malignitelerde de PD-L1'in ekspresyon gösterdiği bilinmektedir (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017).

Programlanmış ölüm ligandı 1, tümörogenez, hamilelik, otoimmün hastalık gibi belirli olaylar sırasında kanser bağışıklık tepkisini bloke etmede önemli bir rol oynamaktadır (Wang et al. 2021).

Programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2, CD273)'nin ekspresyonu PD-L1'e göre çok daha sınırlıdır ve büyük ölçüde makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri gibi antijen sunan hücrelerde eksprese edilmektedir (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017; Rotman et al. 2020; Sharpe and Pauken 2018b; Wang et al. 2021). Ayrıca, PD-L2, primer mediastinal ve foliküler lenfomaların yanı sıra Hodgkin lenfoma gibi hematopoetik tümörlerde yüksek oranda gözlenmektedir (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017; Yearley et al. 2017). Hem PD-L1 hem de PD-L2 kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir, fakat, PD-L1, PD-L2'ye oranla daha yaygın olarak bulunmaktadır (Larsen, Hussmann, and Nielsen 2019; Sharpe and Pauken 2018b).

PD-L1'in reseptörü olan PD1'e bağlanmasıyla, T hücre toleransını (Guan, Lim, Mekhail, and C. C. Chang 2017) ve apoptozu ve/veya aktive edilmiş bağışıklık hücrelerinin tükenmesini indüklemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Xue, Hu, Li, et al. 2017). Kanser hücreleri bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğradığında PD-L1, PD-L2 ekspresyonu artmakta, T hücrelerinin baskılanamasına ve immün kaçışa neden olmaktadır (Nallasamy et al. 2018).



	Pathway activation	Biological consequences	Therapeutic application
A	T cell ligation of PD-1 by PD-L1 expressed on infected cells	- Prevents T effector cell generation and expansion - Inhibits immunity against viruses and other pathogens	PD-1: PD-L1 blockade to: - Activate immunity against chronic infections (e.g. HCV, HIV, malaria) - Improve outcome of vaccination
B	T cell ligation of PD-1 by PD-L1 expressed on APC and tissues	- Prevents generation of self-reactive T effectors - Suppresses activation of escaping self-reactive T effectors - Induces T_{Reg} cells - Maintains self tolerance - Prevents autoimmunity	PD-1 activation to: - Induce self tolerance in autoimmune diseases - Induce donor-specific tolerance in allogeneic organ transplantation and hematopoietic stem cell transplantation
C	T cell ligation of PD-1 by PD-L1 expressed on cancer cell and APC (DC, MDSC, M2, stromal fibroblasts) of the TME	-Inhibits expansion of tumor-specific T effector cells - Induces Treg cells - Induces tumor tolerance - Prevents anti-tumor immunity	PD1: PD-L1 blockade to: - Activate immunity against cancer

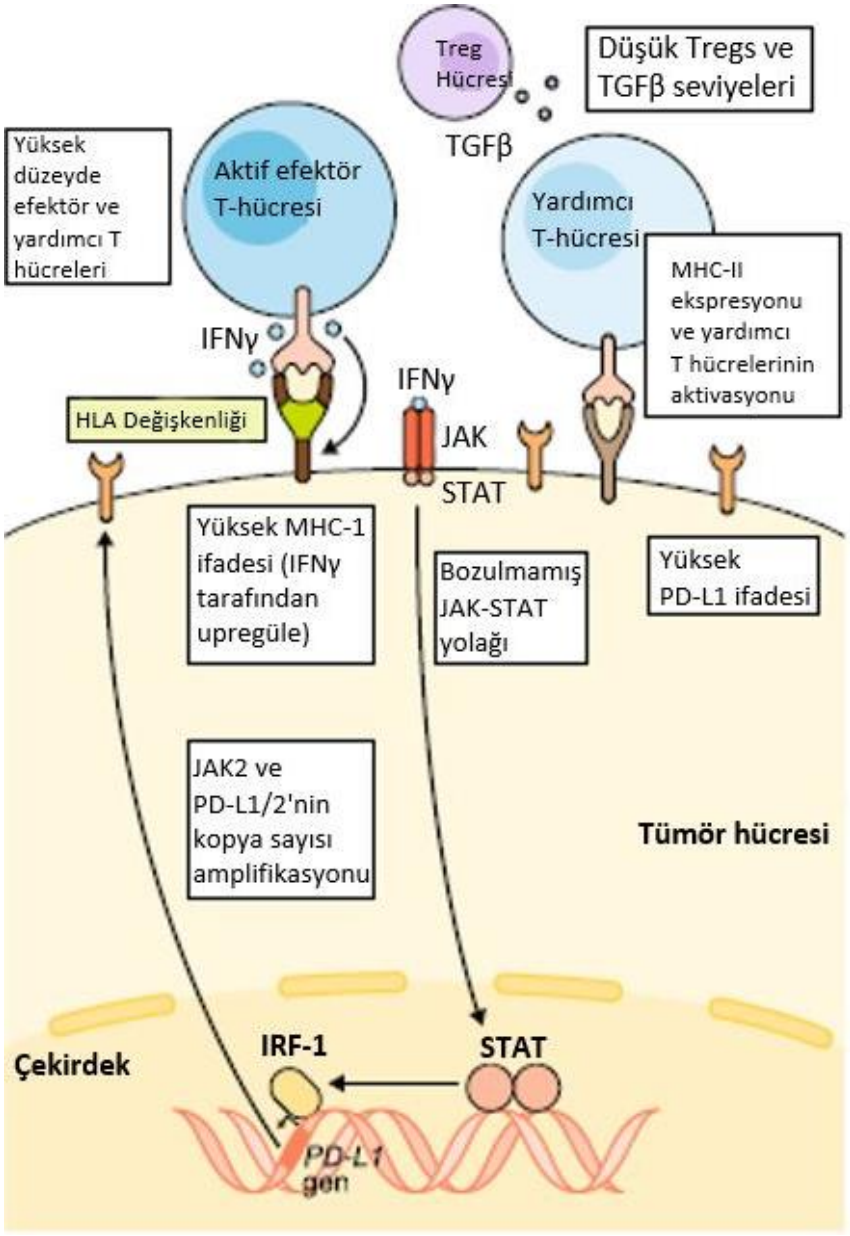
Şekil 2.6. PD-1 ligasyonunun T hücresi bağışıklık fonksiyonu üzerindeki biyolojik ve klinik etkileri (Bardhan et al. 2016)

2.4. Janus Kinaz 2 (JAK2)

Janus Kinazlar, reseptör olmayan tirozin kinazlardır ve PCR temelli stratejiler veya düşük şiddetli hibridizasyon kullanılarak yeni protein tirozin kinaz aşamalarında keşfedilmiştir. Sitoplazmik protein kinaz ailesi, dört Janus Kinaz (JAK) proteininden (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) oluşur. Memelilerde JAK1, JAK1, TYK2 hemen her hücrede eksprese edilirken, JAK3 primer olarak hematopoetik ve lenfoid dokularda eksprese olmaktadır (Yamaoka et al. 2004).

Janus Kinaz 2 (JAK2), hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, mitotik rekombinasyon, genetik instabilite ve heterokromatin modifikasyonları dahil olmak üzere çeşitli işlemleri düzenleyen sitoplazmik sinyal kaskadlarını başlattığı bilinen reseptör olayan tirozin kinazdır (Baumann 2009). Hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını destekleyen proteinlerin yapılması için gerekli talimatları sağlamakta ve ekstraselüler proteinlerden hücre içerisine

oluşturulan kimyasal sinyallerin iletilmesinde etkin olan JAK/STAT sinyal yolağının bir üyesi olarak görev yapmaktadır (Anon n.d.). Ayrıca, Janus Kinazların, hematopoietik hücrelerde sinyal iletimi için önemli olan çeşitli transmembran sitokinlerinin sitoplazmik kısmı ve büyüme faktörü reseptörleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Hücre dışı ligand tarafından reseptör bağlanması, reseptör multimerizasyonuna neden olmakta ve transfosforilasyon ile aktivasyona izin vermek için JAK proteinlerini bir araya getirmektedi ve sonuç olarak, aktive edilmiş JAK2, miyeloproliferatif bozukluklarda ve solid tümörlerde önemli bir hedef olarak ortaya çıkmaktadır (Barrett et al. 2015). JAK2 geni, 9. kromozomun kısa kolu (9p24.1) üzerinde lokalize olup 25 ekzondan oluşmaktadır (Yamaoka et al. 2004).



Şekil 2.7. Bağışıklık kontrol noktası blokajına yanıtı öngören bağışıklıkla ilgili özellikler ve ilgili yolaklar (Conway et al. 2018)

PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerini içeren 9p24.1 bölgesinin amplifikasyonunun yakın zamanda Hodgkin lenfomada yüksek anti-PD-L1 yanıt oranı için biyolojik bir belirteç olduğu bulunmuştur. Ayrıca, PD-L1 ekspresyonu, yalnızca doğrudan PD-L1'in amplifikasyonu yoluyla değil aynı zamanda daha aktif bir JAK/STAK yolu ile de dolaylı olarak arttırıldığını bildirmişlerdir (Şekil 2.7.) (Conway et al. 2018; Inoue et al. 2016).

JAK/STAT sinyali, interferon gama (IFN) gibi enflamatuar sitokinlere yanıt olarak PD-L1'in upregülasyonunda önemli kabul edilmektedir. PD-L1 geninin kendi amplifikasyonuna ek olarak JAK2 geninin amplifikasyonu birlikte JAK/STAT sinyalini arttırılmasıyla beraber PD-L1 protein ekspresyonunu da arttırdığını bildirmişlerdir. JAK2 aktivitesinin sadece klasik JAK/STAT yolu üzerinden PD-L1'in transkripsiyonel aktivastonuna yol açmakla kalmayıp PD-L1'in taşınmasını da kontrol ettiğini göstermişlerdir (Seiichi Ikeda et al. 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Glioblastoma doku örnekleri ile düşük dereceli glial tümör dokuları arasında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen kopya sayılarında farklılık olup olmadığının belirlenmesi, tümör gradeleri ve gen ekspresyonları ile ilişkilerinin ortaya konması amacıyla gerçekleştirilen çalışmamızda, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Beyin cerrahisi Anabilim Dalı tarafından opere edilen glial tümör örneklerinin Patoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilen histopatolojik analizleri ile GBM, düşük dereceli beyin tümörü (pilositik astrositom, diffüz astrositom, anaplastik astrositom) tanısı alan örneklerin parafine gömülü (FFPE) kesitlerinde Floresan In situ Hibridazasyon (FISH) yöntemi ile genlerin genomik kopya sayıları, gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile de gen ekspresyonları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Sitogenetik ve Moleküler seksiyonlarında analiz edilmiştir. Çalışma için, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulunun, 26.01.2021 tarih ve 11 numaralı kararıyla onay alınmıştır.

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamızda olgu ve kontrol grubu sayılarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen güç analizi, Pass 11 paket programı ile Zeng ve ark. tarafından yapılan ‘‘Expression of programmed cell death-ligand 1 and its correlation with clinical outcomes in gliomas’’ adlı çalışmada geçen PD-L1 ekspresyon oranı kullanılarak tek oran için güven aralığı yaklaşımı ile en küçük örneklem büyüklüğü hesaplanmıştır. %95 güven aralığında hasta ve kontrol gruplarında toplamda en az 47 hastanın çalışmaya dahil edilmesi uygun bulunmuştur (Zeng et al. 2016). Çalışmamızda GBM tanısı almış hastalardan 27 FFPE doku örneği ve kontrol grubunu oluşturan düşük gradeli glial tümörlü olgulardan 20 FFPE doku örneğinde PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin genomik kopya sayısı değişimleri FISH yöntemi ile ve ilgili genlerin ekspresyon paternlerini değerlendirmek için ise RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında olgulara ait kesitlerin dahil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda özetlenmiştir;

Hasta grubuna ilişkin örneklerin dahil edilme kriterleri:

1. 18 yaş ve üzeri GBM tanısı nedeniyle opere edilen olguların tümör kesitleri
2. Patoloji Anabilim Dalı tarafından yönlendirilen doku kesitinin en az %70 kadarında tümör bulunması

Hasta grubu dahil edilmeme kriterleri:

1. 18 yaş altı olgulara ait tümör örnekleri
2. Diğer beyin tümörü türleri (Astrositoma, Oligodendrioglioma, Ependimom, Meningiom)'ne sahip olan hastalar
3. Farklı kanser tanısı almış hastalar (Lenfoma, Akciğer kanseri vb.)
4. Otoimmün hastalık (diyabet, kardiyomiyopati, lupus) tanısı alan olgular
5. Kesit tümör oranı <%70 olan örnekler

Kontrol grubu dahil edilme kriterleri:

1. Pilositik astrositom, anaplastik astrositom, diffüz astrositom tanısı almış olgulara ait tümör örnekleri

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan aletler

- Vorteks (DLAB MX-S)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415 C)
- Denatürasyon Cihazı (ThermoBrite ABBOTT MOLECULAR Leica)
- Etüv (WTC BINDER)
- Su Banyosu (Nükleon)
- Floresan mikroskop (Nikon ECLIPSE 80i)
- Floresan mikroskop (OLYMPUS BX-61)
- Image Analyser (Cytovision 3.93)
- Vorteks (Heidolph)
- Mikrosantrifüj (ISOLAB/LW5E001778)

- Thermal Block (Bio TDB-120 BIOSAN)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Polimeraz Zincir Reaksiyon Cihazı (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700)
- Roche Light Cycler 480
- Mikropipet
- Pipet seti (Gilson)
- Kronometre

3.2.2. Kullanılan malzemeler

- Lam (pozitif şarjlı)
- Pepsin solüsyonu
- Distile su
- Ethanol
- Sodyum Salin Sitrat (SSC)
- Lamel (24 mm × 24 mm)
- Rubber cement (Fixogum Rubber Cement)
- DAPI
- VECTASHİELD preperat yüzey koruyucu
- Tween 20
- İmmersiyon yağı
- Ksilen
- 14,3 M Beta Merkaptoetanol
- Lizis Buffer
- PBS
- Proteinaz K
- Buffer P
- Kloroform
- Wash Buffer 1
- Wash Buffer II
- Nükleaz Free Su

- Eppendorf tüp (1,5 ml)
- Toplama Tüpü (2 ml) (QIAGEN)
- Spin Kolon (QIAGEN)
- High Capacity cDNA Reverse Transkiription Kit (THERMO)
- SYBR Green Master Mix (THERMO)
- Primer+ kontrol geni (PD-L1, PD-L2, JAK2 + β-AKTİN)

3.2.3. Kullanılan problar

- SPEC CD274/PCD1LG2/CEN9 Dual Color Prob (ZYTOVISION) (CD274, PDCD1LG2: Y Cen 9 : K)
- JAK2 (9p24) BA Prob (KREATECH) (JAK2: sarı füzyon sinyali)

3.3. Yöntem

3.3.1. FISH analizi

Glioblastoma ve kontrol grubu (grade 1, 2, 3) olgularına ait en az %70 tümör içeren 4µ'luk 47 adet FFPE doku kesitleri Patoloji Anabilim Dalı tarafından deparafinize edilerek Anabilim Dalımız moleküler sitogenetik seksiyonuna ulaştırılmıştır. FISH analizleri, GBM ve kontrol grubu (pilositik astrositom (grade 1), diffüz astrositom (grade 2), anaplastik astrositom (grade 3)) doku kesitlerinde gerçekleştirilmiş olup, PD-L1 ve PD-L2 genleri için SPEC CD274, PDCD1LG2/CEP9 Dual Color Probu (ZytoLight) ve JAK2 geni için de JAK2 (9p24) Break apart iki renkli prob (Kreatech) kullanılmıştır.

3.3.1.1. Preperatların ön yıkanması

- Lam üzerinde bulunan 4µ kalınlığındaki deparafinize doku örnekleri üzerine proteaz enzim olan pepsin (Leica) eklenerek 3,5 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiştir.
- Etüvden çıkartılan doku örnekleri distile suda 1 dakika bekletilmiştir.
- Preperatlar sırasıyla 2×SSC solüsyonunda 5 dakika, %70, %85 ve %100'lük alkol serisinden ikişer dakika olmak üzere geçirilerek dehidre edilmiştir. Preperatların ön yıkanmasında kullanılan solüsyonlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Preperatların Ön Yıkama Solüsyonları

2XSSC solüsyonu	20xSSC Distile su	20 ml 180 ml
%70 alkol solüsyonu	Ethanol Distile su	140 ml 60 ml
%85 alkol solüsyonu	Ethanol Distile su	170 ml 30 ml
%100 alkol solüsyonu	Ethanol	200 ml

3.3.1.2. Denatürasyon ve hibridizasyon

- Ön yıkaması tamamlanan preperatlarda hedef doku örneklerinin üzerine prob (4 µl) damlatılarak 24x24 mm'lik lamel kapatılmıştır.
- Lamel çevresi lastik yapışkan (rubber cement) ile izole edilmiştir.
- Hychrome hibridizasyon cihazında 75ºC'de 10 dakika süreyle preperat ve prob denatürasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Denatürasyon işleminden sonra preperatlar, 37ºC'lik etüv içerisinde nemli ortamda bir gece boyunca hibridizasyona bırakılmıştır.

3.3.1.3. Hibridizasyon sonrası yıkamalar

- Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA'sının ortamdan uzaklaştırılması, tam komplementer tümör DNAsı ile prob DNAsının sabit hale getirilmesi hedeflenmektedir. Bu doğrultuda, hibridizasyon sonrası, preperatlar etüvden çıkarılıp, lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi temizlenmiş, preperatlar üzerindeki lameller oda ısısındaki 2×SSC solusyonu içerisinde hafifçe çalkalanarak çıkarılması sağlanmıştır.
- Daha sonra preperatlar. 0,4×SSC solüsyonu içeresinde 72ºC'de 2 dakika, 37 ºC 2×SSC/Tween 20 solüsyonunda da 1 dakika bırakılmışlardır. Hibridizasyon sonrası yıkamalarda kullanılan solüsyonlar Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

0.4XSSC Solüsyonu

0.4XSSC	**4 ml**
Distile su	**196 ml**

2XSSC/Tween-20 Solüsyonu

2XSSC	**20 ml**
Distile su	**180 ml**
Tween 20	**100 µl**

3.3.1.4. Hibridize olan bölgelerin görünür kılınması

- Bu aşamada preperatlar 2xSSC/DAPI (stok) solüsyonunda iki dakika bekletilerek hücre yüzey boyamaları gerçekleştirilmiştir.
- Süre sonunda, floresan işaretli prob hibridizasyon bölgelerindeki floresan ışığın kaybolmasını engellemek amacıyla preperatlar üzerine Vectashield damlatılıp hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek preperatlar lamel ile kapatılmıştır.
- Analiz aşamasına kadar preperatlar -20ºC'de bekletilmiştir. Bölgelerin görünür kılınması için kullanılan solüsyon Tablo 3.3.'de yer almaktadır.

Tablo 3.3. DAPI solüsyonu

DAPI/Antifade Solüsyonu	
2XSSC	**20 ml**
DAPI	**3.5 µl**
Distile su	**80 ml**

3.3.1.5. Preperatların mikroskopta incelenmesi

- Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda kullanılan probların işaretlenmiş olduğu floresan moleküllerin dalga boylarına uygun filtreler aracılığıyla incelenmiştir.
- Floresan mikroskoba bağlı görüntü analiz sistemi (Image Analyser (Cytovision 3.93)) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri incelenmiş, fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.3.1.6. FISH sinyal analizi

- Her bir doku örneğinde, ilgili genlerin pozitif veya negatif olarak tanımlanabilmesi için en az 100 hücre, gen/kontrol sinyal oranları açısından değerlendirilmiştir.
- PD-L1, PD-L2 analizi için, gen kopya sayısının sentromer kopya sayısına oranının ≥2.0 olması durumunda amplifikasyon pozitif olarak kabul edildi (Inoue et al., n.d.).
- PD-L1,PD-L2/CEP9 oranı ≥4.0 yüksek seviye amplifikasyon, ≥ 2.0 ve ≤ 4.0 ise düşük seviye amplifikasyon olarak kabul edilirken, 1:1 sinyal oranına sahip fakat her probun ikiden fazla kopyası olan hücreler ise; 9p için polizomi olarak kabul edildi(Straub et al., 2016).

3.3.2. Gen ekspresyon analizleri

3.3.2.1. RNA izolasyonu

3.3.2.1.1. Parafine gömülü dokudan RNA izolasyonu

3.3.2.1.1.1. Deparafinizasyon ve lizis aşaması

8 µ kalınlığındaki parafinize doku örnekleri Patoloji Anabilim Dalı tarafından RNaz içermeyen 1,5 ml'lik eppendorf tüpler içerisinde Anabilim Dalı moleküler seksiyonuna ulaştırılmıştır. Gelen kesitlerde gerçekleştirilen deparafinizasyon işlemlerinden sonra örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda MST Medikal RNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

- Örnekler üzerine 1µ (1000 ml) ksilen eklenerek 1 dakika boyunca vortekslenmiştir.
- 15.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası ksilen alınıp, atılmıştır.
- Bu aşama 2 kez tekrarlanmıştır.
- Her bir örnek üzerine 1µl %96'lık ethanol eklendi ve vortekslenmiştir.
- 15.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası ethanol alınıp, atılmıştır.
- Örnekler üzerine 1µl %70'lik ethanol eklendi, vortekslenmiştir.
- 15.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve ethanol alınıp, atılmıştır.
- Her bir örnek için 500 µl Buffer L ve 10 µl 14,3 M Beta merkaptoetanol içeren Lizis Buffer karışımı hazırlanmıştır.
- Örneklerin üzerine 200 µl PBS, 10 µl Proteinaz K ve 500 µl Lizis Buffer eklenmiştir.
- 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Üzerine 500 µl Buffer P eklendi, iyice vortekslendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir.
- Karışımın üzerine 200 µl Kloroform eklenip, vortekslenmiştir.
- Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.

- Karışım 4ºC'de 12.000× g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 600 µl) yeni bir tüpe aktarılmıştır.

3.3.2.1.1.2. Bağlanma aşaması

- Yeni tüpe aktarılan süpernatantın üzerine 800 µl %96'lık ethanol eklendi ve pipetle karıştırılmıştır.
- Bağlanma solüsyonu ve etanol ilave edilen örnekten 700 µl alınarak toplama tüpleri içindeki silika membran içeren Spin Cartridge tüplere aktarılmıştır.
- 12.000× g'de 30 saniye santrifüj edildi. Spin Cartridge tüpten toplama tüpü içerisine geçen sıvı kısım boşaltılmıştır.
- Örneklerden geriye kalan 700 µl'lik karışım da aynı Spin Cartridge tüplere ilave edildi.
- 12.000× g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası Spin Cartridge tüp toplama tüpü içerisinden alınarak yıkama tüpüne aktarılmıştır.

3.3.2.1.1.3. Yıkama aşaması

- 700 µl Wash Buffer I solüsyonu Spin Cartridge tüp üzerine eklendi. 12.000× g'de 30 saniye santrifüj edildi. Yıkama tüpü içerisine geçen sıvı kısım boşaltılmıştır.
- 600 µl Wash Buffer II solüsyonu Spin Cartridge tüp üzerine eklendi. 12.000× g'de 30 saniye santrifüj edildi. Yıkama tüpü içerisine geçen sıvı kısım boşaltılmıştır.
- Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
- Yıkama tüpü içerisimdeki Spin Cartridge tüp boş olarak 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

3.3.2.1.1.4. Elüsyon aşaması

- Nükleaz free su 56ºC'de ısıtılmıştır.
- Spin Cartridge tüp yıkama tüpünden alınarak 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılmıştır.
- Önceden 56ºC'ye ısıtılan Nükleaz free sudan 20 µl Spin Cartridge tüp üzerine eklenmiştir.

- 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 12.000× g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen RNA örneklerinin absorbansları NanoDrop Spektofotometre ile ölçülmüştür.
- RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 ºC'de saklanmıştır.

Nanodrop cihazı RNA'ların kalite kontrolünü ve miktarlarını belirlemek için kullanılmıştır. Nanodropta RNA'ların ng/µl olarak miktarları belirlenmiş ve ölçüm sonucu, A260/280 ve A260/230 oranı 2 veya daha yüksek olması durumunda RNA kalitesi iyi olarak değerlendirilmiştir.

3.3.2.2. Real Time PCR ile gen ekspresyon analizi

3.3.2.2.1. cDNA sentezi

cDNA, reverse transkriptaz enzimiyle katalizlenen olgun mRNA'dan sentezlenen DNA parçasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirmede tek iplikli mRNA'yı çift iplikli DNA formuna çevirmek için cDNA sentezinin gerçekleşmesi gerekmektedir. İzolasyonu tamamlanan RNA'lardan high-capacity cDNA reverse transcription kit (A.B.T. Dt20) kullanılarak cDNA elde edilmiştir.

Örneklerin nanodroptaki (NanoDrop 1000) 1µL'deki değerleri ölçüldü ve 100 ng'a tamamlanarak; 100 ng'daki µL değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.4. Reverse (ters) transkripsiyon miksi için gerekli reaktifler ve miktarlar

Reaktifler	Hacim
10× RT Buffer	2 µL
25× dNTP Mix (1oo mM)	0.8 µL
10× RT Random Primerler	2 µL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µL
RNase İnhibitör	1 µL
Nükleaz-free H2O	- µL

-

- Tablo 3.4.'deki reaktifler kullanılarak hazırlanan reverse (ters) transkripsiyon miksi (master mix) , çalışılan örnek sayısı ile çarpıldı ve total karışım miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra 1,5 ml'lik eppendorf tüpe konuldu ve primerlerin kırılmaması için çok hafif bir şekilde vortekslenmştir.
- Eppendorf içindeki master mix karışımı her bir tüpe eşit olarak aktarılmıştır.
- 1 örnek için master mix miktarı toplamda 6.8 µL olduğu için her bir örneğin RNA'sı eklendi ve total hacim olan 20 µL'den çıkarılarak, su miktarları hesaplanmıştır.
- Tablo 3.5.'de hazırlanan reaksiyon ortamı termal cycler ile inkübe edildi ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Sentez edilen cDNA örnekleri termal reaksiyon sonrasında kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.5. Reverse (ters) transkriptaz reaksiyon koşulları

Termal cycler aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Aşama I	25°C	10 dakika	1
Aşama II	37°C	120 dakika	1
Aşama III	85°C	5 dakika	1

3.3.2.2.2. RT-PCR protokolü

Dokulardan elde edilen cDNA'lar Thermofisher (THERMO-K0221) Sybr Green Master Mix ile Roche 480-I Real time PCR cihazı kullanılarak analiz edildi. cDNA'lar 96 kuyucuklu DNAse ve RNAse free Plate kullanılarak spesifik primerler ile çoğaltıldı RT-PCR reaktifleri ve gen ifadelerinin analizi için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu şartları sırasıyla Tablo 3.6. ve 3.7.'de verilmiştir.

Tablo 3.6. RT-PCR reaktifleri

Reaktif	Hacim(µL)/reaksiyon
SYBER Green Master Mix	5,0 µL
RT Primer prob F	0,35 µL
RT Primer prob R	0,35 µL
cDNA	2,0 µL
Nükleaz-free su	2,3 µL
Total	10 µL

Hazırlanan karışım (Tablo 3.6), real-time PCR cihazında (Roche 480-I Real time PCR) aşağıda belirtilen koşullarda amplifiye edilerek ekspresyon aşaması gerçekleştirildi.

Tablo 3.7. RT-PCR sıcaklık koşulları

	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Annealing	60	30 saniye	
Melting Curve	60-95	-	1

JAK2, PD-L1 ve PD-L2 genlerine ait amplifikasyon primerleri ve prob dizileri Tablo 3.8.'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve baz çifti uzunlukları

Primer	Dizi	Baz (bp)
JAK2-F	5'-GAG CCT ATC GGC ATG GAA TA-3'	20 bp
JAK2-R	5'-ACT GCC ATC CCA AGA CAT TC-3'	20 bp
PD-L1-F	5'-TAT GGT GGT GCC GAC TAC AA-3'	20 bp
PD-L1-R	5'-TGC TTG TCC AGA TGA CTT CG-3'	20 bp
PD-L2-F	5'-CTC CTG CAT CAT TGC TTT CA-3'	20 bp
PD-L2-R	5'-AAG TGC AAA TGG CAA GCT CT-3'	20 bp

4. BULGULAR

Çalışmamız, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından tanısı konulmuş GBM, düşük dereceli beyin tümörü (pilositik astrositom, diffüz astrositom, anaplastik astrositom) olgularına ait FFPE örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Genetik seksiyonlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubunu 27 glioblastoma ve 20 düşük dereceli beyin tümörü (grade 1, 2, 3) olgu grubu oluşturmuştur.

Çalıştığımız tüm örneklerde FISH analizlerinde en az 100 hücre analiz edilmiş olup, gen/kontrol sinyal oranları açısından değerlendirilmiştir.

4.1. Hasta Grubuna Ait Bilgiler

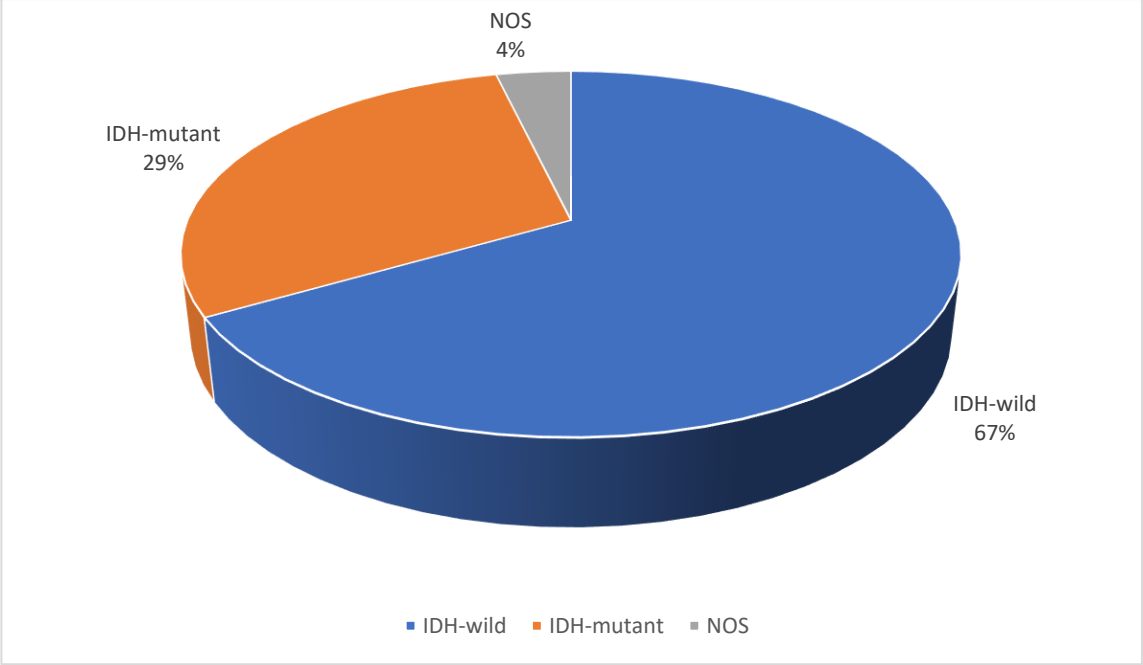
Çalışmamızda, olgu grubunu, GBM tanısı almış 27 olguya ait parafine gömülü doku örnekleri oluşturmuştur. 15 erkek olgunun yaş ortalaması ±58,86, 12 kadın olgunun yaş ortalaması ±63,5 ve toplam 27 olguya ait yaş ortalamasının ±60,92 yıl olduğu tespit edilmiştir. Olgu grubuna ait yaş, cinsiyet, IDH mutasyon durumu ve tanı hakkındaki bilgiler Tablo 4.1.'de yer almaktadır. Olguların IDH mutasyon durumuna ait yüzdeleri Grafik 1.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Glioblastoma olgularına ait cinsiyet, yaş, IDH mutasyon durumu, O.S ve tanı bilgileri

Olgu sayısı	Yaş	Cinsiyet	IDH mutasyon durumu	O.S	Tanı
1	40	Erkek	IDH-wild	-	Glioblastoma
2	42	Erkek	IDH-mutant	-	Glioblastoma
3	85	Kadın	IDH-wild	1 ay	Glioblastoma
4	82	Kadın	IDH-wild	9 ay	Glioblastoma
5	47	Kadın	IDH-mutant	2 ay	Glioblastoma
6	77	Kadın	IDH-wild	1 ay	Glioblastoma
7	48	Kadın	IDH-mutant	12 ay	Glioblastoma
8	65	Erkek	IDH-wild	8 ay	Glioblastoma
9	52	Erkek	IDH-wild	3 ay	Glioblastoma
10	59	Erkek	IDH-wild	5 ay	Glioblastoma
11	71	Kadın	IDH-wild	13 ay	Glioblastoma
12	54	Erkek	IDH-mutant	-	Glioblastoma
13	61	Erkek	IDH-mutant	10 ay	Glioblastoma
14	59	Erkek	IDH-mutant	10 ay	Glioblastoma
15	53	Erkek	IDH-mutant	1 ay	Glioblastoma
16	84	Erkek	IDH-wild	4 ay	Oligodendroglial komponent içeren Glioblastoma
17	62	Kadın	IDH-wild	2 ay	Glioblastoma
18	65	Erkek	IDH-wild	6 ay	Glioblastoma
19	69	Kadın	IDH-wild	5 ay	Glioblastoma

Tablo 4.1. Glioblastoma olgularına ait cinsiyet, yaş, IDH mutasyon durumu, O.S ve tanı bilgileri (devam ediyor)

20	47	Kadın	IDH-wild	21 ay	Oligodendroglial komponent içeren Glioblastoma
21	46	Kadın	IDH-wild	15 ay	Glioblastoma
22	71	Erkek	IDH-wild	9 ay	Glioblastoma
23	66	Kadın	NOS	2 ay	Glioblastoma
24	62	Kadın	IDH-wild	3 ay	Glioblastoma
25	56	Erkek	IDH-mutant	7 ay	Glioblastoma
26	60	Erkek	IDH-wild	16 ay	Oligoastrositom zemininde gelişmiş Glioblastoma
27	62	Erkek	IDH-wild	8 ay	Glioblastoma



Grafik 1. Glioblastoma olgularında IDH mutasyon durumu yüzdesi

4.2. Kontrol Grubuna Ait Bilgiler

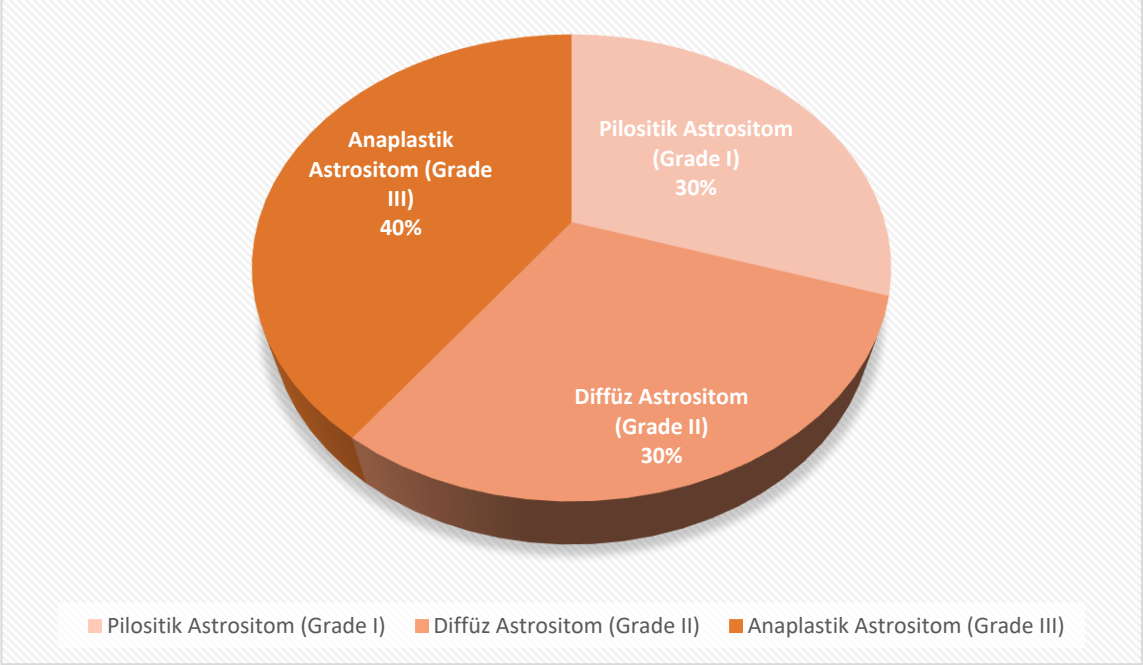
Çalışmamızın kontrol grubunu, 1., 2., ve 3. derece glial tümör tanısı almış 20 olguya ait parafine gömülü doku örnekleri oluşturmuştur. 12 erkek olgunun yaş ortalaması ±44,3, 8 kadın olgunun yaş ortalaması ±45,25 ve toplam 20 olgunun yaş ortalaması ise ±41,2 olarak saptanmıştır. Kontrol grubuna ait cinsiyet, yaş, tümör dereceleri ve tanı hakkındaki bilgiler Tablo 4.2.'de yer almaktadır. Kontrol grubu olguların 6'sı (%30) pilositik astrositom (Grade 1), 6'sı (%30) diffüz astrositom (Grade 2) ve, 8'i (%40) anaplastik astrositom (Grade 3)'du. Olgu sayısı ile düşük dereceli glial tümörlü bireylerin tümör dereceleri Grafik 2.'de yer almaktadır.

Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait cinsiyet, yaş, tümör dereceleri, O.S ve tanı bilgileri

Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Tümör derecesi	O.S	Tanı
28	53	Erkek	Grade 3	45 ay	Anaplastik astrositom
29	50	Kadın	Grade 3	92 ay	Anaplastik astrositom
30	73	Erkek	Grade 3	7 ay	Anaplastik astrositom
31	60	Erkek	Grade 3 (IDH-mutant)	20 ay	Anaplastik astrositom
32	57	Kadın	Grade 3	1 ay	Anaplastik astrositom
33	50	Kadın	Grade 2	110 ay	Diffüz astrositom
34	78	Erkek	Grade 3	12 ay	Anaplastik astrositom
35	17	Erkek	Grade 2	-	Diffüz astrositom
36	45	Kadın	Grade 2	-	Diffüz astrositom NOS
37	43	Erkek	Grade 3	8 ay	Anaplastik astrositom
38	55	Erkek	Grade 3	-	Anaplastik astrositom
39	7	Kadın	Grade 1	-	Pilositik Astrositom

Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait cinsiyet, yaş, tümör dereceleri, O.S ve tanı bilgileri (devam ediyor)

40	47	Erkek	Grade 1	-	Pilositik Astrositom
41	54	Erkek	Grade 1	-	Pilositik Astrositom
42	65	Kadın	Grade 2	5 ay	Diffüz Astrositom
43	14	Erkek	Grade 1	-	Pilositik Astrositom
44	17	Kadın	Grade 1	-	Pilomikaoid değişiklikler içeren Pilositik Astrositom
45	17	Erkek	Grade 1	-	Pilositik Astrositom
46	21	Erkek	Grade 1	-	Pilositik Astrositom
47	71	Kadın	Grade 2	47 ay	Miksoid değişiklik gösteren Oligodendroglioma



Grafik 2. Düşük dereceli glial tümör dereceleri ve olgu sayısı dağılımı

4.3. FISH Analizine Ait Bulgular

Çalışmamızda, glioblastoma ve grade 1, 2, 3 glial tümörlü olgulara ait FFPE örnekleri çalışılmış olup, her olgu için PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin kopya sayısı değişiklikleri FISH yöntemi ile değerlendirilmiştir.

4.3.1. PD-L1 ve PD-L2 genlerinin kopya sayısı değişiklikleri

FISH sonuçları 47 olgunun 44'ünde (%93,61) değerlendirildi. Fakat 3 olguda prob sinyallerinin net olmaması ve/veya post-hibridizasyon aşamasındaki sorunlar nedeniyle FISH analizi gerçekleştirilemedi. Çalışmamız sonucunda 27 glioblastoma örneğinin 11'i (%40,74) PD-L1 ve PD-L2 gen bölgeleri açısından amplifikasyon pozitif olarak değerlendirildi. Bu örneklerin 8'i (olgu 3, 6, 8, 11, 18, 21, 24, 26 27) IDH-wild tip, 2'si (olgu 13, 14) IDH-mutant tip glioblastomadır. Amplifikasyon saptanan olguların 6'sında polizomi, monozomi ve PD-L1/2 gen delesyonu gibi aberasyonların da eşlik ettiği gözlenmiştir. Ek olarak, olgu 4 ve olgu 17'de sırasıyla %6 , %8,41 oranında PD-L1/2 genlerinin her iki allelinde delesyon olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Glioblastoma olgularına ait PD-L1/PD-L2 genleri için FISH sonuçları

Olgu sayısı	Tanı	PD-L1/PD-L2 kopya sayısı değişiklikleri			
		Amplifikasyon (%)	Polizomi (%)	Monozomi (%)	PDL1/2 delesyonu (%)
1	Glioblastoma	0	22,78	4,64	0
2	Glioblastoma	0	37,5	4,0	6,81
3	Glioblastoma	1,14	8,0	5,14	3,42
4	Glioblastoma	0	14,28	0	74,0
5	Glioblastoma	0	63,63	10,0	14,04
6	Glioblastoma	3,41	13,0	10,73	7,31
7	Glioblastoma	0	8,61	4,78	1,43
8	Glioblastoma	2,46	9,46	5,76	7,81
9	Glioblastoma	0	5-6	2,0	0
10	Glioblastoma	0	32,11	12,0	27,52
11	Glioblastoma	60-70	45,89	3,0	0
12	Glioblastoma	0	2,95	8,87	68,04
13	Glioblastoma	1,69	22,45	9,0	3,38
14	Glioblastoma	1,81	13,93	7,0	5,45
15	Glioblastoma	0	50-60	5,0	0
16	Glioblastoma	-	-	-	-
17	Glioblastoma	0	0	6,43	35,0
18	Glioblastoma	10,43	15,0	0	0
19	Glioblastoma	0	2,67	3,0	0
20	Glioblastoma	0	0	20,93	4,65
21	Glioblastoma	1,58	25,39	9,52	9,52
22	Glioblastoma	0	10,0	7,5	0
23	Glioblastoma	0	0	10,0	5,0
24	Glioblastoma	50-60	25-30	0	1,57

Tablo 4.3. Glioblastoma olgularına ait PD-L1/PD-L2 genleri için FISH sonuçları (devam ediyor)

25	Glioblastoma	0	50-60	0	0
26	Glioblastoma	8,51	0	19,14	6,38
27	Glioblastoma	1,26	13,05	0,94	1,89

Çalışmamızın kontrol grubunu oluşturan 6 pilositik astrositom (grade 1), 6 diffüz astrositom (grade 2) ve 8 anaplastik astrositom (grade 3) olmak üzere toplam 20 olgunun 14'ünde (%70) PD-L1 ve PD-L2 gen bölgeleri açısından amplifikasyon pozitif olarak saptanmıştır. Amplifikasyon saptanan 14 olgunun 6'sı yüksek seviye amplifikasyon gösterirken, 8 olgunun ise düşük seviye amplifikasyon gösterdiği gözlenmiştir. 6 anaplastik astrositom olgusunun 4'ünde (4/6, (%66,66) (olgu 29,30, 32, 34) yüksek seviye amplifikasyon gözlenirken, 2 diffüz astrositom (olgu 36, 47) olgusunda da yüksek seviye amplifikasyon gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.4). PD-L1,PD-L2/CEP9 oranı ≥4.0, yüksek seviye amplifikasyon olarak kabul edilmiştir (Straub et al. 2016). Yüksek seviye amplifikasyon gösteren olguların hiç birinde PD-L1/2 delesyonu gözlenmemiştir. Kontrol grubuna ait sonuçlar Tablo 4.4.'te, olgulara ait FISH görüntüleri ise Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol grubuna ait PD-L1/PD-L2 genleri için FISH sonuçları

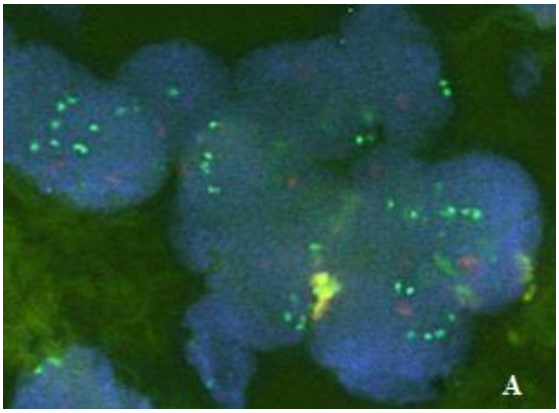
Olgu sayısı	Tanı	PD-L1/PD-L2 kopya sayısı değişiklikleri			
		Amplifikasyon (%)	Polizomi (%)	Monozomi (%)	PDL1/2 delesyonu (%)
28	Anaplastik astrositom	6,41	14,28	5,0	20,37
29	Anaplastik astrositom	5,71 (yüksek seviye amp.) 24,28 (düşük seviye amp.)	37,14	10,0	0
30	Anaplastik astrositom	70-80 (yüksek seviye amp.)	30-40	0	0
31	Anaplastik astrositom	11,67	43,79	10,21	0
32	Anaplastik astrositom	10,71 (yüksek seviye amp.) 16,0 (düşük seviye amp.)	37,5	16,07	0
33	Diffüz astrositom	13,57	25,71	13,01	0
34	Anaplastik astrositom	11,25 (yüksek seviye amp.)	6,57	27,63	0
35	Diffüz astrositom	3,01	9,63	23,49	0
36	Diffüz astrositom NOS	15,68(yüksek seviye amp.)	18,94	17,89	0
37	Anaplastik astrositom	0	0	2,73	0

Tablo 4.4. Kontrol grubuna ait PD-L1/PD-L2 genleri için FISH sonuçları

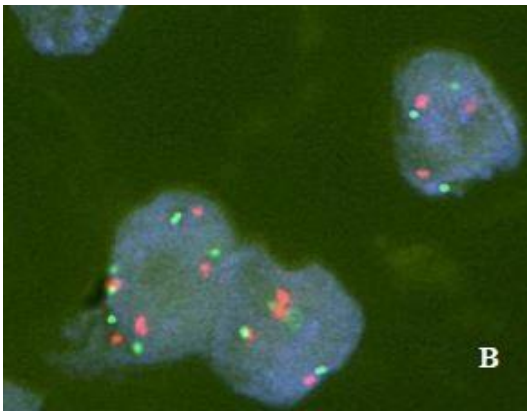
(devam ediyor)

38	Anaplastik astrositom	-	-	-	-
39	Pilositik astrositom	0	10,28	20,57	9,14
40	Pilositik astrositom	0	0	10,0	0
41	Pilositik astrositom	-	-	-	-
42	Pilositik astrositom	30-40	14,0	15,7	3,70
43	Pilositik astrositom	0	10,0	15,0	6,0
44	Pilositik astrositom	4,80	5,76	16,34	0
45	Pilositik astrositom	5,30	38,63	18,0	2,27
46	Pilositik astrositom	9,78	26,08	12,5	3,80
47	Pilositik astrositom	19,22 (yüksek seviye amp.)	5,76	13,46	0

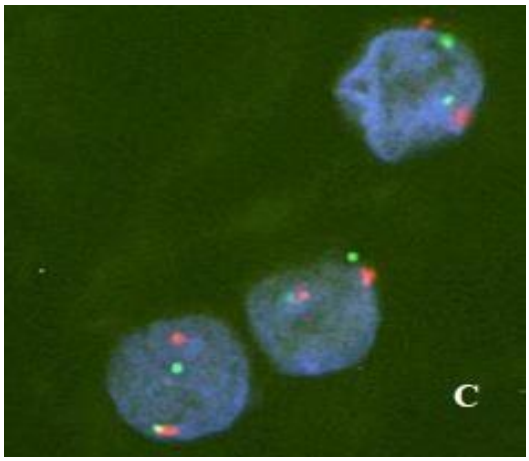
Amplifikasyon



Polizomi



Dizomi



Şekil 4.1. PD-L1, PD-L2 genleri için FISH yöntemi ile saptanan kopya sayısı değişiklikleri. **(A)** PD-L1, PD-L2 gen bölgesinde yüksek seviye amplifikasyon saptanan olgu 30'a ait FISH görüntüsü **(B)**, PD-L1, PD-L2 gen bölgesinde polizomi saptanan olgu 11'e ait FISH görüntüsü **(C)**, olgu 45'e ait normal FISH görüntüsü

4.3.2. JAK2 gen bölgesi kopya sayısı değişiklikleri

47 olgunun 42'si (%89,36) JAK2 gen kopya sayısı değişimleri açısından değerlendirilirken, 5 olgu prob sinyallerinin net olmaması ve/veya post-hibridizasyon aşamasındaki sorunlar nedeniyle gen kopya sayısı değişimleri açısından değerlendirilemedi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre glioblastoma olgularının 24'ünde en az

bir aberasyon görülürken, çalışmamızda elde edilen FISH sonuçlarına göre 27 glioblastoma olgusundan 9'u atipik sinyal paterni açısından pozitif olarak saptanmıştır (Şekil.4.2.(A)). 24 olguda [24/27, (%88,88)] JAK2 gen bölgesi açısından monozomi saptanmış olup, 9 olguda ise atipik sinyal paterni gözlenmiştir.

Kontrol grubunu oluşturan 20 olgunun 8'i (%40) JAK2 gen bölgesi için yeniden düzenlenme pozitif saptanmıştır. Atipik sinyal paterni gözlenen olguların 3'ünün anaplastik astrositom, 5'inin ise pilositik astrositom olduğu belirlenmiştir. Atipik sinyal paterni (Yeniden Düzenlenme +) aberasyonlarına eşlik eden polizomi ve monozomi saptanan olgular 45, 46 ve 47 olarak belirlenmiştir. Olgu 30 bütün parametreler açısından negatif olarak belirlenirken, yüksek oranda yeniden düzenlenme açısından pozitif olarak saptanmıştır (%81). Tüm çalışma grubu olgularının JAK2 gen bölgesi kopya sayısı değişimlerine ait FISH sonuçları, Tablo 4.5. ve 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Glioblastoma olgularına ait JAK2 gen bölgesi için FISH sonuçları

Olgu sayısı	**Tanı**	**JAK2 kopya sayısı değişiklikleri**		
		Polizomi (%)	**Monozomi (%)**	**Atipik sinyal paterni (%)**
1	Glioblastoma	13,37	6,0	2,43
2	Glioblastoma	2,75	26,60	0
3	Glioblastoma	5,95	9,0	0
4	Glioblastoma	0	80,0	1,68
5	Glioblastoma	25,0	13,0	0
6	Glioblastoma	0	16,66	0
7	Glioblastoma	0	12,5	6,0
8	Glioblastoma	12,35	7,21	5,15
9	Glioblastoma	0	30,0	0
10	Glioblastoma	5,45	40,90	0
11	Glioblastoma	45-50	0	0

Tablo 4.5. Glioblastoma olgularına ait JAK2 gen bölgesi için FISH sonuçları

(devam ediyor)

12	Glioblastoma	0	42,70	0
13	Glioblastoma	0	16,0	0
14	Glioblastoma	8,0	17,0	0
15	Glioblastoma	30-40	10-15	0
16	Glioblastoma	-	-	-
17	Glioblastoma	-	-	-
18	Glioblastoma	45,85	11,0	2,92
19	Glioblastoma	2,55	3,0	1,27
20	Glioblastoma	6,27	51,0	0
21	Glioblastoma	41,50	8,49	12,26
22	Glioblastoma	0	30-40	0
23	Glioblastoma	-	-	-
24	Glioblastoma	39,79	3,0	0
25	Glioblastoma	0	20-30	0
26	Glioblastoma	0	23,52	5,88
27	Glioblastoma	8,55	3,0	2,63

Tablo 4.6. Kontrol grubu olgularına ait JAK2 gen bölgesi için FISH sonuçları

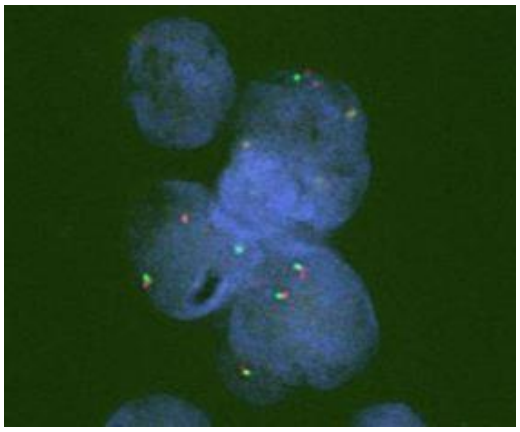
Olgu sayısı	Tanı	JAK2 kopya sayısı değişiklikleri		
		Polizomi (%)	Monozomi (%)	Atipik sinyal paterni (%)
28	Anaplastik astrositom	16,57	22,80	19,51
29	Anaplastik astrositom	50,47	8,57	19,20
30	Anaplastik astrositom	0	0	81,0
31	Anaplastik astrositom	57,6	11,95	0
32	Anaplastik astrositom	58,28	13,60	0
33	Diffüz astrositom	13,41	19,51	0
34	Anaplastik astrositom	6,7	20,12	0
35	Diffüz astrositom	5,07	17,76	0
36	Diffüz astrositom NOS	19,54	15,0	0
37	Anaplastik astrositom	0	0	0
38	Anaplastik astrositom	-	-	-

Tablo 4.6. Kontrol grubu olgularına ait JAK2 gen bölgesi için FISH sonuçları

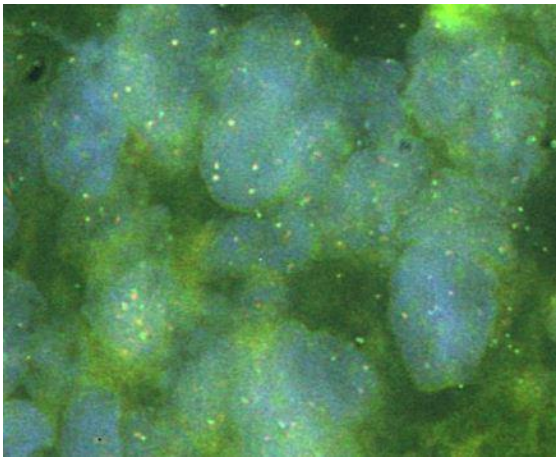
(devam ediyor)

39	**Pilositik astrositom**	**0**	**18,0**	**0**
40	Pilositik astrositom	0	0	0
41	Pilositik astrositom	-	-	-
42	Pilositik astrositom	37,72	0	23,58
43	Pilositik astrositom	0	30-40	0
44	Pilositik astrositom	0	30,0	4,0
45	Pilositik astrositom	29,89	8,0	10,32
46	Pilositik astrositom	27,87	14,0	15,0
47	Pilositik astrositom	4,12	21,64	4,12

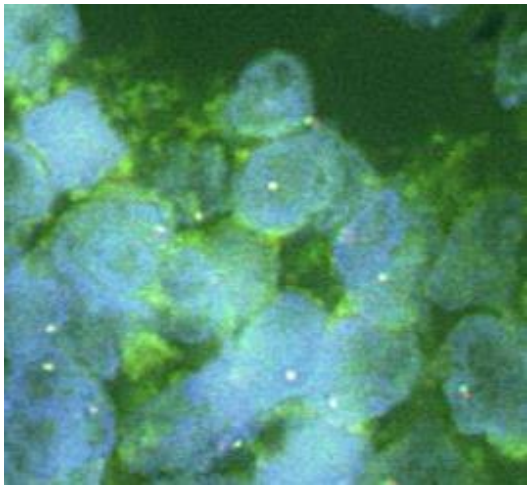
Atipik sinyal paterni Y.D +



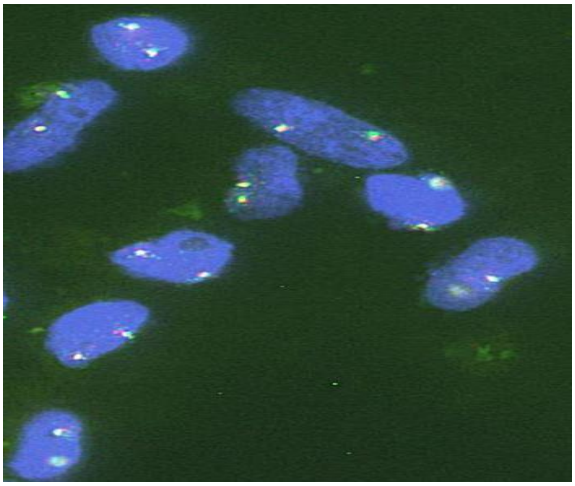
Polizomi



Monozomi



Dizomi



Şekil 4.2. JAK2 gen bölgesi için FISH yöntemi ile saptanan kopya sayısı değişiklikleri.

(A) Yeniden düzenleme pozitif olarak saptanan olgu 42'ya ait FISH görüntüsü

(B), JAK2 geni için polizomi saptanan olgu 11'e ait FISH görüntüsü

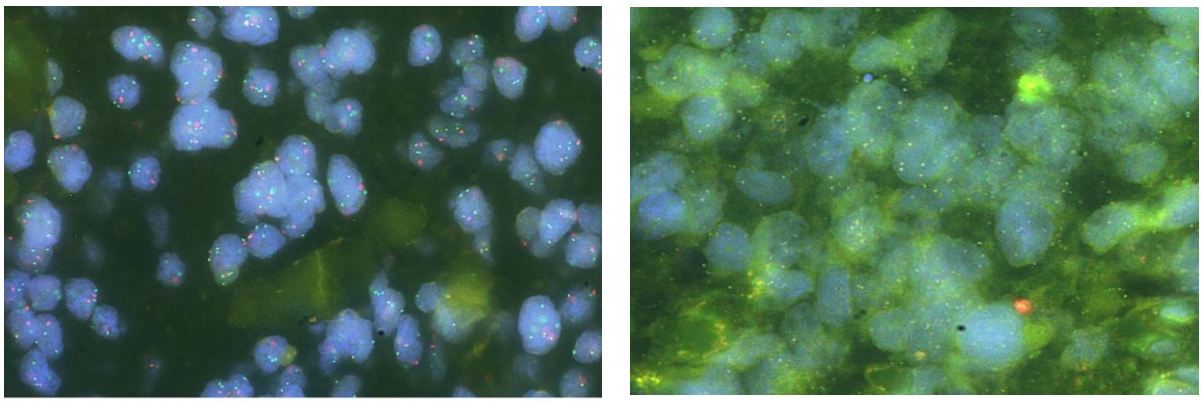
(C), monozomi saptanan olgu 13'e ait FISH görüntüsü (D), olgu 19'a ait normal FISH görüntüsü

4.3.3. PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genleri arasındaki kopya sayısı değişikliklerinin ilişkisi

27 glioblastoma olgusunun 5'inde [5/27, (%18,51)] (olgu 8, 18, 21, 26, 27) PD-L1/2 gen bölgesi için sinyal sayısında artış (amplifikasyon) ve JAK2 gen bölgesi için sinyal paterninde yeniden düzenlenme saptanmış olup, PD-L1/2 ve JAK2 genleri açısından amplifikasyonve yeniden düzenlenme gösterdiği saptanmıştır. Kontrol grubunda yer alan 8 olguda da (olgu 28, 29, 30, 42, 44, 45, 46, 47) ilgili gen bölgelerinin amplifikasyon/ yeniden düzenlenme açısından pozitif olduğu saptanmıştır. PD-L1/2 ve JAK2 genlerinin FISH görüntüleri Şekil 4.3.'te verilmiştir.

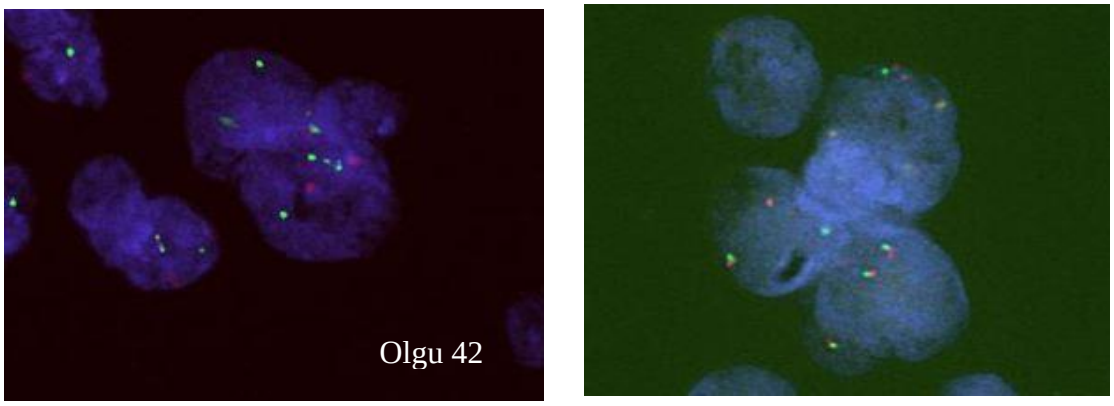
Çalışmamız sonucunda, PD-L1/2 gen bölgelerinde yüksek seviye amplifikasyon gösteren 2 olgunun (olgu 30 ve 42) JAK2 gen bölgesi kopya sayısı değişimleri açısından atipik sinyal paterni gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

PD-L1/2 amplifikasyonu **JAK2 amplifikasyonu**

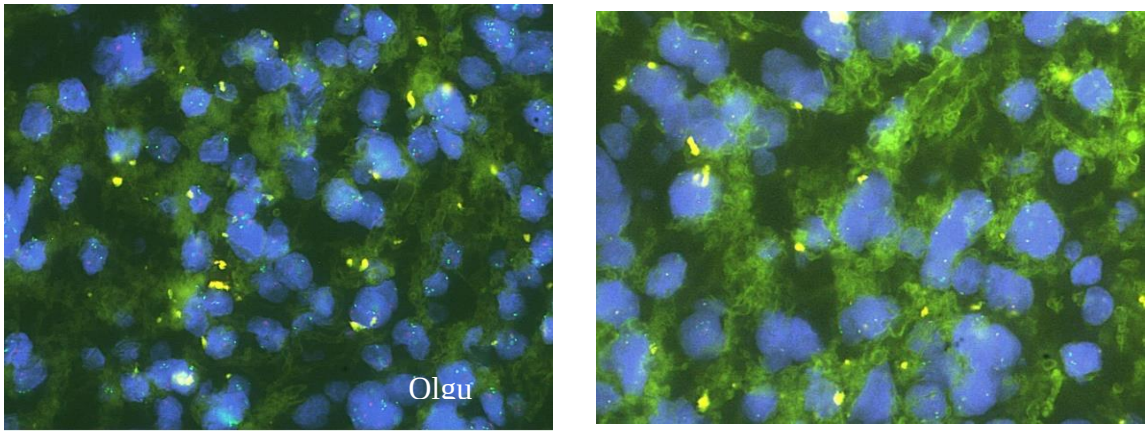


Şekil 4.3. Olgu 11'e ait PD-L1/2 ve JAK2 gen bölgeleri için FISH yöntemiyle saptanan co-amplifikasyon görüntüsü

PD-L1/2 amplifikasyonu **JAK2 atipik sinyal paterni (Y.D +)**



PD-L1/2 amplifikasyonu **JAK2 atipik sinyal paterni (Y.D +)**



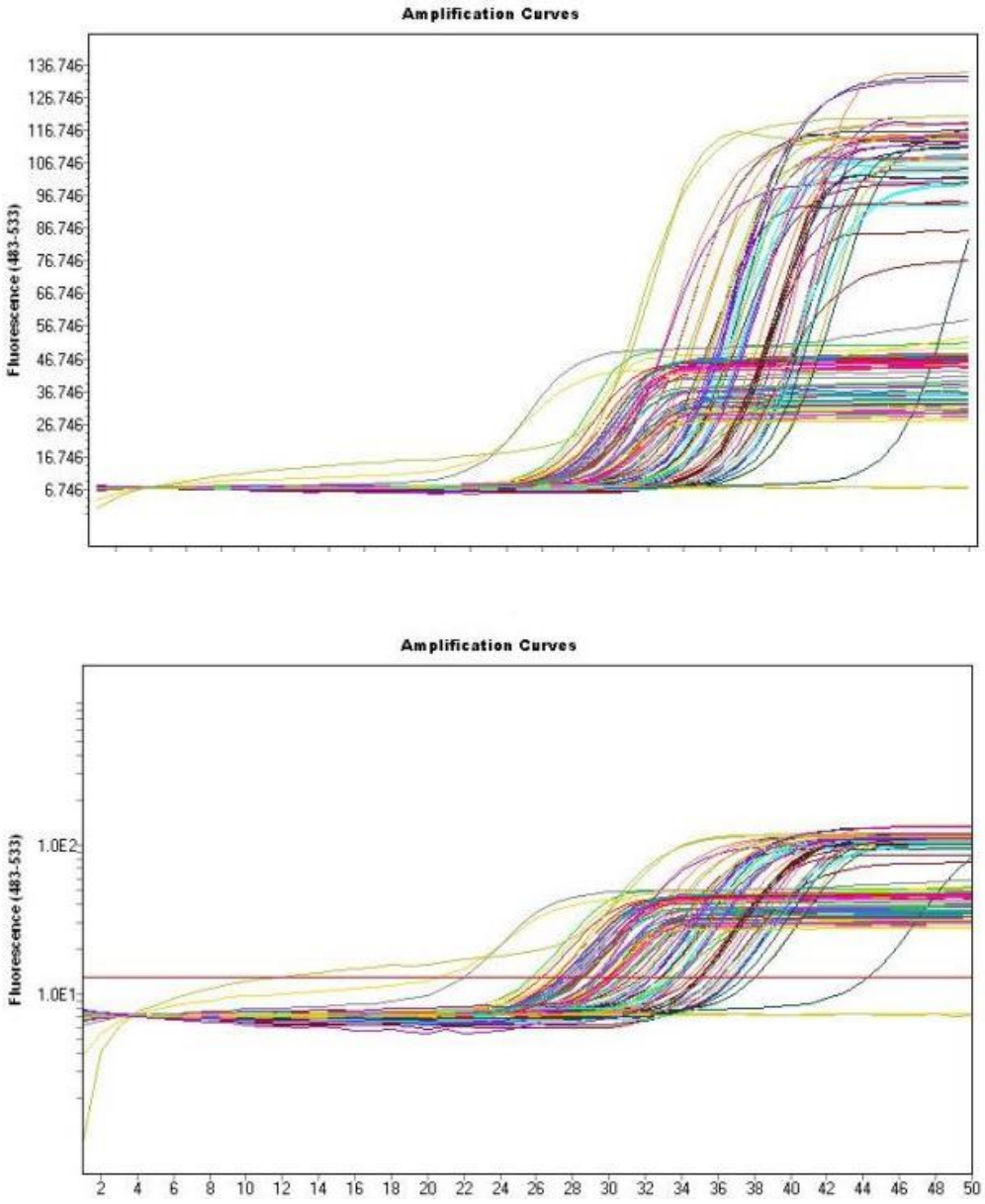
Şekil 4.4. Olgu 42 ve 30'a ait PD-L1/2 gen bölgelerinin amplifikasyon ve JAK2 gen bölgesinin yeniden düzenlenme pozitif olan FISH görüntüleri

4.4. Gen Ekspresyon Analizine Ait Bulgular

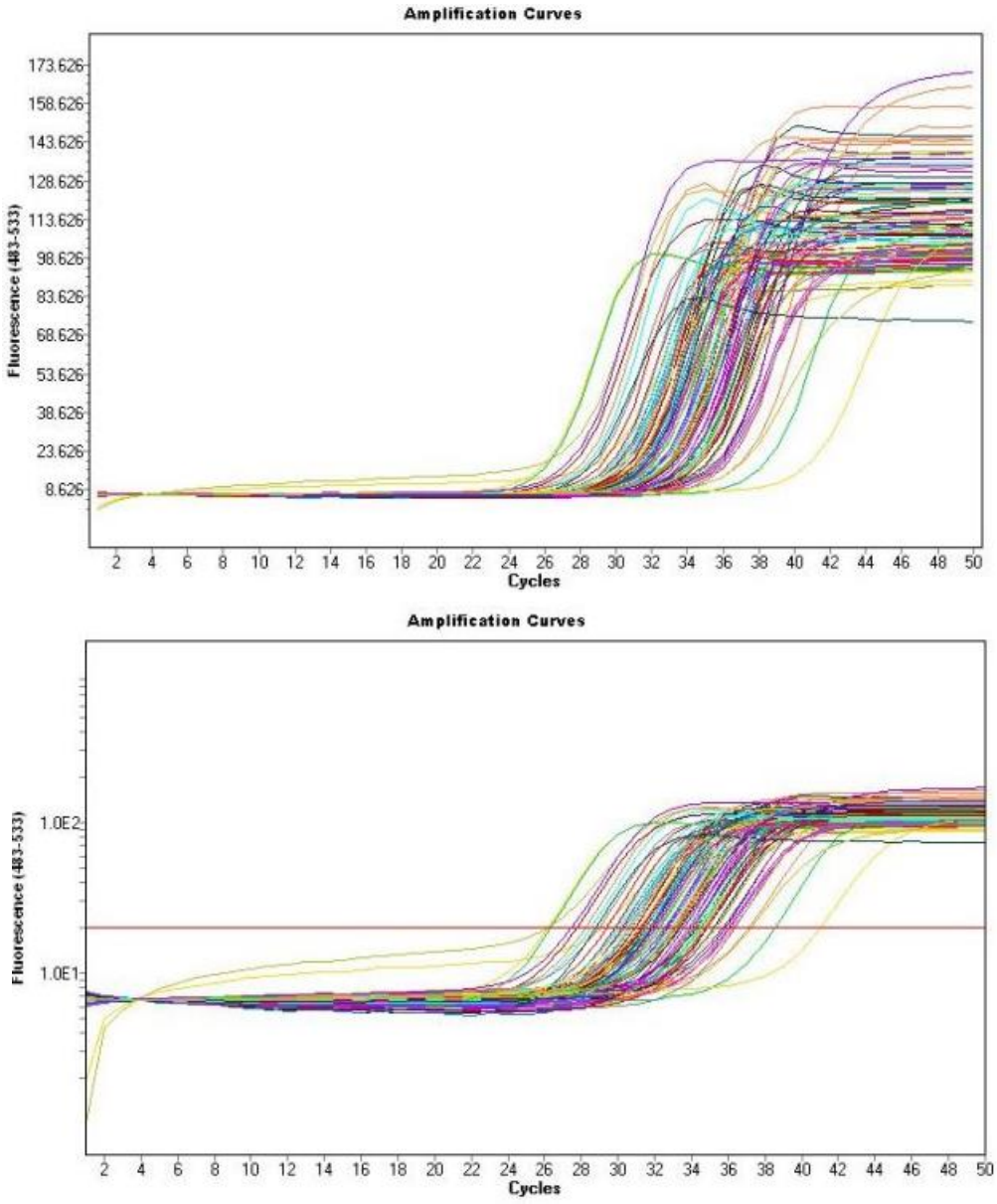
Çalışmamızı oluşturan 47 hastanın FFPE doku örneklerinden elde edilen cDNA'lar Thermofisher (THERMO-K0221) Sybr Green Master Mix ile Roche 480-I Real time PCR cihazı kullanılarak analiz edildi. 96 kuyucuklu DNAse ve RNAse free Plate kullanıldı. Kontrol gen olarak B-aktin kullanıldı.

47 olgunun 45'i (%95,74) PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen ekspresyon seviyeleri açısından değerlendirilirken, 2 olgu kesitinin (olgu 24 ve olgu 38) RNA miktarlarının yetersiz olmasından dolayı çalışmaya dahil edilemedi.

Çalışmanın sonunda, RT-PCR ile çoğaltılan cDNA'lardan; elde edilen hem kontrol geni olan B-aktin hemde PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin tamamına ait örneklerin gen ekspresyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösteren amplifikasyon eğrileri Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da yer almaktadır.



Şekil 4.5. B-aktin (kontrol gen) ve JAK2 genine ait amplifikasyon görüntüsü



Şekil.4.6. PD-L1 ve PD-L2 genlerine ait amplifikasyon görüntüsü

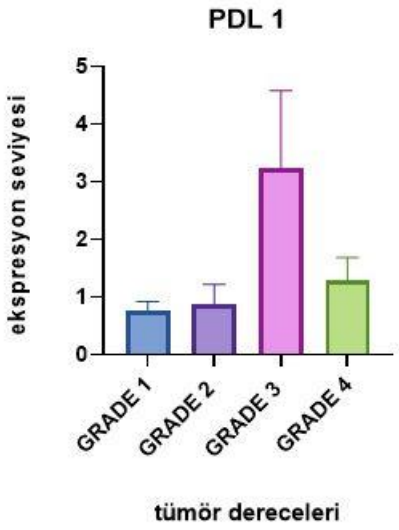
RT-PCR sonucu elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ekspresyonların belirlenmesinde kullanıldı ve 2 -ΔΔCt yöntemi kullanılarak B-aktin kontrol geni ile kıyaslanarak oransal olarak hesaplandı.

4.4.1. İstatistiksel analiz sonucunda elde edilen bulgular

4.4.1.1. PD-L1 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular

Çalışmamız sonucunda, PD-L1 gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde, olgu ve kontrol grubu örneklerinin normal olarak dağılmadığını ve standart sapma oranlarının çok yüksek olduğunu tespit ettik. Bu nedenle, istatistiksel analizi non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile gerçekleştirdik. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

PD-L1 gen bölgesi için tümör dereceleri arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, grade 3 en yüksek ekspresyon seviyesine sahipken, grade 1'in en düşük ekspresyon seviyesini gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.7.). Fakat, analiz sonucunda olgu (Grade 4) ve kontrol (Grade 1, Grade 2, Grade 3) grupları arasında, PD-L1 gen ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p= 0.3732$).

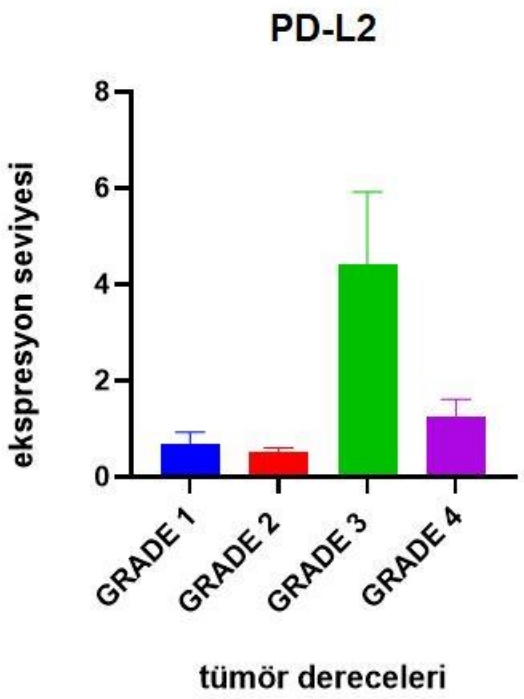


Şekil 4.7. Tümör derecelerinin ve PD-L1 gen eskpresyon düzeylerinin karşılaştırılması

4.4.1.2. PD-L2 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular

Grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4 olguları PD-L2 ekspresyon düzeyi açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.0389$). PD-L2'nin

PD-L1 ve JAK2 genlerine kıyasla daha normal bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Grade III (anaplastik astrositom)'deki olguların PD-L2 ekspresyonunun relatif bir şekilde daha yüksek olduğu yapılan analiz sonucunda ortaya konmuştur (Şekil 4.8.).



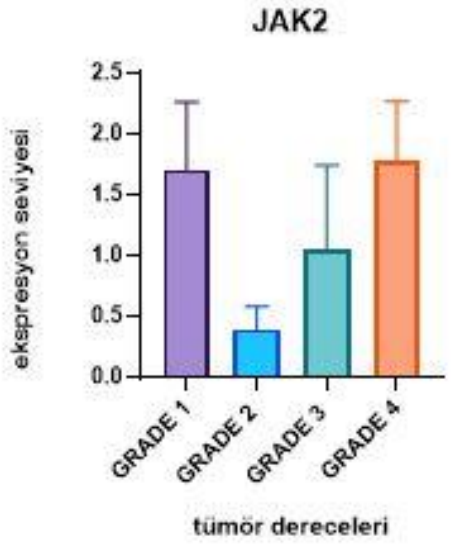
Şekil 4.8. Beyin tümör dereceleri ve PD-L2 gen ekspresyon seviyesi

4.4.1.3. JAK2 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular

JAK2 gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde ekspresyon seviyeleri açısından çalışma grubumuz incelendiğinde kontrol grubu (grade 1, grade 2, grade 3) ve olgu grubu olan glioblastoma (grade 4) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Birbirinden farklı çıkan örneklerin var olduğunu fakat standart sapmanın çok yüksek olmasından dolayı istatistiksel olarak JAK2 gen ekpresyon düzeyinde bir anlam ifade etmediğini tespit ettik (p= 0.4416).

Diğer taraftan, JAK2 gen bölgesi için, grade 4 olarak bilinen glioblastoma en yüksek ekspresyon seviyesini gösterirken, Diffüz astrositom (grade 2)'un en düşük ekspresyon düzeyine sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, grade I olarak bilinen Pilositik astrositom'un ise grade II'ye oranla 3 kat, grade 3 (Anaplastik astrositom)'a oranla 0.5 kat daha yüksek

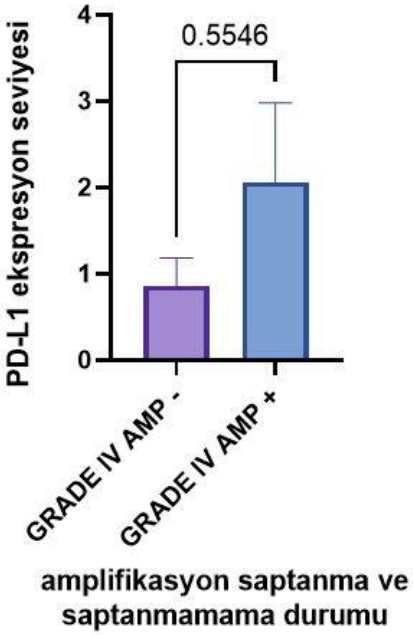
ekspresyon seviyesi gösterdiği saptandı. Yapılan JAK2 ekspresyon çalışması sonucunda grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4 beyin tümörlerinin ekspresyon seviyelerine ait bulgular Şekil 4.9.'de yer almaktadır.



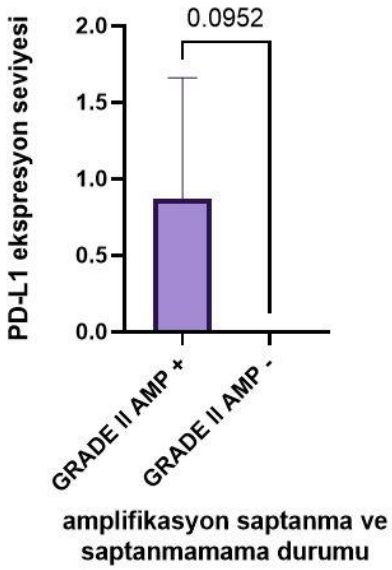
Şekil 4.9. Tümör dereceleri ve JAK2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

4.4.1.4. PD-L1 genomik kopya sayısı değişiklikleri ve PD-L1 ekspresyonunun durumu

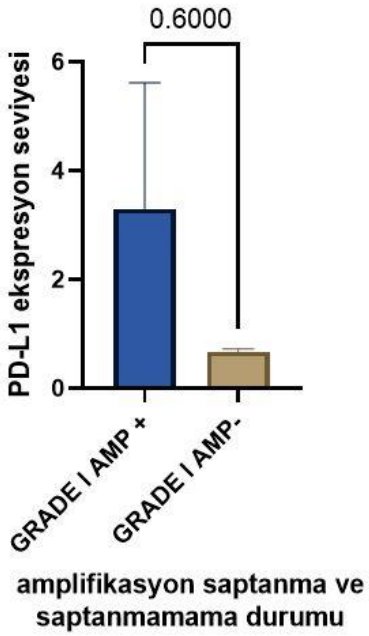
Olgu grubu olan glioblastoma (grade 4) ve kontrol grubunda yer alan grade 3, grade 2 ve grade 1 glial tümörlerin, PD-L1 ekspresyon düzeylerini, PD-L1 amplifikasyonu saptanma ve saptanmama durumlarına göre değerlendirdik. Kontrol grubu, olgu grubu olan glioblastomaya göre yüksek amplifikasyon oranına sahip olsa da istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır. Elde edilen verilerin sonuçlarına göre her bir tümör derecesinin (grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4) PD-L1 amplifikasyon durumu ve ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Tümör dereceleri, amplifikasyon durumları ve PD-L1 ekspresyon seviyelerine ait bulgular Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.'de yer almaktadır. Olgu ve kontrol grubu amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon düzeylerine ait bulgu Şekil 4.13.'de gösterilmektedir.



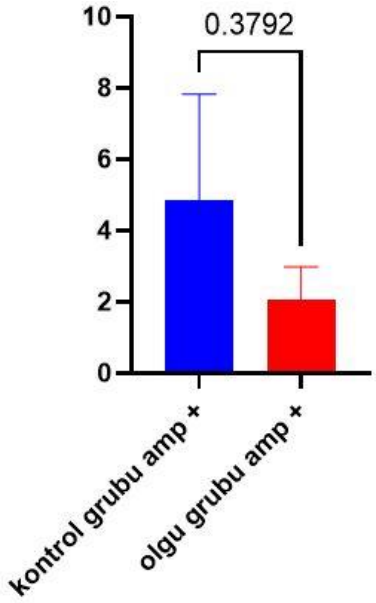
Şekil 4.10. Grade 4 amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.5546)



Şekil 4.11. Grade 2 amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.952)



Şekil 4.12. Grade 1 amplifikasyon durumu ve PD-L1 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.6000)



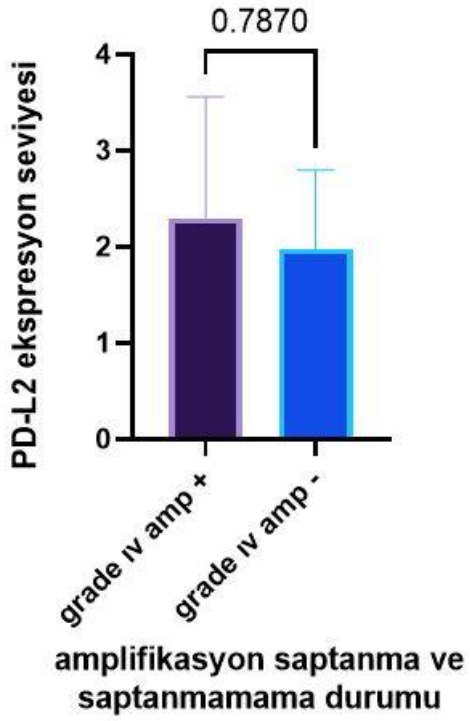
Şekil 4.13. Olgu ve kontrol grubu amplifikasyon düzeyleri ve PD-L1 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması (p=0.3792)

4.4.1.5. PD-L2 genomik kopya sayısı değişiklikleri ve PD-L2 ekspresyonunun durumu

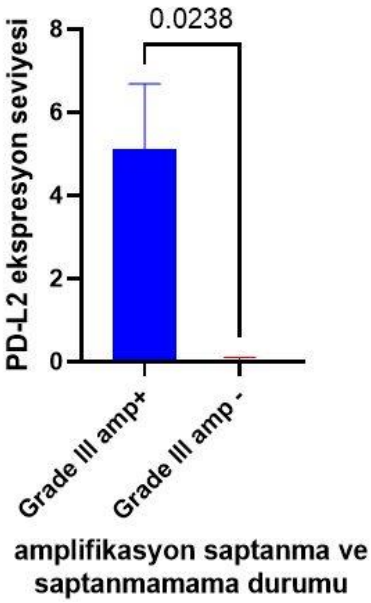
Çalışmamızda, PD-L2 gen amplifikasyon durumu ve ekspresyon düzeyi her bir grade için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Toplam 10 GBM olgu kesitinde ampifikasyon pozitif olarak saptanırken, 15 olguda ise amplifikasyon negatif olarak belirlenmiştir. Amplifikasyon saptanan olgular, saptanmayanlara göre daha yüksek PD-L2 seviyesi göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamıştır (p=0.7870) (Şekil 4.14.). Aynı şekilde, grade 3 (6 amplifikasyon pozitif, 1 amplifikasyon negatif) ve grade 1 (3 amplifikasyon +, 3 amplifikasyon -) olguları için de yüksek oranda PD-L2 amplifikasyonu göstermelerine rağmen PD-L2 ekspresyon seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. (Şekil 4.15. ve Şekil 4.17.)

5 grade 2 (diffüz astrositom) olgusunun tamamı PD-L2 amplifikasyonu açısından pozitif olarak belirlenmiş ve PD-L2 ekspresyon düzeyi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.0231) (Şekil 2.16.).

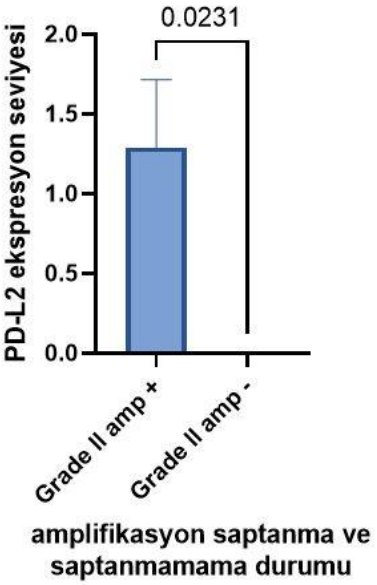
PD-L2 amplifikasyon ve ekspresyon düzeyleri açısından GBM (grade 4) ve kontrol grupları (grade 3, grade 2, grade 1) birlikte değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.0328). Olgu ve kontrol grubu amplifikasyon düzeyleri ile PD-L2 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 4.18.'de gösterilmektedir.



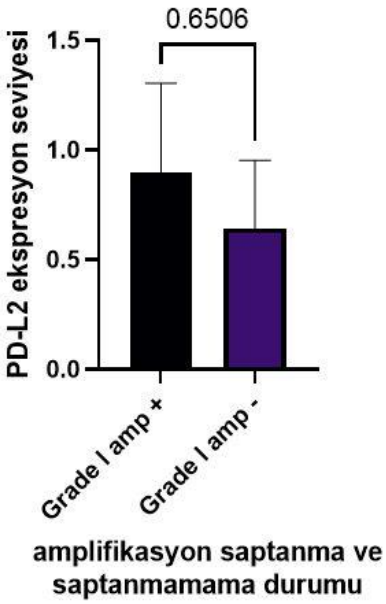
Şekil 4.14. Grade 4 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.7870)



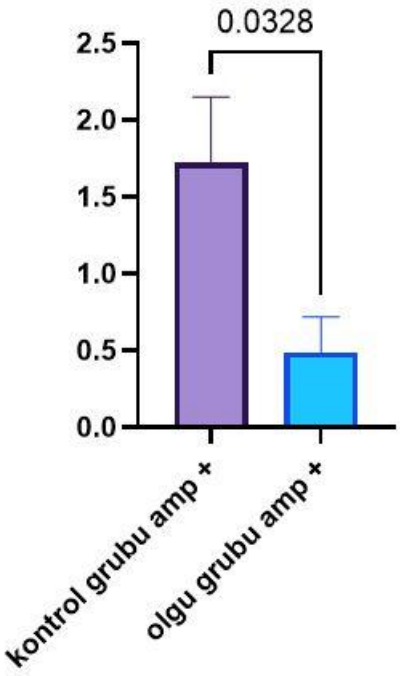
Şekil 4.15. Grade 3 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki



Şekil 4.16. Grade 2 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.0231)



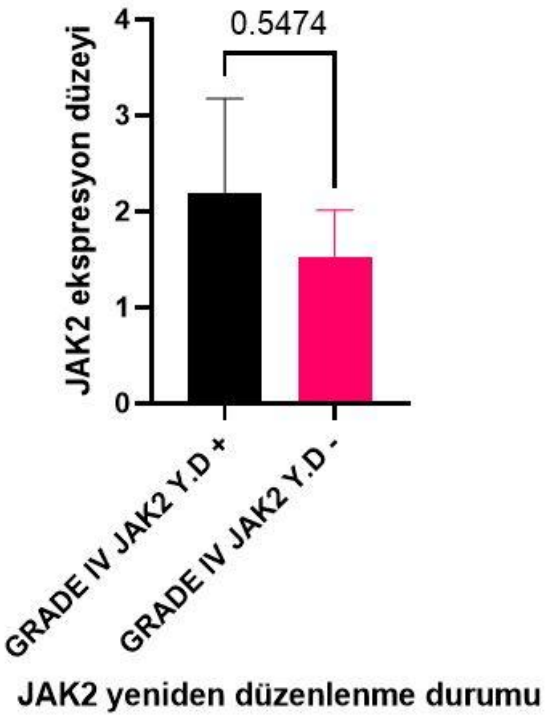
Şekil 4.17. Grade 1 amplifikasyon durumu ve PD-L2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.6506)



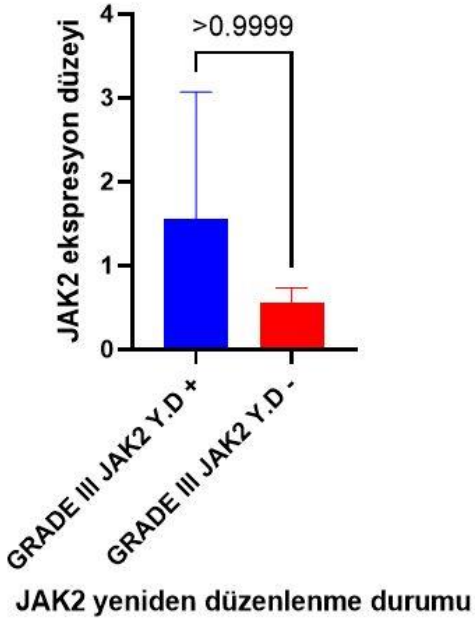
Şekil 4.18. Olgu ve kontrol grubu amplifikasyon düzeyleri ve PD-L2 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması(p=0.0328)

4.4.1.6. JAK2 genomik kopya sayısı değişiklikleri ve JAK2 ekspresyonunun durumu

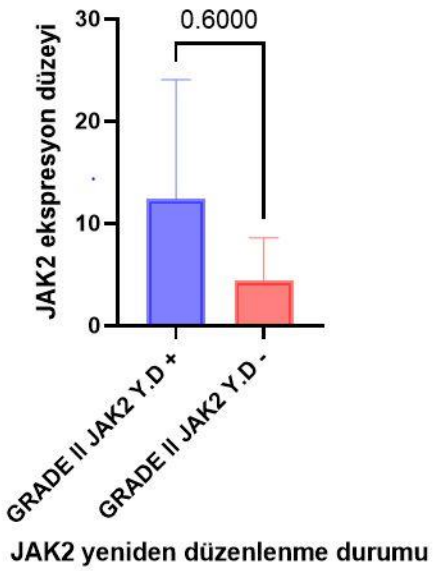
Olgu grubu olan glioblastoma (grade 4) ve kontrol grubunda yer alan grade 3, grade 2 ve grade 1 glial tümörleri, JAK2 ekspresyon düzeylerine ve JAK2 yeniden düzenlenme pozitif ve negatif olması durumlarına göre değerlendirdik. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4 beyin tümörleri JAK2 gen bölgesi için yüksek oranda yeniden düzenlenmeye sahip olsa da ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar bulunamamıştır. Grade 4, 3, 2, ve 1 yeniden düzenlenme durumu, JAK2 ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki ve p değerleri Şekil 4.19., 4.20., 4.21., 4.22.'de yer almaktadır. Ayrıca, olgu ve kontrol grubu JAK2 yeniden düzenleme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasına ait bilgiler ise Şekil 4.23.'de gösterilmektedir.



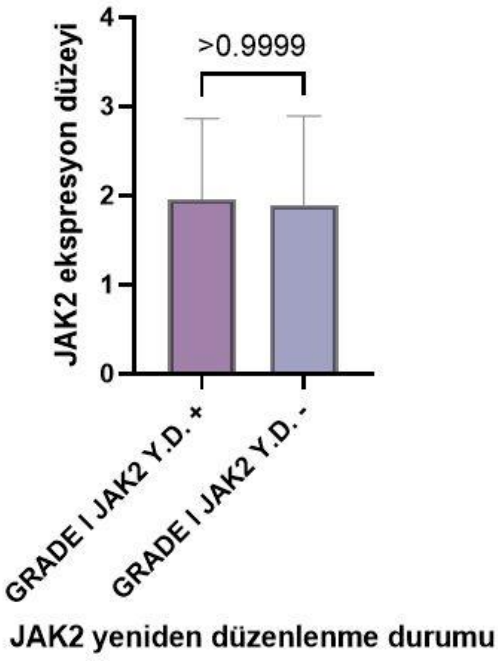
Şekil 4.19. Grade 4 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki (p=0.5474)



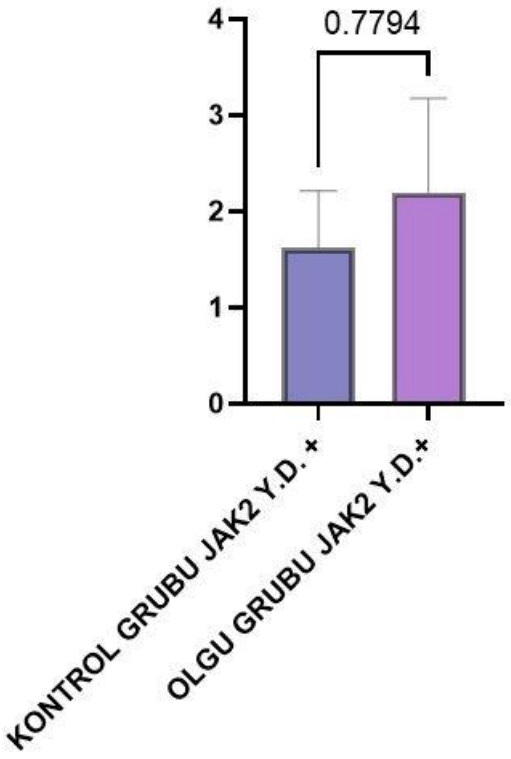
Şekil 4.20. Grade 3 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki



Şekil 4.21. Grade 2 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki(p=0.6000)



Şekil 4.22. Grade 1 yeniden düzenlenme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki



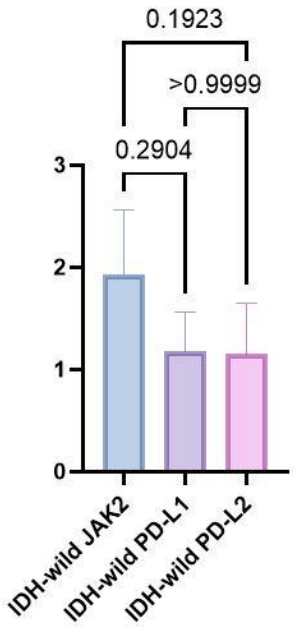
Şekil 4.23. Olgu ve kontrol grubu JAK2 yeniden düzenleme durumu ve JAK2 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması(p=0.7794)

4.4.1.7. Glioblastoma olgularında IDH mutasyon durumu ve ekspresyon ilişkisi

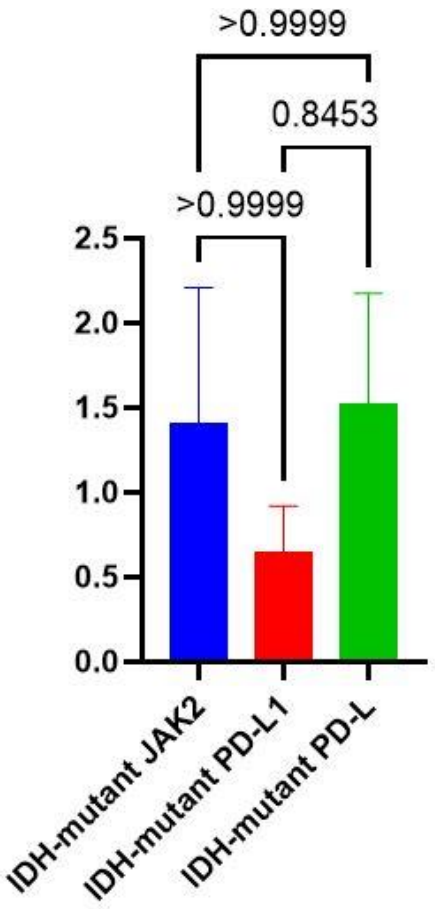
IDH-wild tip ve IDH-mutant tip glioblastoma olgularını PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen bögelerinin ekspresyon düzeylerine göre ayrı ayrı değerlendirdik. IDH-wild tip glioblastomada JAK2 gen bölgesi PD-L1, PD-L2 gen bölgelerine oranla daha yüksek ekspresyon seviyesi gösterse de Kruskal-Wallis testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde olmadığını tespit ettik (Şekil 4.24.).

IDH-mutant tip glioblastoma olguları ise PD-L2 için en yüksek ekspresyon düzeyine sahipken, PD-L1 açısından en düşük ekspresyon seviyesini göstermekteydi. Elde ettiğimiz bulgulara göre, PD-L1, PD-L2, JAK2 gen bölgeleri ekspresyon seviyeleri açısından farklılık gösterse de bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. IDH-mutant tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 4.25.'de yer almaktadır. IDH-wild tip ve IDH-mutant

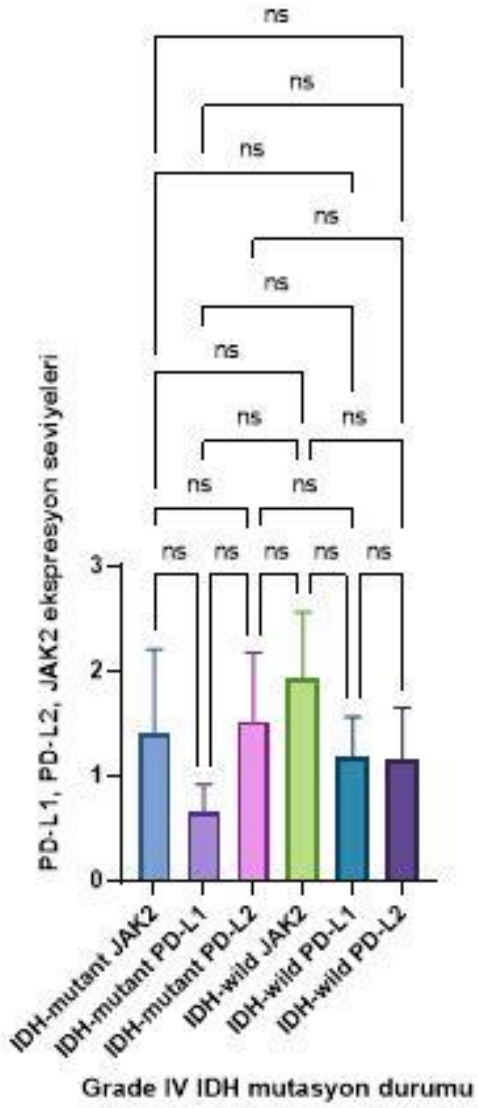
tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2, JAK2 gen ekspresyon düzeylerine ait bulgular Şekil 4.26.'da gösterilmektedir.



Şekil 4.24. IDH-wild tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 4.25. IDH-mutant tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 4.26. IDH-wild tip ve IDH-mutant tip glioblastoma olgularında PD-L1, PD-L2, JAK2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

5.1. Çalışmamızda Elde Edilen Bulguların Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

5.1.1. Genomik kopya sayısı değişiklikleri

Çalışmamızda, 27 FFPE glioblastoma doku örneği ile kontrol grubunu oluşturan 20 FFPE düşük gradeli glial tümör (Grade 1, 2, 3) doku örneğinde PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genomik kopya sayısı değişiklikleri, ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri ve IDH-mutasyon durumu arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Kopya sayısı kazanımları, genlerin ekspresyon seviyelerinin artmasından sorumlu olabilir. PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genleri, kromozom 9p24.1'de yer almaktadır ve ilgili genlerin kopya sayısı değişikliklerinin lenfomalarda, EBV pozitif mide kanseri, üçlü negatif meme kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde olduğu bilinmektedir. Buna karşılık, glioblastoma'da PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerindeki kopya sayısı değişimleri, protein seviyeleri arasındaki ilişki ve önemi henüz net olarak ortaya konmamıştı. Literatürde, küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularında PD-L1 ve PD-L2 genlerindeki kopya sayılarının yanı sıra PD-L1 ve PD-L2'nin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş ve CD274 kopya sayısındaki artışın PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak PD-L2 proteinindeki kopya sayısı kazanımlarının PD-L2'nin amplifikasyonuyla ilgili olmadığını belirtmişlerdir (Inoue et al. 2016). Hodgkin lenfomada 9p24.1/PD-L1/PD-L2 kopya sayısı değişikliklerinin FISH analizi ile ve ekspresyon düzeylerini de immünohistokimya analizi ile değerlendirildiği çalışmada, 9p24.1'de kopya sayısı kazanımı ve 9p24.1 amplifikasyonu olduğu, PD-L1 ekspresyonundaki artış ile kopya sayısı değişikliklerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (Roemer et al. 2016). Fakat, biz çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sonucunda, PD-L1 kopya sayılarının tüm dereceli gliomalarda önemli ölçüde arttığını fakat ilgili genlerin kopya sayısı kazanımlarının PD-L1 ekspresyon seviyesi ile ilişkili olmadığını saptadık. Bu durum muhtemelen, RT-PCR'da PD-L1 gen bölgesi için

olgu ve kontrol grubu örneklerinin normal olarak dağılmadığı ve standart sapma oranlarının çok yüksek olması ile açıklanabilir.

Literaürde, PD-L2 ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar hakkında oldukça az bilgi yer almaktadır. Çalışmamızda, PD-L2 gen kopya sayısı değişimlerini değerlendirdiğimizde, grade 2 ve grade 3'ün PD-L2 ekspresyon seviyesi ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu gösterdik. Ayrıca, glioblastomadaki (grade 4) kopya sayısı artışının PD-L2 ifade düzeyi ile ilişkili olmadığını saptadık. Ayrıca, kontrol grubunda yer alan 7 diffüz astrositom olgusunun tamamının PD-L2 amplifikasyonu açısından pozitif olduğunu ve PD-L2 gen ifade düzeyi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. Bu doğrultuda bulgularımız, PD-L2 kopya sayısı kazanımlarının PD-L2 ekspresyon seviyesiyle ilişkili olduğunu gösterse de, glial tümör derecesi ile herhangi bir korelasyon göstermediğini ifade etmektedir. Ancak, gliomalarda şu ana kadar PD-L1, PD-L2 genleri açısından genomik kopya sayısı değişimlerini ve ilgili genlerin ekspresyon düzeylerinin birbiriyle karşılaştırılmasını içeren herhangi bir literatür verisine ulaşılamamıştır. Bu bağlamda, çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin literatüre katkı sağlaması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

JAK2 gen bölgesi için grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4 glial tümörlerde yeniden düzenlenme oranı yüksek olsa da JAK2 ekspresyon seviyesiyle anlamlı bir ilişki olmadığını saptadık. Çalışmamızda, PD-L1/2 gen bölgelerinde amplifikasyon gösteren 11 olgu örneğinin JAK2 gen bölgesi kopya sayısı değişimleri açısından atipik sinyal paterni gösterdiğini tespit ettik. Ayrıca, glioblastoma yeniden düzenlenme pozitif olan olgu doku örneklerinin grade 1, grade 2 ve grade 3 kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiğini saptadık. Literatürde, PD-L1, PD-L2 ve JAK2 amplifikasyonlarının Nodüler hodgkin lenfoma Reed Sternberg hücrelerinde PD-L1 gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Goodman et al. 2018). Diğer bir çalışmada, PD-L1 ekspresyonunun, yalnızca doğrudan PD-L1'in amplifikasyonu yoluyla değil, aynı zamanda daha aktif bir JAK-STAT yolu ile de dolaylı olarak da artırıldığı bildirilmiştir (Sadakatsu Ikeda et al. 2016). Fakat, literatürden farklı olarak çalışmamızda PD-L1 kopya sayısı kazanımlarının ve JAK2 yeniden düzenlenmelerinin PD-L1 ekspresyonuyla bir korelasyon göstermediğini saptadık. Bu da, diğer kanser türlerinde ilgili genlerin kopya

sayısı kazanımları PD-L1 gen ifade düzeyi ile ilişkili olsa da, gliomalarda artan PD-L1 ekspresyon seviyesiyle ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

5.1.2. PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen ekspresyonları

Çalışmamızda, tüm glioma dereceleri (grade 1, grade 2, grade 3, grade 4) ve PD-L1 ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirdik. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, anaplastik astrositom (grade 3) en yüksek PD-L1 ekspresyon seviyesini gösterirken, pilositik astrositom (grade 1)'un en düşük ekspresyon düzeyine sahip olduğunu saptadık (Şekil 4.7). Fakat, glioma dereceleri ile PD-L1 ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık saptamadık. Yapılan bir çalışmada, 976 glioma örneğinde PD-L1 ekspresyon durumunu belirlemek için, RNAseq ve microarray yöntemlerini içeren verilerden yararlanmışlar, çalışmanın sonucu olarak; PD-L1 ekspresyonunun, glioma dereceleri ile pozitif korelasyon gösterdiğini ve IDH-wild tip gliomaların IDH-mutant gliomalara oranla daha yüksek PD-L1 ekspresyon seviyesi gösterdiğini tespit etmişlerdir (Wang et al. 2016). Xue ve ark.'nın yaptığı çalışmada PD-L1'in glioma hücrelerinde eksprese edildiğini ve tümör derecesi ile ilişkili olduğu belirtmişlerdir (Xue, Hu, Iyer, et al. 2017). Bizim çalışmamızda PD-L1 ekspresyonunun, glioma derceleri ile korelasyon göstermemesinin nedenlerinden birisi, olgu (grade 4) ve kontrol grupları (grade 1, grade 2, grade 3) örneklerinin normal olarak dağılmadığından ve standart sapma oranlarının çok yüksek olmasıdır. Kısaca, örneklerde ekspresyon seviyeleri değişmekte fakat anlamlı düzeyde bir grup halinde bütün olgularda değişim olmaması nedeniyle birbirinden farklı çıkan örneklerin olduğu fakat standart sapmanın çok yüksek olmasından dolayı istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediğini bildirmektedir.

Berghoff ve arkadaşları çalışmalarında IHC yöntemini kullanarak yeni teşhis edilen glioblastoma örneklerinin büyük bir kısmının PD-L1 ekspresyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızın olgu grubunu oluşturan glioblastoma doku örneklerinde PD-L1 ekspresyon varlığını RT-PCR yöntemi ile tespit ettik ancak istatistiksel olarak anlam ifade etmediğini saptadık. Bu farklılığın muhtemelen gen ekspresyon düzeylerini belirlemede kullandığımız yönteminin farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz (Berghoff et al. 2015)

PD-L2'nin ekspresyonu PD-L1'e göre çok daha sınırlı olduğu ve hematopoetik tümörlerde yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir. Çalışmamızda glial tümörlerdeki PD-L2 ekspresyon seviyesini değerlendirdik. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4 glial tümörler ile PD-L2 gen ekspresyonu arasında anlamlı düzeyde bir ilişki saptadık. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada Kanser Genom Atlas (TCGA) verilerinden 1032 örneğin RNA ekspresyon sonuçları ile birlikte Çin Glioma Genom Atlas'tan (CGGA) 325 glioma örneğinin RNA dizileme verilerini kullanarak gliomalar üzerinde PD-L2'nin prognostik değerini araştırmışlardır. PD-L2 ekspresyon seviyesinin, yüksek glioma derecesi ve IDH wild tip glioma ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (X. Wang et al. 2019). Yapılan diğer bir çalışmada, 325 glioma örneği üzerinde PD-L2'nin biyolojik davranışları ve klinik açıdan prognostik değerleri araştırılmış ve sonuç olarak PD-L2 ekspresyonunun IDH wild tip ve yüksek derece gliomalarla ilişkili olduğu saptanmıştır (Z. liang Wang et al. 2019b). Literatür verileri ile uyumlu olarak, yüksek dereceli glial tümörlerin (grade 3 ve grade 4) düşük dereceli gliomalara (grade 1, grade 2) göre daha yüksek PD-L2 seviyesine sahip olduğunu saptadık. Ancak çalışmamızın bulguları sonucunda anaplastik astrositomun (grade 3) glioblastomaya kıyasla daha yüksek seviye PD-L2 ekspresyonu gösterdiğini tespit ettik.

JAK2 gen ekspresyon seviyesi ile tümör dereceleri arasında bir korelasyon saptamadık. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamasak ta en ileri evre glial tümör olarak bilinen glioblastomanın yüksek JAK2 gen ekspresyonuna sahip olduğunu saptadık (Şekil 4.9.).

5.1.3. IDH mutasyon durumu ve ekspresyon ilişkisi

2016 DSÖ sınıflamasıyla birlikte, astrositom, oligodendriogioma, oligoastrositoma gibi histolojik alt tipler yerine, IDH mutasyon durumu, 1p19q kodelesyonu, histon mutasyon testlerini içeren yeni kriterleri dahil edilmiştir. Bununla birlikte, astrositomlar ve glioblastoma IDH-mutant ve IDH-wild tip olarak tanımlandı (Chen et al., 2017). IDH-wild tip glioblastomaların %90'ını oluşturmakta ve IDH-mutant glioblastomaya göre daha kötü prognoz göstermektedir (TAMIMI & JUWEID, 2017; Zhang et al., 2020). Biz

de çalışmamızda, glioblastoma doku örneklerinde PD-L1, PD-L2 ve JAK2 gen ekspresyon düzeylerini IDH mutasyon durumuna göre değerlendirdik.

Wang ve ark.'nın yaptıkları çalışmada IDH-wild tip glioblastomanın IDH-mutant tip glioblastomadan daha yüksek seviyede PD-L1 ekspresyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir (Wang et al. 2016). Aynı şekilde Henrick ve ark. çalışmalarında IDH-wild tip glioblastomanın PD-L1 ekspresyonu gösterdiğini belirtmişlerdir (Heiland et al. 2017). Zhiliang Wang ve ark. çalışmalarında PD-L2 ekspresyonunun, glioblastoma ve IDH-tip gliomalarda önemli ölçüde eksprese edildiğini bildirmişlerdir(Wang et al. 2016) Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, IDH-wild tip glioblastomada ilgili genlerin ekspresyon seviyelerini karşılaştırdığımızda JAK2'nin en yüksek ekspresyona sahip olduğunu gözlemledik ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik.

Çalışmamızda IDH-mutant tip glioblastoma doku örneklerinde PD-L2'nin yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğunu, PD-L1'in ise en düşük ekspresyon seviyesi gösterdiğini saptadık. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda, PD-L1, PD-L2, JAK2 gen bölgeleri ekspresyon seviyeleri açısından farklılık gösterse de bu fark istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptanmamıştır.

Güncel 2021 sınıflamayla birlikte, tez çalışmamızda yer alan olgu ve kontrol gruplarının dereceleri farklılık göstermektedir. Olgu grubumuz olan glioblastoma (grade 4), IDH-wild tip ve IDH-mutant tip glioblastomlar olarak sınıflandırılırken, güncel sınıflamayla artık sadece glioblastoma IDH-wild tip astrositom (grade 4, IDH-wild) olarak tanımlanmaktadır. Aynı şekilde kontrol gruplarında yer alan pilositik astrositom (grade 1), diffüz astrositom (grade 2) ve anaplastik astrositom (grade 3) glial tümörler de 2021 sınıflaması ile IDH mutant diffüz astrositom tek tip olarak kabul edilmektedir (IDH-mutant astrositom, DSÖ derece 2-4). Diffüz astrosit glial tümörlerde (grade 2 , grade 3) IDH mutasyonu yoksa moleküler özelliklerin varlığında glioblastoma tanısı konulabileceği bildirilmiştir. Morfolojik özellikler, vasküler endotelyal proliferasyon, nekroz olmasa dahi histolojik olarak diffüz astrositom glial tümör olmasına rağmen EGFR amplifikasyonu, TERT promotor mutasyonu, kromozom 7+, kromozom 10- moleküler özelliklerlerin varlığında glioblastoma (grade 4) olarak sınıflandırılmaktadır. Sonuçta

histolojik olarak yüksek dereceli özelliklerin olmamasına rağmen, CNS WHO derece 4 olan glioblastoma tanısını belirlemektedir (Gritsch et al. 2022).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, 27 FFPE doku örneği ve kontrol grubunu oluşturan düşük gradeli glial tümörlü olgulardan 20 FFPE doku örneklerinde immün yanıtta önemli fonksiyon gösteren PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin kopya sayısı değişimleri ile ilgili genlerin ekspresyon paternleri arasında ilişki değerlendirilmiştir.

Çalışmamız sonucunda;

- FISH ile 47 olgunun 44'ü (%93,61) PD-L1 ve PD-L2 gen bölgeleri açısından değerlendirilmiştir.27 glioblastoma olgusunun 11'i PD-L1 ve PD-L2 gen bölgeleri açısından amplifikasyon pozitif olarak saptanırken, kontrol grubunu oluşturan 20 olgunun 14'ü (%70) PD-L1 ve PD-L2 gen bölgeleri açısından amplifikasyon pozitif olarak saptanmıştır.
- JAK2 gen bölgesi kopya sayısı değişimleri, 47 olgunun 42'sinde değerlendirilmiştir. FISH sonucundan elde edilen bulgulara göre, 27 glioblastoma olgusundan 9'u atipik sinyal paterni açısından pozitif, kontrol grubunda yer alan olgulardan 8'inde JAK2 gen bölgesi için yeniden düzenlenme pozitif olarak saptanmıştır.
- Glial tümör dereceleri ile PD-L1 ekspresyon seviyesi arasında bir ilişki saptanmamıştır.
- PD-L2 ve tümör gradeleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.
- Grade 3 (anaplastik astrositom)'un, glioblastoma ve düşük dereceli tümörlere oranla daha yüksek PD-L2 ekspresyon seviyesi gösterdiği saptanmıştır.
- Tümör dereceleri ve JAK2 ekspresyon seviyesi arasında bir ilişki saptanmamıştır.
- PD-L1 amplifikasyonu ve PD-L1 ekspresyonu arasında bir ilişki saptanmamıştır.
- PD-L2 gen amplifikasyonu ve PD-L2 ekspresyon düzeyi arasında ilişki saptanmıştır.

- PD-L2 gen amplifikasyonunda glioblastomanın aksine grade 2, grade 3 glial tümörlerinin daha yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiği saptanmıştır.
- JAK2 yeniden düzenlemesi ile ilgili genin ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

- IDH mutasyon durumuna göre PD-L1, PD-L2 ve JAK2 genlerinin ekspresyon seviyeleri arasında bir ilişki gözlenmemiştir.
- IDH-mutant glioblastomada ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri arasında bir korelasyon saptanmasa da PD-L2'nin yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiği gözlenmiştir.

Daha önce ilgili hasta grubunda FISH yöntemi ile belirtilen genlerin amplifikasyonunun değerlendirilmemesi çalışmamızı sağladığı veriler açısından değerli kılmaktadır. Bu nedenle en agresif beyin tümörü olarak nitelendirilen glioblastomanın PD-L1 / PD-L2 / JAK2 genlerinin ekspresyon analizi ile desteklenen FISH yöntemine bakılması literatüre yeni veriler sağlamaktadır.

Çalışmamız, prognoz ve patogeneze katkısı olduğu saptanan PD-L1, PD-L2 ve JAK2 kopya sayısı değişimlerinin erken/ileri evre tümörler arasındaki farklılığın incelendiği ilk çalışmadır.

Özellikle, literatürde ilgili genlerin ekspresyon değişimlerinin genellikle immünohistokimyasal yöntemle incelendiği görülmektedir. Çalışmamızla birlikte, RT-PCR ve FISH yöntemleri eş zamanlı çalışılarak, iki yöntemin korelasyonu değerlendirilmiştir.

PD-L2 için erken ve ileri tümör dokularındaki ekspresyon farklılıklarının değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma olması nedeniyle çalışmamız sonucunda literatür verisine katkı sağlamaktadır.

Daha önce, ilgili genlerin kopya sayısı değişimleri ve ekspresyonları arasında ilişki olup olmadığı sadece akciğer, meme, hodgkin lenfoma kanserlerinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızın, bu ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma olması çalışmamızın özgünükleri arasında yer almaktadır.

Glioblastoma olgularında ilgili genlerin genomik kopya sayılarının değerlendirilmesi ve prognoz üzerindeki etkilerinin araştırılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, olgu sayısının arttırılması da daha fazla veriye ulaşılması açısından önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Ann, Nancy, Oberheim Bush, Shawn L. Hervey-jumper, and Mitchel S. Berger. 2019. "Management of Glioblastoma, Present and Future." *World Neurosurgery* 131:328–38. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.044.

Anon. n.d. "Janus Kinase 2." Retrieved (https://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2#sourcesforpage).

Bardhan, Kankana, Theodora Anagnostou, and Vassiliki A. Boussiotis. 2016. "The PD1: PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation." *Frontiers in Immunology* 7(DEC). doi: 10.3389/fimmu.2016.00550.

Barrett, Michael T., Karen S. Anderson, Elizabeth Lenkiewicz, Heather E. Cunliffe, Christine L. Klassen, Amylou C. Dueck, and E. Ann. 2015. "PD-L2 Is Enriched in High-Risk Triple Negative Breast Cancer." 6(28):1–11.

Baumann, Kim. 2009. "JAK2 Goes Nuclear." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(11):737–737. doi: 10.1038/nrm2783.

Berghoff, Anna Sophie, Barbara Kiesel, Georg Widhalm, Orsolya Rajky, Gerda Ricken, Adelheid Wohrer, Karin Dieckmann, Martin Filipits, Anita Brandstetter, Michael Weller, Sebastian Kurscheid, Monika E. Hegi, Christoph C. Zielinski, Christine Marosi, Johannes A. Hainfellner, Matthias Preusser, and Wolfgang Wick. 2015. "Programmed Death Ligand 1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Glioblastoma." *Neuro-Oncology* 17(8):1064–75. doi: 10.1093/neuonc/nou307.

Chen, Ricky, Matthew Smith-Cohn, Adam L. Cohen, and Howard Colman. 2017. "Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance." *Neurotherapeutics* 14(2):284–97. doi: 10.1007/s13311-017-0519-x.

Conway, J. R., E. Kofman, S. S. Mo, H. Elmarakeby, and E. Van Allen. 2018. "Genomics of Response to Immune Checkpoint Therapies for Cancer: Implications for Precision Medicine 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and C." *Genome Medicine* 10(1):1–18. doi: 10.1186/s13073-018-0605-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Dewitt, John C., Andreas Mock, and David N. Louis. 2017. "The 2016 WHO Classification of Central Nervous System Tumors: What Neurologists Need to Know." *Current Opinion in Neurology* 30(6):643–49. doi: 10.1097/WCO.0000000000000490.

Goodman, Aaron M., David Piccioni, Shumei Kato, Amélie Boichard, Huan You Wang, Garrett Frampton, Scott M. Lippman, Caitlin Connelly, David Fabrizio, Vincent Miller, Jason K. Sicklick, and Razelle Kurzrock. 2018. "Prevalence of PDL1 Amplification and Preliminary Response to Immune Checkpoint Blockade in Solid Tumors." *JAMA Oncology* 4(9):1237–44. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.1701.

Gritsch, Simon, Tracy T. Batchelor, and L. Nicolas Gonzalez Castro. 2022. "Diagnostic, Therapeutic, and Prognostic Implications of the 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System." *Cancer* 128(1):47–58. doi: 10.1002/cncr.33918.

Guan, Jian, Khin Sandar Lim, Tarek Mekhail, and Chung-Che Chang. 2017. "Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in the Programmed Death Receptor-1 (PD-1)/PD-L1 Blockade: A Key Player Against Various Cancers." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 141(6):851–61. doi: 10.5858/arpa.2016-0361-RA.

Hao, Chengcheng, Gang Chen, Huishan Zhao, Yan Li, Jianxin Chen, Hongmei Zhang, Shan Li, Yuze Zhao, Feng Chen, Wenbin Li, and Wen G. Jiang. 2020. "PD-L1 Expression in Glioblastoma, the Clinical and Prognostic Significance: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis." *Frontiers in Oncology* 10(June):1–10. doi: 10.3389/fonc.2020.01015.

Heiland, Dieter Henrik, Gerrit Haaker, Daniel Delev, Bianca Mercas, Waseem Masalha, Sabrina Heynckes, Annette Gäbelein, Dietmar Pfeifer, Maria Stella Carro, Astrid Weyerbrock, Marco Prinz, and Oliver Schnell. 2017. "Comprehensive Analysis of PD-L1 Expression in Glioblastoma Multiforme." *Oncotarget* 8(26):42214–25. doi: 10.18632/oncotarget.15031.

Ikeda, Sadakatsu, Aaron M. Goodman, Philip R. Cohen, Taylor J. Jensen, Christopher K. Ellison, Garrett Frampton, Vincent Miller, Sandip P. Patel, and Razelle Kurzrock. 2016. "Metastatic Basal Cell Carcinoma with Amplification of PD-L1: Exceptional Response to Anti-PD1 Therapy." *Npj Genomic Medicine* 1(August):1–5. doi: 10.1038/npjgenmed.2016.37.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ikeda, Seiichi, Tatsuro Okamoto, Shinji Okano, Yuichiro Umemoto, Tetsuzo Tagawa, Yosuke Morodomi, Mikihiro Kohno, Shinichiro Shimamatsu, Hirokazu Kitahara, Yuzo Suzuki, Takatoshi Fujishita, and Yoshihiko Maehara. 2016. "PD-L1 Is Upregulated by Simultaneous Amplification of the PD-L1 and JAK2 Genes in Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 11(1):62–71. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.010.

Inoue, Yusuke, Katsuhiro Yoshimura, Kazutaka Mori, Nobuya Kurabe, Tomoaki Kahyo, Hiroki Mori, Akikazu Kawase, and Masayuki Tanahashi. n.d. "Clinical Significance of PD - L1 and PD - L2 Copy Number Gains in Non - Small - Cell Lung Cancer." 7(22).

Inoue, Yusuke, Katsuhiro Yoshimura, Kazutaka Mori, Nobuya Kurabe, Tomoaki Kahyo, Hiroki Mori, Akikazu Kawase, Masayuki Tanahashi, Hiroshi Ogawa, Naoki Inui, Kazuhito Funai, Kazuya Shinmura, Hiroshi Niwa, Takafumi Suda, and Haruhiko Sugimura. 2016. "Clinical Significance of <I>PD-L1</I> and <I>PD-L2</I> Copy Number Gains in Non-Small-Cell Lung Cancer." *Oncotarget* 7(22). doi: 10.18632/oncotarget.8528.

Komori, Takashi. 2022. "The 2021 WHO Classification of Tumors, 5th Edition, Central Nervous System Tumors: The 10 Basic Principles." *Brain Tumor Pathology* 39(2):47–50. doi: 10.1007/s10014-022-00428-3.

Larsen, Trine Vilsbøll, Dianna Hussmann, and Anders Lade Nielsen. 2019. "PD-L1 and PD-L2 Expression Correlated Genes in Non-Small-Cell Lung Cancer." *Cancer Communications* 39(1):1–14. doi: 10.1186/s40880-019-0376-6.

Li, Qiu Ju, Jin Quan Cai, and Cheng Yin Liu. 2016. "Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma." *Chinese Medical Journal* 129(4):464–71. doi: 10.4103/0366-6999.176065.

Litak, Jakub, Marek Mazurek, Cezary Grochowski, Piotr Kamieniak, and Jacek Roliński. 2019. "PD-L1/PD-1 Axis in Glioblastoma Multiforme." *International Journal of Molecular Sciences* 20(21):5347. doi: 10.3390/ijms20215347.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Louis, David N., Arie Perry, Pieter Wesseling, Daniel J. Brat, Ian A. Cree, Dominique Figarella-Branger, Cynthia Hawkins, H. K. Ng, Stefan M. Pfister, Guido Reifenberger, Riccardo Soffietti, Andreas Von Deimling, and David W. Ellison. 2021. "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Neuro-Oncology* 23(8):1231–51. doi: 10.1093/neuonc/noab106.

Makuku, Rangarirai, Neda Khalili, Sepideh Razi, Mahsa Keshavarz-Fathi, and Nima Rezaei. 2021. "Current and Future Perspectives of PD-1/PDL-1 Blockade in Cancer Immunotherapy." *Journal of Immunology Research* 2021. doi: 10.1155/2021/6661406.

Melhem, Jawad M., Jay Detsky, Mary Jane Lim-Fat, and James R. Perry. 2022. "Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma." *Neurotherapeutics*. doi: 10.1007/s13311-022-01251-6.

Montemurro, Nicola. 2020. "Glioblastoma Multiforme and Genetic Mutations: The Issue Is Not over YetAn Overview of the Current Literature." *Journal of Neurological Surgery, Part A: Central European Neurosurgery* 81(1):64–70. doi: 10.1055/s-0039-1688911.

Nallasamy, Palanisamy, Srinivas Chava, Sumit S. Verma, Shruti Mishra, Santhi Gorantla, Don W. Coulter, Siddappa N. Byrareddy, Surinder K. Batra, Subash C. Gupta, and Kishore B. Challagundla. 2018. "PD-L1, Inflammation, Non-Coding RNAs, and Neuroblastoma: Immuno-Oncology Perspective." *Seminars in Cancer Biology* 52(Pt 2):53–65. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.009.

Narayan, Sridhar, Eric M. Carlson, Hongsheng Cheng, Krista Condon, Hong Du, Sean Eckley, Yongbo Hu, Yimin Jiang, Vipul Kumar, Bryan M. Lewis, Philip Saxton, Edgar Schuck, Boris M. Seletsky, Karen Tendyke, Huiming Zhang, Wanjun Zheng, Bruce A. Littlefield, Murray J. Towle, and Melvin J. Yu. 2011. "Novel Second Generation Analogs of Eribulin. Part III: Blood-Brain Barrier Permeability and in Vivo Activity in a Brain Tumor Model." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(6):1639–43. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.01.096.

Ohgaki, Hiroko. 2009. "Epidemiology of Brain Tumors." *Methods in Molecular Biology* 472:323–42. doi: 10.1007/978-1-60327-492-0_14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ph, D., Faith G. Davis, D. Ph, Dora Il, D. Ph, Carol Kruchko, J. Mccarthy, D. Ph, Preetha Rajaraman, D. Ph, Judith A. Schwartzbaum, and D. Ph. 2010. "NIH Public Access." 113:1953–68. doi: 10.1002/cncr.23741.Brain.

Qin, Anna, Anna Musket, Phillip R. Musich, John B. Schweitzer, and Qian Xie. 2021. "Receptor Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Glioblastoma: Do Signaling Pathways Matter?" *Neuro-Oncology Advances* 3(1):1–12. doi: 10.1093/noajnl/vdab133.

Razavi, Seyed Mostafa, Karen E. Lee, Benjamin E. Jin, Parvir S. Aujla, Sharareh Gholamin, and Gordon Li. 2016. "Immune Evasion Strategies of Glioblastoma." *Frontiers in Surgery* 3(March):1–9. doi: 10.3389/fsurg.2016.00011.

Le Rhun, Emilie, Matthias Preusser, Patrick Roth, David A. Reardon, Martin van den Bent, Patrick Wen, Guido Reifenberger, and Michael Weller. 2019. "Molecular Targeted Therapy of Glioblastoma." *Cancer Treatment Reviews* 80(August). doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101896.

Richterová, Romana, and Branislav Kolarovszki. 2016. "Genetic Alterations of Glioblastoma." *Neurooncology - Newer Developments*. doi: 10.5772/63127.

Roemer, Margaretha G. M., Ranjana H. Advani, Azra H. Ligon, Yasodha Natkunam, Robert A. Redd, Heather Homer, Courtney F. Connelly, Heather H. Sun, Sarah E. Daadi, Gordon J. Freeman, Philippe Armand, Bjoern Chapuy, Daphne De Jong, Richard T. Hoppe, Donna S. Neuberg, Scott J. Rodig, and Margaret A. Shipp. 2016. "PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome." *Journal of Clinical Oncology* 34(23):2690–97. doi: 10.1200/JCO.2016.66.4482.

Rotman, Jossie, Leontine A. S. de. Otter, Maaike C. G. Bleeker, Sanne S. Samuels, A. Marijne Heeren, Margaretha G. M. Roemer, Gemma G. Kenter, Henry J. M. A. A. Zijlmans, Nienke E. van Trommel, Tanja D. de Gruijl, and Ekaterina S. Jordanova. 2020. "PD-L1 and PD-L2 Expression in Cervical Cancer: Regulation and Biomarker Potential." *Frontiers in Immunology* 11(December):1–15. doi: 10.3389/fimmu.2020.596825.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Sharpe, Arlene H., and Kristen E. Pauken. 2018a. "The Diverse Functions of the PD1 Inhibitory Pathway." *Nature Reviews Immunology* 18(3):153–67. doi: 10.1038/nri.2017.108.

Soomro, Shahid Hussain, Li Rui Ting, Yang Yi Qing, and Mingxin Ren. 2017. "Molecular Biology of Glioblastoma: Classification and Mutational Locations." *Journal of the Pakistan Medical Association* 67(9):1410–14.

Straub, Melanie, Enken Drecoll, Nicole Pfarr, Wilko Weichert, Rupert Langer, Alexander Hapfelmeier, Carolin Götz, Klaus-Dietrich Wolff, Andreas Kolk, and Katja Specht. 2016. "*CD274/PD-L1* Gene Amplification and PD-L1 Protein Expression Are Common Events in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity." *Oncotarget* 7(11). doi: 10.18632/oncotarget.7593.

Sun, Chong, Riccardo Mezzadra, and Ton N. Schumacher. 2018. "Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint." *Immunity* 48(3):434–52. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.014.

TAMIMI, AHMAD FALEH, and MALIK JUWEID. 2017. "Epidemiology and Outcome of Glioblastoma." *Glioblastoma* 143–53. doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8.

Tan, Aaron C., David M. Ashley, Giselle Y. López, Michael Malinzak, Henry S. Friedman, and Mustafa Khasraw. 2020. "Management of Glioblastoma: State of the Art and Future Directions." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70(4):299–312. doi: 10.3322/caac.21613.

Taylor, Olivia G., Joshua S. Brzozowski, and Kathryn A. Skelding. 2019. "Glioblastoma Multiforme : An Overview of Emerging Therapeutic Targets." 9(September):1–11. doi: 10.3389/fonc.2019.00963.

Wang, Qi, Kankana Bardhan, Vassiliki A. Boussiotis, and Nikolaos Patsoukis. 2021. "The PD-1 Interactome." *Advanced Biology* 5(9). doi: 10.1002/adbi.202100758.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Wang, Xin, Gaochao Guo, Hui Guan, Yang Yu, Jie Lu, and Jinming Yu. 2019. "Challenges and Potential of PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade Immunotherapy for Glioblastoma." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38(1):87. doi: 10.1186/s13046-019-1085-3.

Wang, Zheng, Chuanbao Zhang, Xing Liu, Zhiliang Wang, Lihua Sun, Guanzhang Li, Jingshan Liang, Huimin Hu, Yanwei Liu, Wei Zhang, and Tao Jiang. 2016. "Molecular and Clinical Characterization of PD-L1 Expression at Transcriptional Level via 976 Samples of Brain Glioma." *OncoImmunology* 5(11):1–9. doi: 10.1080/2162402X.2016.1196310.

Wang, Zhi liang, Guan zhang Li, Qiang wei Wang, Zhao shi Bao, Zheng Wang, Chuan bao Zhang, and Tao Jiang. 2019a. "PD-L2 Expression Is Correlated with the Molecular and Clinical Features of Glioma, and Acts as an Unfavorable Prognostic Factor." *OncoImmunology* 8(2):1–9. doi: 10.1080/2162402X.2018.1541535.

Wang, Zhi liang, Guan zhang Li, Qiang wei Wang, Zhao shi Bao, Zheng Wang, Chuan bao Zhang, and Tao Jiang. 2019b. "PD-L2 Expression Is Correlated with the Molecular and Clinical Features of Glioma, and Acts as an Unfavorable Prognostic Factor." *OncoImmunology* 8(2):1–9. doi: 10.1080/2162402X.2018.1541535.

Weller, Michael, Wolfgang Wick, Ken Aldape, Michael Brada, Mitchell Berger, Stefan M. Pfister, Ryo Nishikawa, Mark Rosenthal, Patrick Y. Wen, Roger Stupp, and Guido Reifenberger. 2015. "Glioma." *Nature Reviews Disease Primers* 1(1):15017. doi: 10.1038/nrdp.2015.17.

Wen, Patrick Y., Michael Weller, Eudocia Quant Lee, Brian M. Alexander, Jill S. Barnholtz-Sloan, Floris P. Barthel, Tracy T. Batchelor, Ranjit S. Bindra, Susan M. Chang, E. Antonio Chiocca, Timothy F. Cloughesy, John F. DeGroot, Evanthia Galanis, Mark R. Gilbert, Monika E. Hegi, Craig Horbinski, Raymond Y. Huang, Andrew B. Lassman, Emilie Le Rhun, Michael Lim, Minesh P. Mehta, Ingo K. Mellinghoff, Giuseppe Minniti, David Nathanson, Michael Platten, Matthias Preusser, Patrick Roth, Marc Sanson, David Schiff, Susan C. Short, Martin J. B. Taphoorn, Joerg Christian Tonn, Jonathan Tsang, Roel G. W. Verhaak, Andreas von Deimling, Wolfgang Wick, Gelareh Zadeh, David A. Reardon, Kenneth D. Aldape, and Martin J. van den Bent. 2020. "Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions." *Neuro-Oncology* 22(8):1073–1113. doi: 10.1093/neuonc/noaa106.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Xue, Song, Man Hu, Veena Iyer, and Jinming Yu. 2017. “Blocking the PD-1/PD-L1 Pathway in Glioma: A Potential New Treatment Strategy.” *Journal of Hematology & Oncology* 10(1):81. doi: 10.1186/s13045-017-0455-6.

Xue, Song, Man Hu, Peifeng Li, Ji Ma, Li Xie, Feifei Teng, Yufang Zhu, Bingjie Fan, Dianbin Mu, and Jinming Yu. 2017. “Relationship between Expression of PD-L1 and Tumor Angiogenesis, Proliferation, and Invasion in Glioma.” *Oncotarget* 8(30):49702–12. doi: 10.18632/oncotarget.17922.

Yamaoka, Kunihiro, Pipsa Saharinen, Marko Pesu, Vance E. T. Holt, Olli Silvennoinen, John J. O’Shea, and John J. O’Shea. 2004. “The Janus Kinases (Jaks).” *Genome Biology* 5(12):253. doi: 10.1186/gb-2004-5-12-253.

Yearley, Jennifer H., Christopher Gibson, Ni Yu, Christina Moon, Erin Murphy, Jonathan Juco, Jared Lunceford, Jonathan Cheng, Laura Q. M. Chow, Tanguy Y. Seiwert, Masahisa Handa, Joanne E. Tomassini, and Terrill McClanahan. 2017. “PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer.” *Clinical Cancer Research* 23(12):3158–67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1761.

Yuan, Feng, Yingshuai Wang, and Chiyuan Ma. 2022. “Current WHO Guidelines and the Critical Role of Genetic Parameters in the Classification of Glioma: Opportunities for Immunotherapy.” *Current Treatment Options in Oncology* 23(2):188–98. doi: 10.1007/s11864-021-00930-4.

Zeng, Jing, Xin Ke Zhang, Hua Dong Chen, Zhi Hai Zhong, Qiu Liang Wu, and Su Xia Lin. 2016. “Expression of Programmed Cell Death-Ligand 1 and Its Correlation with Clinical Outcomes in Gliomas.” *Oncotarget* 7(8):8944–55. doi: 10.18632/oncotarget.6884.