



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOMLARDA GENOMİK VE MİTOKONDRIYAL
VARYASYONLARIN HASTALIK BİYOLOJİSİNE ETKİSİ**

ŞİRİN YÜKSEL KILIÇTURGAY
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN

Dr. Öğretim Üyesi Cemaliye Akyerli Boylu

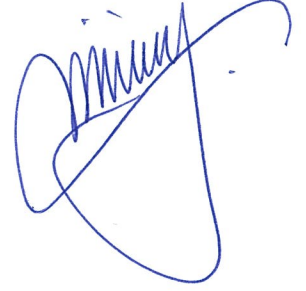
İSTANBUL-2020

BEYAN

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

20.01.2020

Şirin Yüksel Kılıçturgay



Doktor olmamı çok arzu eden, evrende bir yerlerde beni izlediğine,
desteklediğine ve koruyup kolladığına emin olduğum
melek ANNEM'e, sonsuz sevgi ve özlemlerle...

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının nükleer genetik analiz kısmı 112s149 nolu 1001 projesi ile TÜBİTAK, mitokondriyal genom analiz kısmı ise 2018/03/02 nolu proje ile ABAPKO tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi ve Acıbadem Genetik Tanı Merkezi olanakları kullanılmıştır.

Öncelikle, bu süreçte bana güvenerek motive eden, anlayış ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, öğretim görevlisi olmama olanak sağlayan, eğitimimin yanı sıra her konuda sonsuz desteğini gördüğüm, değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Cemaliye AKYERLİ BOYLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince tecrübe ve bilgilerini aktaran, başta program koordinatörü Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü "Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora Programı"nda görev alan tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Engin YILMAZ, Doç. Dr. Kanay YARARBAŞ ve Doç. Dr. Özden HATIRNAZ NG'ye gerek çalışmamın yönlendirilmesinde değerli yorumlarıyla sağladıkları önemli katkılar, gerekse fiziksel destekleri için çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının temelini oluşturan hasta örneklerini sağlayan, hasta verilerini paylaşan, çalışma ekibimizi her fırsatta motive etmek için uğraşan, Prof. Dr. Koray ÖZDUMAN'a çalışmalara sağladığı her tür katkı için teşekkür ederim. Ayrıca, kurucu rektörümüz ve Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Necmettin PAMİR ve çalışma ekibimizin değerli üyeleri Doç. Dr. Özge CAN,

Doç. Dr. Ayça ERŞEN DANYELİ ve Dr. Öğr. Üyesi Yavuz OKTAY'a da teşekkür ederim.

İstatistiksel analiz ve veri değerlendirme konusunda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Emel TİMUÇİN'e ve katkılarından dolayı Dr. Ecnur TUÇ, Dr. Ege ÜLGEN ve Nogayhan SEYMEN'e teşekkür ederim.

Acıbadem Genetik Tanı Merkezi'nde edindiğim laboratuvar tecrübemi akademik olarak da desteklememe olanak sağlayan, bu süreçte öğretim görevlisi olmama destek olan müdürüm ve dekanım Prof. Dr. Mustafa Cengiz YAKICIER'e teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim süresince de bana olan güvenleri, karşılıksız destekleri, tükenmeyen sevgi ve anlayışları ile daima yanımda olan biricik ailem ve eşime, bu süreçte dünyaya gelen prenses kızım İnci'ye, son tez dönemini aynı bedende geçirdiğimiz bıdık Oğlum'a da sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
TABLOLAR LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Glial Tümörler.....	6
2.1.1. Epidemiyoloji.....	7
2.1.2. Sınıflandırma.....	8
2.1.3. Etiyoloji, klinik özellikler ve prognoz.....	10
2.1.4. Moleküler parametreler.....	12
2.1.4.1. İzositrat dehidrogenaz (<i>IDH1</i> ve <i>IDH2</i>) mutasyonları.....	13
2.1.4.2. 1p19q kodelesyonu ve <i>FUBP1</i> ile <i>CIC</i> geni mutasyonları.....	16
2.1.4.3. Telomeraz revers transkriptaz (<i>TERT</i>) mutasyonları.....	17
2.1.4.4. Diğer moleküler parametreler.....	18
2.2. Mitokondri.....	20
2.2.1. Mitokondrinin yapısı ve fonksiyonu.....	20
2.2.2. Mitokondriyal genom.....	22
2.2.2.1. Heteroplazmi ve eşik değeri etkisi.....	26
2.2.2.2. Haplogrup.....	28
2.2.3. Mitokondriyal mutasyonlar ve hastalık ilişkisi.....	30
2.2.4. Mitokondriyal varyantlar ve kanser ilişkisi.....	31

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Gereç.....	35
3.1.1. Hasta örnekleri.....	35
3.1.2. Cihazlar.....	36
3.1.3. Kimyasallar ve kitler.....	37
3.1.4. Cam ve plastik malzemeler.....	38
3.1.5. Oligonükleotitler.....	39
3.1.6. Standart solüsyonlar ve tampon çözeltiler.....	39
3.1.6.1. PZR'ye uygun steril distile H ₂ O.....	40
3.1.6.2. dNTP kokteyli.....	40
3.2. Yöntem.....	40
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	40
3.2.1.1. Periferik kandan DNA izolasyonu.....	41
3.2.1.2. Sıvı azotta saklanan tümör örneklerinden DNA izolasyonu.....	41
3.2.1.3. Oda sıcaklığında saklanan parafin bloklardan elde edilen kesitlerden DNA izolasyonu.....	42
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	43
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi.....	45
3.2.4. Restriksiyon enzim kesimi.....	46
3.2.5. PZR ürün saflaştırma.....	46
3.2.6. DNA dizi analizi.....	47
3.2.6.1. Dizi analizi reaksiyonu.....	47
3.2.6.2. Otomatik DNA dizi analizi ve verilerin incelenmesi.....	48
3.2.7. Minidizileme analizi.....	48
3.2.7.1. Minidizileme analizi reaksiyonu.....	48
3.2.7.2. Otomatik minidizileme analizi ve verilerin incelenmesi.....	49
3.2.8. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi.....	50
3.2.8.1. Mitokondriyal genomun amplifikasyonu ve kantifikasyonu.....	50
3.2.8.2. Kütüphane hazırlanması.....	52
3.2.8.3. Yeni nesil dizi analizi ve verilerin incelenmesi.....	54
3.2.8.4. İstatistiksel analiz.....	54

3.2.8.5. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması.....	55
3.3. Sınırlılıklar.....	56
4. BULGULAR.....	58
4.1. Dizileme Analizi Yapılan Hastaların Genel Bilgileri.....	58
4.2. <i>IDH1</i> 132. Kodon Mutasyonlarının Analizi.....	59
4.2.1. <i>IDH1</i> R132 mutasyonlarının <i>PvuI</i> enzim kesimi ile saptanması.....	59
4.2.2. <i>IDH1</i> R132 mutasyonuna sahip örneklerin genotip tayini için Sanger dizi analizi.....	60
4.2.3. <i>IDH1</i> R132 mutasyonunun minidizileme yöntemi ile saptanması.....	61
4.3. <i>IDH2</i> R140 ve R172 Mutasyonlarının Analizi.....	63
4.3.1. <i>IDH2</i> R140 ve R172 mutasyonlarının Sanger dizi analizi ile saptanması	63
4.3.2. <i>IDH2</i> R140 ve R172 mutasyonları için minidizileme analizi.....	63
4.4. <i>TERT</i> Promotör C228T ve C250T Mutasyonlarının Analizi.....	65
4.4.1. <i>TERT</i> C228T ve C250T mutasyonlarının Sanger dizi analizi ile saptanması.....	65
4.4.2. <i>TERT</i> C228T ve C250T mutasyonlarının minidizileme analizi.....	65
4.5. rs55705857 Polimorfizmi İçin Minidizileme Analizi.....	67
4.6. <i>IDH</i> ve <i>TERT</i> Promotör Mutasyonlarının Birlikte Değerlendirilmesi.....	68
4.7. Mitokondriyal DNA Yeni Nesil Dizi Analizi.....	70
4.7.1. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi yapılan örneklerin genel bilgileri.....	70
4.7.2. Mitokondriyal genomun amplifikasyonu.....	72
4.7.3. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi verilerinin değerlendirilmesi.....	72
4.7.3.1. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyon sayıları.....	72
4.7.3.2. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonların heteroplazmi durumları.....	73
4.7.3.3. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonlar.....	77
4.7.3.4. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonların patojenite skorlamaları.....	79

4.7.3.5. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinde saptanan varyasyonların somatik mutasyon analizi.....	81
4.7.4. Verilerin istatistiksel analizi.....	85
4.7.4.1. Toplam mitokondriyal genom varyasyon sayılarının ve bölgelere göre varyasyon frekanslarının karşılaştırılması.....	85
4.7.4.2. Saptanan mitokondriyal varyantların karşılaştırılması.....	88
4.7.5. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması.....	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	93
5.1. Tartışma.....	93
5.1.1. <i>IDH1</i> ve <i>IDH2</i> genlerindeki mutasyonların analizi.....	94
5.1.2. <i>TERT</i> promotör C228T ve C250T mutasyonlarının analizi.....	95
5.1.3. <i>IDH</i> ve <i>TERT</i> promotör mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesi.....	95
5.1.4. rs55705857 polimorfizminin minidizileme analizi.....	96
5.1.5. Tümör örneklerinin mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi.....	97
5.2. Sonuç.....	104
5.3. Çalışmanın Gelecek Planları.....	105
6. KAYNAKLAR.....	107
7. EKLER.....	115
Ek 1: Aydınlatılmış onam formları.....	116
Ek 2: Etik Kurul kararları.....	120
Ek 3: Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları.....	123
Ek 4: Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.....	132
Ek 5: Sözlü bildiri.....	142
Ek 6: Makale (gönderilmiş).....	143
Ek 7: Makale.....	144
8. ÖZGEÇMİŞ.....	157

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

α -KG	α -ketoglutarat
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
ATRX	X-bağımlı α -talasemi/mental retardasyon sendromu
bç	Baz çifti
BS	Bağlanma (annealing) sıcaklığı
CDKN2A	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CIC	Capicua transkripsiyonel repressör
D2-HG	D-2-hidroksiglutarat
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfatlar
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EtBr	Etidyum bromür
ETS	E26 transformasyon-spesifik
FUBP1	Uzak upstream element bağlama proteini 1
GABPA	GA-bağlanma proteini alfa ünitesi
GBM	Glioblastom multiform
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HIF-1 α	Hipoksi indükleyen faktör 1 α
IDH	İzositrat dehidrogenaz
indel	İnsersiyon / delesyon
kb	Kilobaz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nDNA	Nükleer DNA
PBS	Phosphate buffered saline
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog

PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RB1	Retinoblastom-ilişkili protein 1
rCRS	Revize Cambridge Referans Dizisi (revised Cambridge Reference Sequence)
rRNA	Ribozomal RNA
RTK	Reseptör tirozin kinaz
TBE	Tris - borik asit - EDTA
TERT	Telomeraz revers transkriptaz
Tm	Melting temperature
TP53	Tümör proteini 53
tRNA	Transfer RNA
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Primer santral sinir sistemi tümörlerinin seyir dağılımları.....	7
Şekil 2: Nöroglial köken ağacı.....	8
Şekil 3: Erişkin diffüz gliomların DSÖ 2016 sınıflandırmasına dahil olan moleküler alt tiplendirmesi.....	10
Şekil 4: Erişkin diffüz gliomların önemli moleküler parametrelere göre sınıflandırılması.....	13
Şekil 5: Mutant IDH enzimlerinin değişmiş enzim aktivitesi.....	14
Şekil 6: Gliomlarda görülen özgül <i>IDH</i> mutasyonlarının frekansları.....	15
Şekil 7: Farklı regülatör elementler ve kansere özgü mutasyonların yerleşimi ile <i>TERT</i> promotörün yapısı.....	18
Şekil 8: Mitokondrinin yapısı.....	21
Şekil 9: Oksidatif fosforilasyon sisteminin protein kompleksleri.....	23
Şekil 10: Mitokondriyal DNA.....	25
Şekil 11: Mitokondriyal heteroplazmi ve biyokimyasal eşik değeri etkisi.....	27
Şekil 12: Mitokondriyal haplogrup dağılımları.....	29
Şekil 13: mtDNA genomu yeni nesil dizi analizi deney akış şeması özeti.....	50
Şekil 14: “Nextera XT kütüphane hazırlama kiti” çalışma prensibi.....	53
Şekil 15: <i>PvuI</i> restriksiyon enzim kesimi sonucu.....	59
Şekil 16: <i>IDH1</i> 132. kodon genotipinin Sanger dizileme sonucu.....	60
Şekil 17: <i>IDH1</i> 132. kodon mutasyonlarının minidizileme sonuçları.....	62
Şekil 18: <i>IDH2</i> geninde Sanger dizileme sonucunda 172. kodonda saptanan R172K mutasyonu.....	63
Şekil 19: <i>IDH2</i> geni 140 ve 172. kodon mutasyonlarının minidizileme sonuçları... 64	
Şekil 20: <i>TERT</i> promotör bölgesi Sanger dizileme sonucunda saptanan C228T mutasyonu.....	66
Şekil 21: <i>TERT</i> promotör C228 ve C250 mutasyonlarının saptanması amacıyla yapılan minidizileme sonuçları.....	66
Şekil 22: rs55705857 polimorfizminin minidizileme sonuçları.....	67

Şekil 23: Histopatolojik sınıflandırmadan bağımsız olarak <i>IDH / TERT</i> durumuna göre moleküler alt gruplara ayrılan hastaların insidansları.....	69
Şekil 24: Hasta sağkalımlarının moleküler alt gruplara göre değerlendirilmesi.....	69
Şekil 25: Takara LA Taq polimeraz ile yapılan mtDNA PZR sonucu.....	72
Şekil 26: mtDNA yeni nesil dizi analizinde saptanan varyasyon sayıları.....	73
Şekil 27: mtDNA analizindeki varyasyonların heteroplazmi değerlendirmesi.....	74
Şekil 28: Varyasyonların mitokondriyal genomda bulunduğu bölgeler.....	77
Şekil 29: Varyasyonlardaki nükleotit değişikliklerinin dağılımı.....	78
Şekil 30: Mitokondriyal varyasyon sayıları ve bölgelere göre frekansları.....	79
Şekil 31: Bölgelere göre somatik mitokondriyal varyasyon frekanslarının literatür ile karşılaştırılması.....	83
Şekil 32: Bölgelere göre somatik mitokondriyal varyasyon frekanslarının literatürdeki gliom dışı kanser frekansları ile karşılaştırılması.....	84
Şekil 33: Bölgelere göre varyasyon frekanslarının cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama ve <i>IDH1</i> R132H mutasyonu durumlarına göre istatistiksel karşılaştırılması.....	86
Şekil 34: mtDNA'da Sanger analizi ile saptanan varyasyonlar.....	90

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Mitokondriyal DNA gen yerleşimleri.....	24
Tablo 2: Farklı kanser türleri ile ilişkilendirilmiş mtDNA mutasyonları.....	34
Tablo 3: Kimyasal ve kitlerin temin edildiği firmalar.....	37
Tablo 4: <i>IDH1</i> R132, <i>IDH2</i> R140 ve R172, <i>TERT</i> promotör C228T ve C250T mutasyonları ile rs55705857 polimorfizmini kapsayan bölgelerin çoğaltılması için kullanılan primerler.....	44
Tablo 5: PZR koşulları.....	45
Tablo 6: Dizi analizi reaksiyon koşulları.....	48
Tablo 7: <i>IDH1</i> R132, <i>IDH2</i> R140 ve R172, <i>TERT</i> promotör C228T ve C250T mutasyonları ile rs55705857 polimorfizminin minidizileme analizi için kullanılan primerler.....	49
Tablo 8: Minidizileme analizi reaksiyon koşulları.....	50
Tablo 9: Tüm mitokondriyal genomun çoğaltılması amacıyla kullanılan PZR primerleri.....	51
Tablo 10: Long-range (uzun) PZR koşulları.....	51
Tablo 11: Sınırlı döngüdeki PZR koşulları.....	53
Tablo 12: <i>mt-TR</i> ve <i>DLOOP1</i> lokuslarının çoğaltılması ve Sanger analizi için kullanılan primerler.....	56
Tablo 13: Dizileme analizi yapılan hastaların genel bilgileri.....	58
Tablo 14: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların <i>IDH1</i> R132 genotip özeti.....	62
Tablo 15: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların <i>IDH2</i> genotip (R140 ve R172 mutasyonları) özeti.....	65
Tablo 16: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların <i>TERT</i> promotör (C228 ve C250 mutasyonları) genotip özeti.....	67
Tablo 17: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların rs55705857 polimorfizmi genotip özeti.....	68
Tablo 18: mtDNA yeni nesil dizi analizi yapılan hastaların genel bilgileri.....	71

Tablo 19: mtDNA yeni nesil dizi analizi çalışılan örnek bilgileri ve genel değerlendirmeleri.....	75
Tablo 20: Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonların patojenite değerlendirmeleri.....	80
Tablo 21: Tümör ve periferik kan örneklerinin karşılaştırmasında saptanan farklılıklar.....	82
Tablo 22: Mitokondriyal genomdaki toplam varyasyon sayısı ve bölgelere göre frekanslarının belirli özelliklere göre karşılaştırılması.....	87
Tablo 23: Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonların belirli özelliklere göre karşılaştırılması.....	88
Tablo 24: Sanger dizi analizi yapılan hasta bilgileri ve saptanan varyasyonlar.....	91

ÖZET

Gliomlar, en sık görülen primer beyin kanserleridir ve biyolojileri konusunda bilginiz yeterli olmadığından, küratif tedavileri günümüzde mümkün değildir. Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerle, özellikle izositrat dehidrogenaz (*IDH1* ve *IDH2*) ve telomeraz revers transkriptaz (*TERT*) promotör mutasyonlarının glial tümör oluşumu ve sağkalım ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Ancak, mitokondriyal genomdaki değişikliklerin bu süreçteki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bu araştırmanın amacı, gliomlardaki nükleer ve mitokondriyal varyasyonların hastalık biyolojisi üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. İlk olarak, 300 hasta örneğinde *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 / R172) ve *TERT* promotör (C228 / C250) mutasyonları analiz edilmiş ve mutasyon profili göz önünde bulundurularak 4 moleküler alt grup (sadece *IDH*-mutant, sadece *TERT*-mutant, çifte-mutant, çifte-negatif) belirlenmiştir. Bu alt gruplar arasında *IDH* mutasyonuna sahip hastalar daha iyi hastalık seyrine sahipken, sadece *TERT* mutasyonu olan hastaların daha kötü prognoza sahip olduğu gösterilmiştir. İkinci aşamada, 59 hastada mitokondriyal varyasyonlar, haplogruplar ve heteroplazmi oranları yeni nesil dizi analizi ile belirlenmiştir. Mitokondriyal varyasyon ve haplogruplar, nükleer değişkenler (*IDH/TERT* durumu) ve klinik parametrelerle (cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama) karşılaştırılmış ve yapılan istatistiksel analizlerin sonucunda ATP sentaz (*mt-ATP6* p=0,041) ve arjinin tRNA (*mt-TR* p=0,014) genleri ile kontrol bölgesi *DLOOP* (p=0,003) özellikle *IDH* ve *TERT* mutasyonları olmak üzere birçok kategoride anlamlı bulunmuştur. *mt-TR* ve *DLOOP1* bölgeleri Sanger dizileme ile doğrulanmış ve hasta sayısı artırılarak toplam 78 hastada *DLOOP1* T16126C (*IDH* p=0,05), C16278T (*IDH/TERT* p=0,05), C16296T (*IDH/TERT* p=0,01), T16311C (DSÖ p=0,017) varyasyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak, araştırmamız glial tümörlerde mitokondriyal varyasyonların tümör biyolojisini yansıtan nükleer ve klinik değişkenler ile olan ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır ve klinik öneme sahip olabilecek varyasyonlar öne çıkarılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Gliom, Mitokondriyal DNA, Mutasyon, Nükleer DNA, Yeni nesil dizileme

SUMMARY

Effect of Mitochondrial-genomic Diversity and Mutations on Disease Biology in Glial Tumors

Glioma is the most common primary brain cancer, with no possible curative treatment today due to our limited knowledge on its biology. Recently, with the developments in the field of molecular biology, mutations especially in isocitrate dehydrogenase (*IDH1* and *IDH2*) and telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter have been shown to be related with progression and survival of glial tumors. However, the role of mitochondrial genome variations in this process is unknown. The aim of this study is to investigate the effect of nuclear and mitochondrial variations in gliomas on disease biology. First of all, 300 glioma patients were analyzed for *IDH1* (R132), *IDH2* (R140 / R172) and *TERT* promoter (C228 / C250) mutations and 4 molecular subsets (only *IDH*-mutant, only *TERT*-mutant, double-mutant, double-negative) were identified according to the mutation profiles. While *IDH*-mutant patients were demonstrated to have better survival among these subsets, only *TERT*-mutant patients had worse prognosis. In the second part, the mitochondrial variations, haplogroups and heteroplasmy ratios were determined for 59 patients by next generation sequencing. Mitochondrial variations and haplogroups were correlated with nuclear variations (*IDH* / *TERT* status) and clinical parameters (gender, WHO classification, morphological grade). As a result of the statistical analysis, ATP synthase (*mt-ATP6* p=0.041), arginine tRNA (*mt-TR* p=0.014) genes and control region *DLOOP* (p=0.003) were found to be significant in several categories, including the *IDH* and *TERT* status. In order to confirm *mt-TR* and *DLOOP1* loci and increase the patient number, Sanger sequencing was used and *DLOOP1* T16126C (*IDH* p=0.05), C16278T (*IDH/TERT* p=0.05), C16296T (*IDH/TERT* p=0.01), T16311C (WHO p=0.017) variations were found to be statistically significant in total of 78 patients. In conclusion, our study is the first to analyze the association of mitochondrial variations with nuclear and clinical parameters representing tumor biology and the importance of variations that may have clinical importance were highlighted.

Keywords: Glioma, Mitochondrial DNA, Mutations, Next generation sequencing, Nuclear DNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gliyal tümörler (gliomlar) histolojik ve moleküler olarak heterojenite gösteren ve neuroglial progenitör hücrelerden geliştiği düşünülen bir tümör grubudur (1) ve bütün primer beyin tümörlerinin yaklaşık %30'unu (2), malign primer beyin tümörlerinin ise %80'ini oluşturmaktadırlar (3). Tedavileri tüm bilimsel, teknolojik ve tıbbi gelişmelere rağmen yüz güldürücü değildir. Bunun asıl nedeni gliyal tümör biyolojisinin yeterli bilinmemesi, moleküler tanıların ve sınıflamaların yetersiz olmasıdır.

2013 yılında gliyal tümörler ile ilk çalışmaya başladığımızda, erişkin diffüz gliomlar histolojik özelliklerine göre (oligodendrogliom, astrositom ve oligoastrositom) sınıflandırılıyordu (2007 Dünya Sağlık Örgütü santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırması) (4). Gliomlar ile ilişkili olarak en iyi bilinen moleküler parametre hücrede oksidatif strese yol açarak kanseri tetiklediği bilinen izositrat dehidrogenaz 1 (*IDH1*) ve *IDH2* genleriydi (5). Ayrıca, artmış telomeraz aktivitesi sonucunda telomerlerin korunmasına ve tümörlerin senesensten (yaşlanma) kaçışına olanak sağlayan telomeraz revers transkriptaz (*TERT*) geni promotör mutasyonları da yeni tanımlanmıştı (6, 7). Bu nedenle, geniş bir gliom hasta örnekleminde gliyal tümör biyolojisi ile moleküler parametreleri ilişkilendirebilmek önem taşımaktaydı.

Bu genlerin yanısıra, 8q24.21 kromozom bölgesindeki rs55705857 polimorfizminin özellikle *IDH*-mutant gliyal tümörlere yatkınlığı arttırdığı gösterilmişti (8). Çalışma ekibimiz tarafından rs55705857 polimorfizmi de analiz edilmiş ve kontrol grubu (sağlıklı bireyler ve farklı kanserler) ile yapılan karşılaştırmada bu polimorfizmin *IDH*-mutant gliyal tümör geliştirme riskini 16 kata kadar arttırdığı saptanmıştır. Bu risk artışında *MYC* proto-onkogeninin düzenlenme bozukluğunun etkili olabileceği de gösterilmiştir (9).

2016 yılında moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler sonucunda, sadece patolojik kriterlere dayalı olan 2007 sınıflandırmasında bir iyileştirme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Sınıflandırmadaki güncelleme ile moleküler parametrelerin (*IDH* mutasyonu ve 1p/19q kodelesyonu) tanı amaçlı kullanılması önerilmiştir (10).

Mitokondri, hücrenin enerji ve hücre yapı taşlarının üretimi için vazgeçilmez bir organeldir. Kanser gibi hücre büyümesi ve çoğalmasının hızlı ve büyük ölçekte olduğu durumlarda da enerji ve yapıtaşı sağladığı için anahtar rodedir (11). Mitokondriyal genom nükleer genoma göre son derece küçük ve hücre genomundan farklı olarak, matrilineal kalıtım gösteren ayrı bir genoma sahiptir (12, 13). Mitokondriyal genom az sayıda ve hücre sağkalımı için önemli genleri kodlamaktadır. Bu genlerin kanserde değişen ihtiyaçlara nasıl uyum sağladığı bugün için bilinmemektedir. Mitokondriyal DNA'da (mtDNA) meydana gelen ağır mutasyonlar hücre içinde normal mtDNA ile karışık halde bulunurlar (heteroplazmi) (14, 15). Mutant mtDNA yüzdesinin artışı, enerji metabolizmasındaki hasarı arttırmaktadır. Bu durum, bazal enerji ihtiyacının yüksek ve mevcut deponun düşük olduğu beyin dokusunun kanserlerinde daha da ön plana çıkmaktadır (15). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ileri evre gliom olan glioblastomlarda (GBM) mtDNA mutasyonları gösterilmiştir (16, 17). Ayrıca, mitokondriyal genomda insanlar ve insan toplulukları arasındaki polimorfizm kombinasyonunun meydana getirdiği haplogrupların kanser yatkınlığını direkt olarak etkileyebileceği bildirilmiştir (11, 18).

Bu çalışmanın amacı, nükleer ve mitokondriyal genomun gliom biyolojisi üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. İlk aşamada, büyük bir hasta örnekleminde belirli nükleer varyasyonlar incelenecektir. İkinci aşamada, mitokondriyal genom yeni nesil yöntemlerle dizilenecektir. Ortaya konacak nükleer ve mitokondriyal varyasyonların tümör biyolojisini yansıtan klinik değişkenler ile olan ilişkisi analiz edilecektir. Araştırmanın hedefleri maddeler halinde aşağıda belirtilmiştir:

- 1- Geniş bir gliom hasta örnekleminde belirli nükleer genomik varyasyonların (*IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C250 ve C228 mutasyonları) incelenmesi;
- 2- Mitokondriyal genom için yeni nesil yöntemlerle dizileme yapılması, elde edilen verilerin değerlendirilmesi (mitokondriyal varyasyonların, heteroplazmi oranları ile haplogrupların belirlenmesi);
- 3- Saptanacak mitokondriyal varyasyonların belirli değişkenlerle olan ilişkisinin istatistiksel analizi [cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, nükleer genetik değişiklikler (*IDH*, *IDH/TERT* durumu), haplogruplar];
- 4- İstatistiksel analiz sonucunda anlamlı çıkan mitokondriyal bölgelerdeki varyasyonların doğrulanması ve çalışılan hasta sayısının artırılması amacıyla Sanger dizi analizi.

Bu çalışmada, daha yaygın araştırılmış nükleer genomun yanısıra mitokondriyal genomun da gliyal tümör biyolojisine etkisi araştırılacaktır. Nükleer genomdan farklı olan mitokondri biyolojisinin beyin tümörlerinin davranışına etkisi yeni ve az araştırılmış bir alandır. Literatürde, gliyal tümörlerde, mtDNA mutasyon ve polimorfizmleri çalışılan sadece birkaç makale mevcuttur (16, 17). Literatürden bildiğimiz kadarıyla şu ana kadar gliyal tümörlerde, nükleer DNAdaki değişikliklerle, mtDNA varyasyonları ve haplogrupları arasında ilişki kurulabilen bir çalışma bulunmamaktadır. Nadiren çalışılmış ve kanserdeki rolü tam olarak bilinmeyen mtDNA genomunun araştırılması, son derece önemlidir.

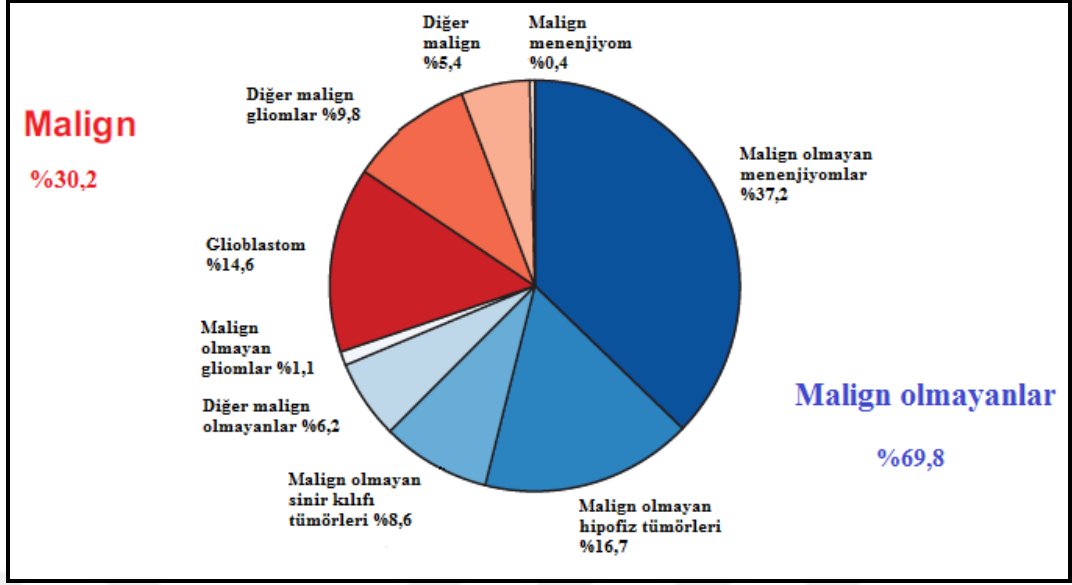
Bu doğrultuda, çalışmamız sonucunda gliyal tümörlerin tanı, tedavi ve prognozu ile ilgili çok önemli veriler elde edilebilecektir. Projemiz bu alandaki çalışmalar açısından ülkemiz için öncü olabilecek konumdadır. Çıkacak sonuçlardan, klinik değeri olduğu saptanacak mitokondriyal genomik değişikliklerin, klinikte kullanımı söz konusu olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glial Tümörler

Primer beyin tümörleri, santral sinir sistemindeki hücrelerden kaynaklanan heterojen tümörler grubudur ve iyi (benign) veya kötü huylu (malign) olabilirler (19). Histolojik olarak birbirinden farklı, kendine özgü klinik özellikleri, tedavileri ve prognozu olan 100'den fazla primer beyin tümörü tanımlanmaktadır. Primer beyin tümörlerinin yaklaşık %70'i malign olmayan (menenjiyomlar, hipofiz ve sinir kılıfı tümörleri), %30'u ise malign (gliomlar) özelliklere sahiptir (Şekil 1) (2).

Gliomlar, sinir sistemi destek dokusu hücrelerinden (glial hücreler) kaynaklanmaktadır (19) ve erişkinlerdeki malign beyin tümörlerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadırlar (3). Astrositomlar, oligodendrogliomlar ve ependimomları (daha çok pediatrik) kapsayan gliomların sınıflandırması 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından güncellenmiştir (10).



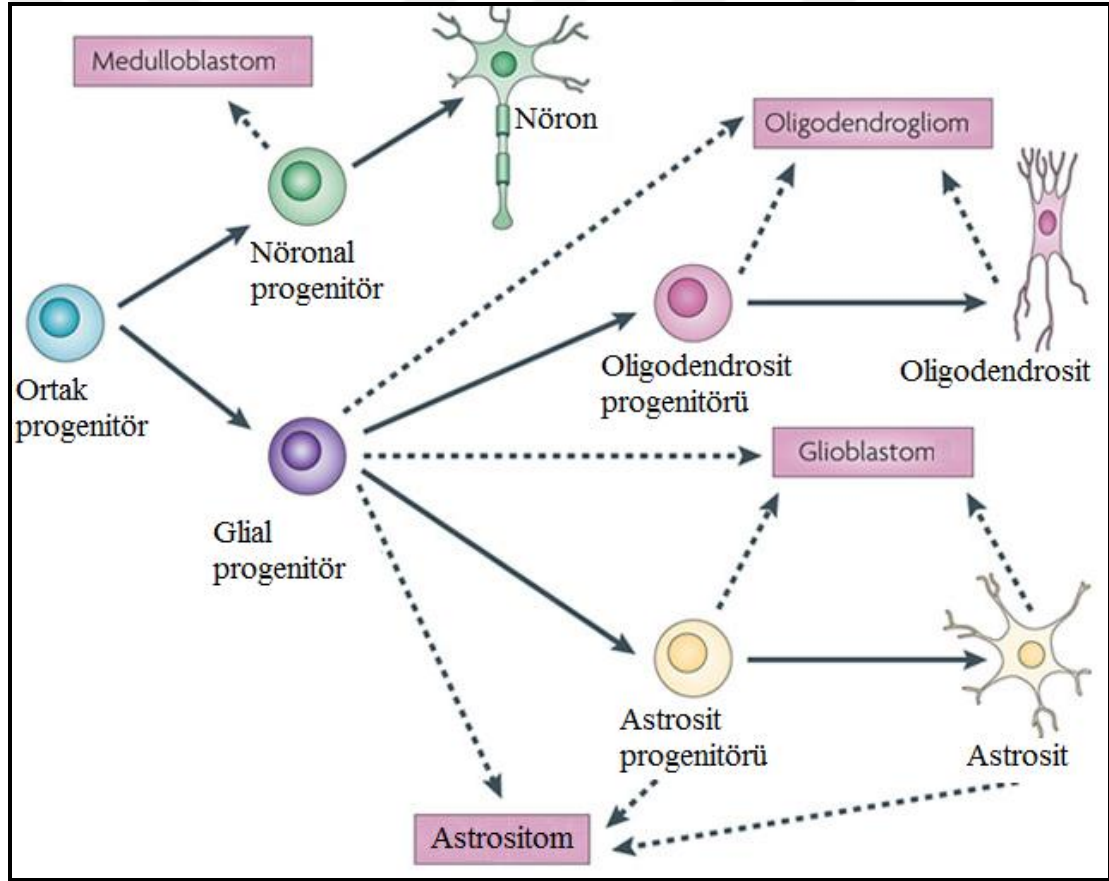
Şekil 1: Primer santral sinir sistemi tümörlerinin seyir dağılımları. Oranlar 2012-2016 yıllarındaki verileri kapsayan CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) istatistik raporuna göre hazırlanmıştır. Kaynak: Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. Neuro Oncol. 2019;21(Supplement_5):v1-v100.

2.1.1. Epidemiyoloji

2018 yılında dünyada 300000 kadar yeni beyin tümörü vakası saptanmıştır (20). Tüm kanserlerin yaklaşık %1,6'sını meydana getiren beyin tümörlerinin insidansı (3,2:100000) diğer kanser türlerine kıyasla düşük olsa da, mortaliteleri (2,5:100000) tüm tedavi yeniliklerine rağmen oldukça yüksektir (21). Genel olarak malign beyin tümörleri erkeklerde kadınlardan daha fazla görülmektedir (insidans 3,9:100000'e karşı 3,1:100000) (21). Primer tümörler, beyaz ırkta diğer ırklara göre daha fazla saptanmaktadır (22). Tüm santral sistem tümörleri için ortalama tanı yaşı 59 olmakla birlikte (23), gliomların insidansı, astrositomlar çocuk ve gençlerde, oligodendrogliomlar 30-40 yaşlarında ve glioblastomlar 60-70 yaşında olmak üzere histolojilerine göre farklılık göstermektedir (22).

2.1.2. Sınıflandırma

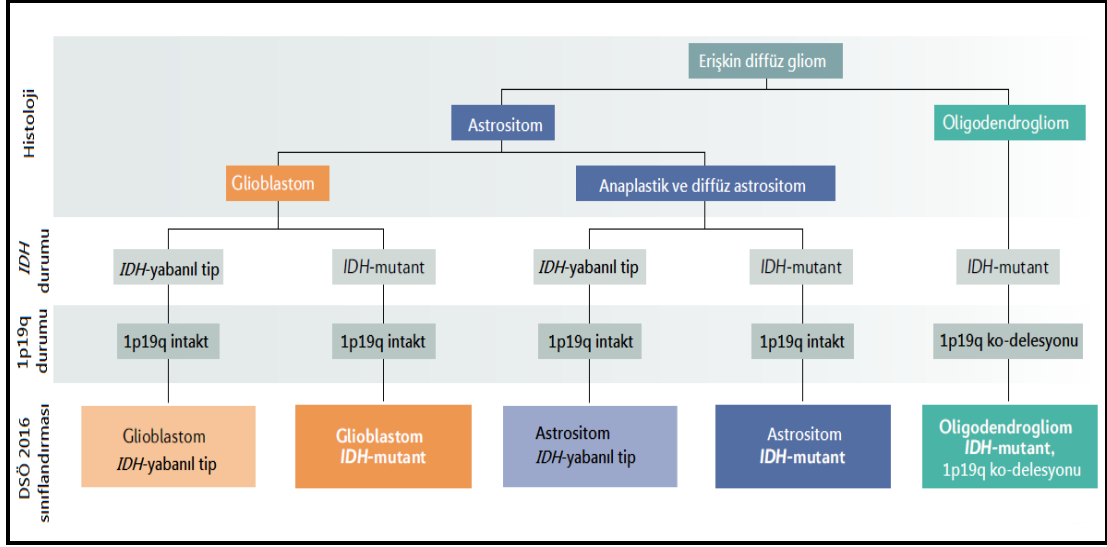
Gliomlar yakın zamana kadar genel özelliklerine göre sırasıyla oligodendrosit ve astrosit hücrelerinden meydana gelen oligodendrogliomlar (Şekil 2) ve astrositomlar ile karışık glial temele sahip oligoastrositomlar olarak isimlendirilmekteydi (1, 4) ve tümörün büyüme potansiyeli ile agresifliğine göre derece I'den (oligodendrogliomlar ve astrositomlar) derece IV astrositomlar olarak tanımlanan glioblastoma multiforme (GBM)'a kadar aşamalandırılmaktaydı. Sekonder GBM'ler ise daha önceden var olan düşük dereceli astrositomlardan ilerleme gösteren tümörlerdir (4, 24).



Şekil 2: Nörogliyal köken ağacı. Kendini yenileyen, ortak progenitör hücreler, olgunlaşmış nöron, astrosit ve oligodendrositlere farklılaşacak nöronal ve glial progenitörleri üretmektedir. Progenitör hücreler henüz tam olarak bilinmeyen moleküler mekanizmalarla malign özellikler edinmektedir. Kaynak: Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat Rev Cancer. 2010;10(5):319-31.

Tümörlerin histolojik özelliklerine göre yapılan sınıflandırmada (DSÖ 2007 santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırması), tümörlerin özellikle infiltrasyon, mitotik aktivite, nekroz, vasküler yapılanma gibi özellikleri hematoksilen ve eosin boyalı kesitlerde ışık mikroskopunda incelenmekte ve belirli proteinlerin analizi immünohistokimyasal olarak çalışılmaktaydı (4, 24). Ancak, bu sınıflandırmanın öznel olması, son 20 yılda yapılan çalışmalarda sık görülen ve daha nadir beyin tümörü oluşumlarının genetik temelini açıklığa kavuşturulmasıyla, bu değişkenlerin tümör sınıflandırmasında kullanılmasının daha yararlı olabileceği anlaşılmış ve 2016 yılında DSÖ tarafından sınıflandırmada kapsamlı bir revizyon yapılmıştır (10, 25). Böylece, sınıflandırmada fenotipik özelliklerle birlikte izositrat dehidrogenaz (*IDH*) mutasyonu ve 1p19q kodelesyonu gibi belirli moleküler parametrelerin de tanı amacıyla kullanılması için gerekli standartlar oluşturulmuş, histolojik ve moleküler genetik sonuçların uyumsuz olduğu durumlarda sınıflandırmanın genotip özelliklerine göre yapılması daha aydınlatıcı olarak değerlendirilmiştir (10). Bu sınıflandırma ile tanısal kriterler, tanısal test yaklaşımları, derecelendirme (grading), prognoz ve tedavi planlamaları yeniden düzenlenmektedir (19). DSÖ 2016 santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırmasındaki erişkin diffüz gliomların sınıflandırılması Şekil 3'te özetlenmiştir (26).

Diffüz gliomların derecelendirmesi hala mitotik aktivite, vasküler proliferasyon ve nekroz özelliklerine göre yapılmaktadır (24). Konvansiyonel oligodendrogliomlar DSÖ derece II iken, yüksek hücresellik, atipik sitoloji, nekroz, vasküler proliferasyon gösterenler derece III olarak isimlendirilmektedir. Belirgin mitotik aktivitesi olan diffüz astrositomlar DSÖ derece III olarak değerlendirilirken, GBMler (DSÖ derece IV) vasküler proliferasyon ve/veya nekroz varlığı ile tanımlanmaktadır (27).



Şekil 3: Erişkin diffüz gliomların DSÖ 2016 sınıflandırmasına dahil olan moleküler alt tiplendirilmesi. Moleküler tanı (*IDH* mutasyonu ve 1p19q ko-delesyonu durumu) ile birleştirilmiş histolojik değerlendirme, DSÖ 2016 sınıflandırmasına dahil erişkin diffüz gliomların başlıca beş alt tipi (*IDH*-yabanıl tip GBM, *IDH*-mutant GBM, *IDH*-yabanıl tip astrositom, *IDH*-mutant astrositom, *IDH*-mutant oligodendrogliom) tanımlanmaktadır. Kaynak: Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(7):405-17.

2.1.3. Etiyoloji, klinik özellikler ve prognoz

Gliomlar genellikle beynin dört lobunda (%23,6 frontal, %17,4 temporal, %10,6 parietal, %2,8 oksipital) meydana gelmesine rağmen, nadiren beyin sapı, serebellum ve omurilikte de bulunabilmektedirler (23).

Primer beyin tümörü olan hastaların çoğunda tanımlanabilir bir risk faktörü bulunmamaktadır (19). Erişkin diffüz gliomların %5'inden azı Li-Fraumeni sendromu, nörofibromatozis, Lynch sendromu, melanom-nöral sistem tümör sendromu, Ollier hastalığı ve tüberoz skleroz gibi tek gene bağlı kalıtsal kansere yatkınlık sendromlarından kaynaklanmaktadır (28, 29). Bu ailesel kanser sendromlarındaki gliomagenez, spontan olarak kabul edilen gliomlardan farklılık gösterebilmektedir (30).

Son yıllarda dizi analizi teknolojilerindeki gelişmeler ve genom çapındaki ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile gliom riskini arttırabilecek bazı varyasyonlar tanımlanmıştır. Bunlar arasında, gliom gelişimi ile ilişkilendirilmiş istatistiksel olarak en anlamlı varyasyonlar 8q24 kromozomal bölgesindekilerdir (8). Özellikle 8q24.21 bölgesinde yerleşimli rs55705857 polimorfizminin G-alelinin *IDH*-mutant gliom geliştirme riskini 16 kata kadar arttırabileceği saptanmıştır. Bu risk artışında Ras/MAPK yolaklarının ve reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivasyonunun etkili olabileceği de gösterilmiştir (9). Bu polimorfizm gliom dokuları ve hücre hatlarında ifadesinin artmış olduğu bildirilen *CCDC26* geninde bulunmaktadır ve *CCDC26*-siRNA'nın (susturucu RNA) gliom büyümesini ve metastazı engellediği gösterilmiştir (31). Ancak bu varyasyonun işlevsel öneminin tam olarak anlaşılması için in vivo çalışmalar yapılması gerekmektedir.

İyonize radyasyona özellikle çocukluk çağında maruz kalmak diffüz gliomlar için en güçlü çevresel risk faktörüdür, ancak bu durum vakaların az bir kısmını açıklamaktadır. Diffüz gliom riski doza bağlıdır ve hem atom bombası kazazedelerindeki gibi düşük doz, hem de çocukluk çağı enfeksiyonları ve kanserlerinin tedavisinde kullanılan yüksek dozlu terapötik radyasyon gliom riskini arttırmaktadır. Örneğin, terapötik radyasyon gliom riskini 3-7 kat arttırmaktadır (32, 33).

Gliom hastalarında, şiddetli baş ağrısı sıklıkla görülen ilk belirtilerdendir. Baş ağrısı, büyüyen kitlenin çevre dokuya uyguladığı kütle etkisinden kaynaklanmakta ve bu etki nedeniyle mikrovasküler yapıda basınç oluşarak ödem gelişmektedir (34). Beyindeki tümörün yerleşimine bağlı olarak kütle etkisiyle farklı belirtiler (frontal bölge tümörlerinde kişilik değişiklikleri, temporal bölge tümörlerinde konuşma bozuklukları gibi) ortaya çıkabilmektedir. Kütle etkisine bağlı diğer belirtiler, mide bulantısı, kusma ve görme bozukluklarıdır. Sık görülen ilk belirtilerden diğeri nöbetlerdir. Nöbetlerin nedeni ise tümörün serebral kortekse uyguladığı iritasyon sonucunda meydana gelen bölgesel veya genel nöbetlerdir. Gliomların diğer

belirtileri, karıncalanma hissi, güç kaybı, yürüme zorluğu ve nadir durumlarda tümördeki kanamaya bağlı gelişen koma durumudur (35).

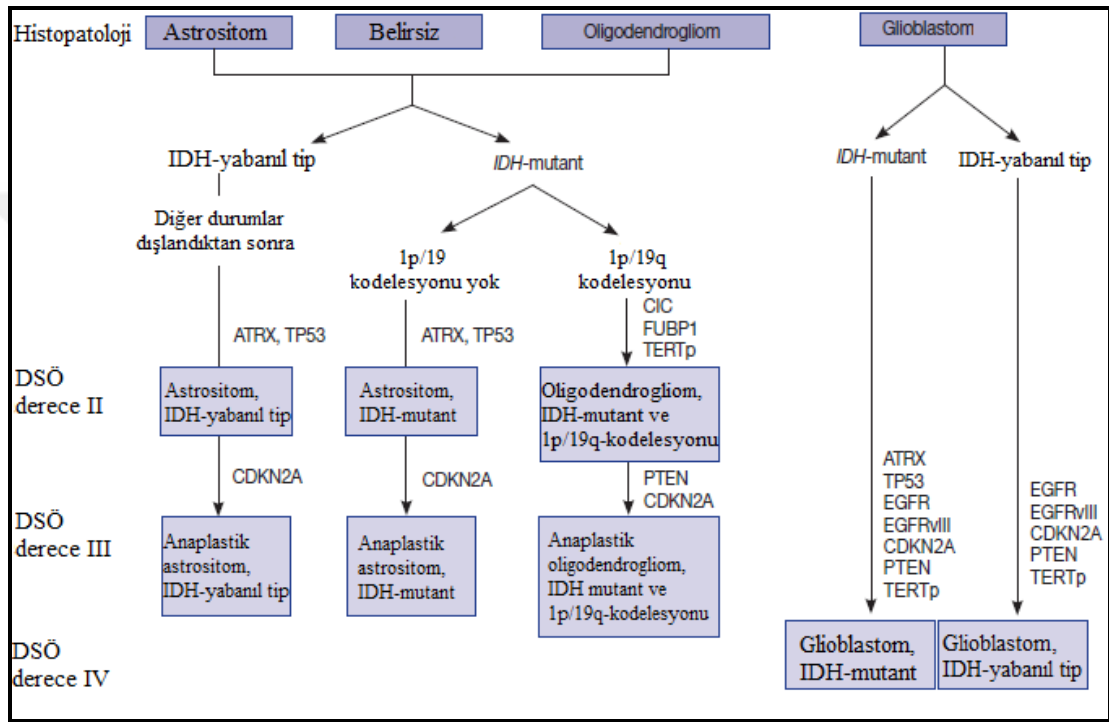
Birçok primer beyin tümörü için öncelikli tedavi, hastanın hayat kalitesini iyileştirmek ve sağkalımı arttırmak amacıyla azami güvenli rezeksiyondur (36-38). Ancak, beyindeki fonksiyonel merkezlerin birbirine çok yakın olması her zaman bütünsel rezeksiyona izin vermemektedir ve glial hücrelerin infiltratif olmaları nedeniyle kısa sürede relaps gelişebilmektedir. Cerrahi tedavinin yanısıra radyoterapi ve kemoterapi (standart olarak Temozolomide tedavisi) de uygulanabilen tedaviler arasındadır (39). Ancak, tedavilerin başarıları tüm gelişmelere rağmen oldukça kısıtlıdır.

Gliomların prognozu DSÖ 2016 sınıflandırmasındaki 5 alt tipe göre değişiklik göstermektedir (26). Daha kötü prognoza sahip *IDH*-yabanıl tip GBMler ile kıyaslandığında (ortalama sağkalım süresi 15 ay), *IDH*-mutant GBMler'in prognozu biraz daha iyidir (ortalama sağkalım süresi 3,6 yıl). *IDH*-yabanıl tip astrositomların prognozu derecelendirmeden (II veya III) bağımsızdır ve *IDH*-yabanıl tip GBMler ile benzerlik göstermektedir (ortalama sağkalım sadece 23 ay). Buna karşın, *IDH*-mutant astrositomların ortalama sağkalım süresi 9,3 yıldır. Gliomlar arasında en iyi prognoza sahip oligodendrogliomlarda ortalama sağkalım süresi 17,5 yıldır (40-42).

2.1.4. Moleküler parametreler

Dünya Sağlık Örgütü 2016 santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırmasına göre, beyin tümörlerinin sınıflandırılmasında ve primer ile sekonder GBMler'in birbirinden ayrılmasında histolojik özelliklerden çok moleküler parametrelerin kullanılması önerilmiştir (10). Bu parametreler genel olarak *IDH* mutasyonlarını, 1p19q kodelesyonlarını, Capicua transkripsiyonel repressör (*CIC*), uzak upstream

element bağlama proteini 1 (*FUBP1*), telomeraz revers transkriptaz (*TERT*) promotör, X-bağımlı α -talasemi/mental retardasyon sendromu (*ATRX*) ve tümör proteini 53 (*TP53*) mutasyonlarını, epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) gen alterasyonlarını, fosfataz ve tensin homolog (*PTEN*) mutasyon veya delesyonlarını (10q delesyonu) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A (*CDKN2A*) homozigot delesyonunu kapsamaktadır (Şekil 4) (43-47).



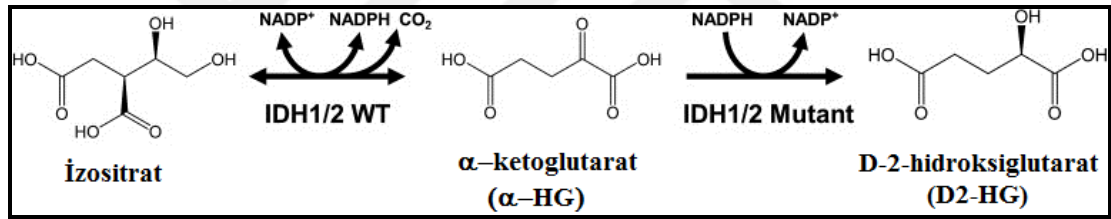
Şekil 4: Erişkin diffüz gliomların önemli moleküler parametrelere göre sınıflandırılması. Kaynak: Park SH, Won J, Kim SI, Lee Y, Park CK, Kim SK, et al. Molecular testing of brain tumor. J Pathol Transl Med. 2017;51(3):205-23.

2.1.4.1. İzositrat dehidrogenaz (*IDH1* ve *IDH2*) mutasyonları

İzositrat dehidrogenaz başlıca karaciğer, kalp kası ve iskelet kasında bulunan küçük bir proteindir (48). Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, glutamin metabolizması, lipogenez, glukoz duyarlılığı ve hücrel redoks durumunun düzenlenmesinde yer almaktadır (49, 50). IDH, oksidatif dekarboksilasyon ile

izositratı α -ketoglutarata (α -KG) dönüştürmektedir (Şekil 5) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADP+) NADPH'ye indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır (51). IDH'nin NADP-bağımlı IDH (IDH1 ve IDH2) ve NAD-bağımlı IDH (IDH3) olmak üzere *in vivo* iki formu bulunmaktadır (52). Bunlar arasında antioksidan etkilere sahip olan IDH1, sitoplazma ve peroksizomlarda bulunmakta ve lipid sentezinde rol almaktadır. IDH2 mitokondride yerleşimlidir ve birçok dokuda sitrik asit döngüsünde önemli bir yere sahip olmakla birlikte özellikle hücrel enerji metabolizmasında görev almaktadır (51).

Günümüzde *IDH1* ve *IDH2* mutasyonlarının akut myeloid lösemi (53), düşük dereceli gliomlar ve sekonder GBMler'de (5) sıklıkla saptandığı ancak primer GBM'lerde nadir görüldüğü bildirilmiştir (44, 54).



Şekil 5: Mutant IDH enzimlerinin değişmiş enzim aktivitesi. IDH1 ve IDH2, NADP⁺'yi kofaktör olarak kullanarak oksidatif dekarboksilasyon ile izositrattan α -KG oluşturulmasını katalizlemekte ve reaksiyon sonucunda NADPH ve CO₂ üretilmektedir. IDH1 ve IDH2'nin aktif bölgelerindeki tekrarlayan mutasyonlar fonksiyon kazanımına neden olarak, NADPH kullanımı ile α -KG'nin D2HG'ye dönüşümüne neden olmaktadır. Kaynak: Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016;18(1):16-26.

Gliomlar ile *IDH* mutasyonu arasındaki ilişki ilk olarak 2008 yılında Parsons ve arkadaşlarının yaptığı GBM vakalarının analizlerinde, özellikle daha önce düşük dereceli astrositom geçmişi olan (sekonder GBM) genç hastalarda gösterilmiştir (54). Fonksiyon kazanımına neden olan mutasyonlar, çoğunlukla (%90'dan fazlasında) *IDH1* geni 132. kodondaki arjininin histidine dönüşmesinden (Arg132His mutasyonu) kaynaklanmaktadır (5) ve ayrıca düşük frekansta *IDH2* geni 172.

kodonda da saptanmaktadır (Şekil 6) (51). *IDH* mutasyonları neredeyse her zaman heterozigot durumdadır (55).

Mutant *IDH* (mutasyonun türünden bağımsız olarak), normal enzimatik aktiviteyi engelleyerek, bunun yerine NADPH bağımlı şekilde α -KG'den D-2-hidroksiglutarat (D2-HG) onkometabolitini (Şekil 5) üretmektedir (56-58). *IDH*-yabanıl tip hücrelerle karşılaştırıldığında, *IDH*-mutant hücrelerde D2-HG 50-100 kat fazla bulunmaktadır (56, 59).

Gen	Mutasyon	Aminoasit değişikliği	Frekans (%)
<i>IDH1</i>	c.395G>A	R132H	83.5-88.9
	c.394C>T	R132C	3.9-4.1
	c.394C>A	R132S	1.5-2.4
	c.394C>G	R132G	0.6-1.3
	c.395G>T	R132L	0.3-4.1
<i>IDH2</i>	c.515G>A	R172K	2.4-2.7
	c.515G>T	R172M	0.8-1.8
	c.514A>T	R172W	0.0-0.7
	c.514A>G	R172G	0.0-1.2

Şekil 6: Gliomlarda görülen özgül *IDH* mutasyonlarının frekansları. Kaynak: Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016;18(1):16-26.

D-2-hidroksiglutarat yapısal olarak α -KG'ye benzediğinden, α -KG-bağımlı dioksijenazların katalitik aktivitesini inhibe etmekte (60) ve sonuç olarak histon modifikasyonu ve DNA demetilasyonundaki önemli basamaklara zarar vermektedir (56). CpG adacıklarındaki hipermetilasyon, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna ve epigenetik modifikasyon nedeniyle glioma kök hücre farklılaşmasındaki gen ifadelerinin değişmesine neden olmaktadır (61).

İzositrat dehidrogenaz mutasyonlarının vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ifadesini artırarak tümör mikroortamının oluşmasını teşvik ettiği ve GBM kök hücre gelişimine uygun ortam sağladığı gösterilmiştir (62), VEGF

transkripsiyonu hipoksi ile indüklenen faktör-1 α (HIF-1 α) tarafından başlatılmaktadır ve hipoksi VEGF’de artışa neden olabilmektedir (63). *IDH* mutasyonları mikrodamar oluşumunu teşvik etmek üzere VEGF’yi indükleyecek şekilde HIF-1 α yıkımını engelleyebilmektedir (64).

Daha iyi prognoz ile ilişkilendirilmiş *IDH1/2* mutasyonları, derece II ve III gliomların %70-80’inde, oligodendrogliomların ise hepsinde görülmektedir (65).

2.1.4.2. 1p19q kodelesyonu ve *FUBP1* ile *CIC* geni mutasyonları

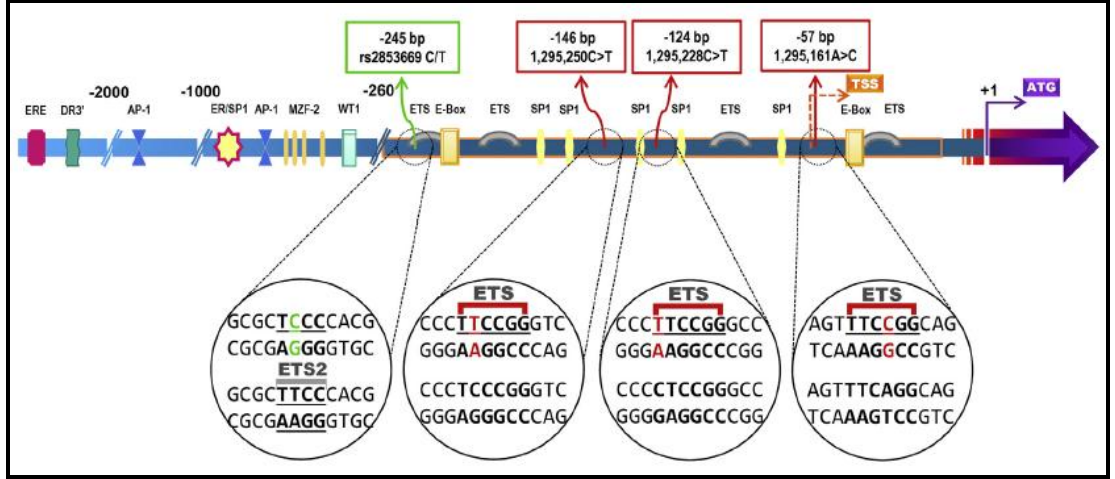
1p19q kodelesyonu 1. kromozomun kısa kolu (1p) ile 19. kromozomun uzun kolu (19q) arasındaki resiprokal translokasyon [t(1;19)(p10;q10)] sonucu türemiş bir dengesiz kromozom kaybına neden olmaktadır (66, 67). Oligodendrogliyal kökenli tümörlerde erken bir genetik olay olan 1p19q kodelesyonu daha iyi prognoz ve belirli kemoterapi kombinasyonlarına yanıt ile ilişkilendirilmiştir (47). Oligodendrogliomların %80’inde bulunan 1p19q kodelesyonları (68), tipik olarak *IDH* mutasyonları ile birlikte saptanmaktadır (44) ve DSÖ 2016 sınıflandırmasına göre oligodendrogliom tanısında *IDH* mutasyonu ile birlikte 1p19q kodelesyonu da olmak zorundadır (10).

1p31.1 kromozom bölgesinde yerleşimli *FUBP1* geni ve 19q13.2 kromozom bölgesinde bulunan *CIC* genindeki tekrarlayan (rekürren) mutasyonlar, oligodendrogliomların sırasıyla %15–24 ve %46–53’ünde 1p19q kodelesyonu (ve *IDH* mutasyonu) ile birlikte saptanmaktadır (69-71). *IDH1* ile birlikte *CIC* veya *FUBP1* mutasyonunun varlığı, oligodendromlarda daha yavaş olan tümör büyümesini ve daha uzun süreli sağkalımı kısmen açıklayabilmektedir (72).

2.1.4.3. Telomeraz revers transkriptaz (*TERT*) mutasyonları

Replikatif yaşlanma, hücre bölünmesi sonucunda meydana gelmektedir. Kromozom uçlarının tamamlanmamış replikasyonu, telomerlerin giderek kısalmasına ve böylece DNA hasarı kontrol noktası sinyalinin harekete geçmesine ve hücre döngüsünün durmasına neden olmaktadır (73). Telomer uzunluğu kök/progenitör ve eşey hücrelerde telomeraz ile sürdürülmektedir (73). Telomeraz holoenzimi; birlikte hareket ederek kromozom uçlarına tekrarlayan DNA dizileri eklemek üzere telomerlerin uzamasını sağlayan üç alt üiteden meydana gelmektedir. Bunlar, 5. kromozomdaki *TERT* geni tarafından kodlanan katalitik alt ünite olan TERT, diskeratin ve kalıp telomeraz RNA componentleridir (73, 74). TERT ifadesi normalde hemen hemen tüm somatik hücrelerde susturulmuştur ve telomerazın yeniden aktifleşmesi replikatif yaşlanmadan kaçış için önemli bir faktör olarak kanserin ayırıcı özelliklerinden biridir (75).

Telomeraz revers transkriptazın promotöründeki tekrarlayan, birbirini dışlayan nokta mutasyonları ilk olarak melanom ve sonrasında primer GBM ve oligodendrogliomlarda yüksek sıklıkta olmak üzere farklı tümörlerde de gösterilmiştir (7, 76, 77). *TERT* promotöründe gliomlarda en sık rastlanan iki mutasyon C228T ve C250T'dir ve *TERT* başlangıç noktasına göre sırasıyla -124 baz çifti (bç) (chr5p13.3:1295228 C>T) ve -146 bç (chr5p13.3:1295250 C>T)'de yerleşimlidirler (7). *TERT* promotör mutasyonları GA-bağlanma proteini alfa ünitesi (GABPA) olarak isimlendirilen, E26 transformasyon-spesifik (ETS) ailesi transkripsiyon faktörü için kriptik bağlanma bölgesi yaratarak telomerazın transkripsiyonel aktivitesinde artışa ve böylece telomer uzamasına neden olmaktadır (Şekil 7) (78-81). *TERT* promotör mutasyonları *IDH*-mutant gliomlarda iyi prognoz ile, *IDH*-yabanıl tip gliomlarda ise kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (82).



Şekil 7: Farklı regülatör elementler ve kansere özgü mutasyonların yerleşimi ile *TERT* promotörün yapısı. Dışı turuncu kutucuk ile işaretli *TERT* promotör içinde üç mutasyon gösterilmiştir. ATG başlangıç kodonuna göre -57, -124 ve -146 (kırmızı kutucuk içerisinde), pozisyonlardaki mutasyonlar ETS transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri yaratmaktadır. -245 T>C polimorfizmi (yeşil kutucuk içerisinde), ise varolan ETS2 bağlanma bölgesini bozmaktadır. ERE, DR30, AP-1, ER/SP1, MZF-2, WT1 farklı regülatör elementlerdir. TSS: Transkripsiyon başlangıç noktası. Kaynak: Heidenreich B, Kumar R. *TERT* promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res.* 2017;771:15-31.

2.1.4.4. Diğer moleküler parametreler

Oligodendrogliomlar ve *IDH*-yabanıl tip GBMler'in aksine *IDH*-mutant astrositomlarda *TERT* promotör mutasyonları seyrekdir. Bu tümörlerde telomer uzunluğu alternatif bir mekanizma ile, çoğunlukla *TP53* mutasyonları eşliğinde, *ATRX* genindeki mutasyonlar ile sağlanmaktadır. *ATRX*, ölüm (death) domaini ilişkili DAXX proteini ile birlikte telomerlerde kromatin yapısını idame ettiren *ATRX* proteinini kodlamaktadır (74). *ATRX* değişiklikleri (alterasyon), artmış telomer homolog rekombinasyonu ve sonrasındaki telomer uzaması ile karakterize alternatif telomer uzaması ile oldukça ilişkilidir (83).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), proliferasyon, sağkalım, göç ve tümöröenez gibi çeşitli sinyal yollarının ve fizyolojik yanıtların başlıca

aktivatörüdür. EGFR, GBM hastalarının %40'ında artmış haldedir ve genellikle yüksek dereceli klasik tümörlerle ilişkilidir. GBM'de EGFR'nin fazladan onlarca kopyası bulunabilmektedir (84). EGFR artışı olan hastaların yaklaşık yarısında, ekzon 2-7'nin delesyonundan (EGFRvIII) kaynaklanan sürekli aktif mutasyon bulunmaktadır (85). EGFRvIII, "double minute" olarak isimlendirilen küçük ekstakromozomal DNA parçaları tarafından ifade edilmektedir (86). EGFR artışı ya da mutasyonunun genellikle kötü sağkalımla ilişkili olduğu bildirilmiştir (87, 88). Bu moleküler belirtecin RTK inhibitörlerine yanıt için gösterge olabileceği değerlendirilmektedir. Ancak bu tümörler RTK inhibitör tedavisine yanıt vermesine rağmen, tedaviye dirençli hale gelebildiği de bildirilmiştir (89).

Tümör proteini 53 (*TP53*), 17p13.1 kromozomal bölgesinde yerleşimli tipik bir tümör baskılayıcı genidir. P53 proteini, hedef genlerinin ifadesini sağlamak üzere farklı hücresel streslere yanıt vermektedir, böylece hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, yaşlanma, DNA tamiri veya metabolik değişiklikleri tetiklemektedir (90). Mutant *TP53* genleri veya yabani tip p53'ten daha uzun süreli yarılanma ömrüne sahip aşırı ifade edilen anormal p53 proteini Li-Fraumeni sendromu ve herediter gliomlar da dahil olmak üzere farklı kanserler ile ilişkilendirilmiştir (91). P53 sinyal yolağı GBMler de dahil olmak üzere astrositik tümörlerde bozulmuş başlıca yollardandır. Derece II ve III astrositik tümörlerde oldukça yüksek oranda *TP53* mutasyonları ve/veya p53 aşırı ifadesi görülmekle birlikte bu mutasyonlar oligodendromlarda nadirdir (92). Genellikle astrositik tümörlerde ve IDH-yabani tip GBMler'de saptanan *TP53* mutasyonları, proteinin nükleer birikimine neden olan yanlış anlamlı mutasyonlardır (93). *TP53* mutasyonları GBM'de onkogenik olmalarına rağmen, GBM ilerlemesi için *PTEN* gibi başka genlerin de mutasyona uğraması gerekmektedir (94).

Hücre büyümesi, proliferasyonu, metabolizması, motilitesi, sağkalımı ve apoptoz gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynayan PI3K/AKT yolağının normal dışı aktivasyonu birçok kanserde tümör hücrelerinin sağkalımını ve proliferasyonunu

desteklemektedir (95, 96). PI3K yolağı normalde EGFR ve diğer büyüme faktörleri tarafından aktive edilmektedir (97). GBMlerin %15'inden azında PI3K aktive edici mutasyon görölmesine rağmen, neredeyse bütün GBMler bu yolakta artmış aktiviteye sahiptir. PTEN bu yolağın negatif regülatörüdür ve GBMler'in %40'a yakını bu proteinde mutasyona sahipken, yaklaşık %70'inde *PTEN* lokusunda heterozigosite kaybı (10q LOH) saptanmaktadır (97).

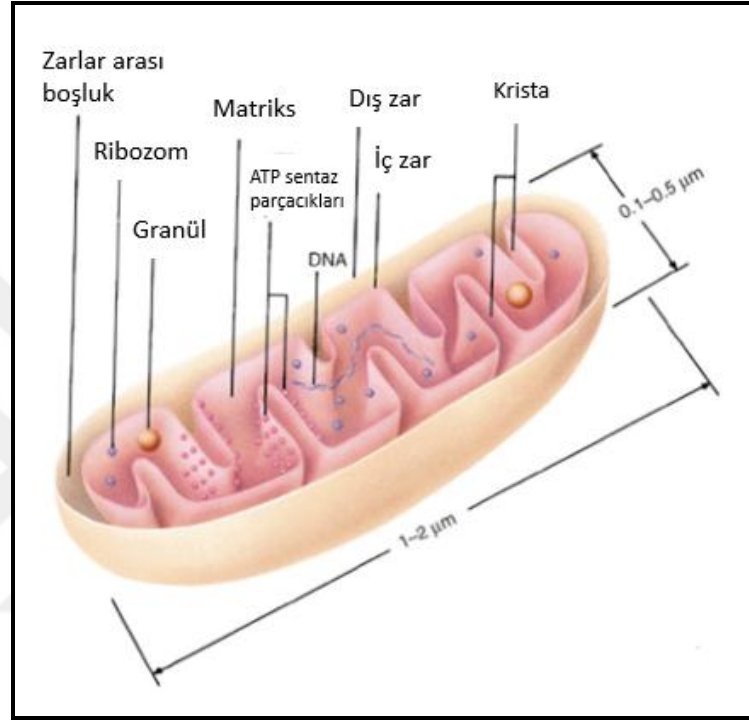
Hücre döngüsünü etkileyen sinyal iletim sistemindeki değişiklikler gliomda kontrolsüz hücre büyümesinin ortak mekanizmasıdır. GBM'de bu durum sıklıkla *CDKN2A* ve/veya *CDKN2B*'nin homozigot delesyonu (%50-60), diğer siklin-bağımlı yolak genlerinde kopya sayısı değişiklikleri (yaklaşık %20) veya retinoblastom-ilişkili protein (RB1) yolağının genlerinde mutasyon (%7-10) şeklinde olmaktadır (92, 98). Homozigot *CDKN2A* ve/veya *CDKN2B* delesyonları *IDH*-mutant astrositom (99) ve *IDH*-mutant GBMler'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (100, 101). Ancak bu etki hücre döngüsü yolağındaki diğer bozuklukların varlığında azalmaktadır (26).

2.2. Mitokondri

2.2.1. Mitokondrinin yapısı ve fonksiyonu

Mitokondriler, hemen hemen bütün ökaryotlarda bulunan, sitoplazmada yerleşimli, çift birim zarla çevrili, kendi ribozomları ve DNA'sı olan, temel olarak solunum ve enerji üretiminde görevli organellerdir. Organizasyonu morfolojik ve fonksiyonel olarak birbirinden ayrı dört bölüm şeklindedir: (i) trafiği spesifik taşıyıcılar (transporter) ve kanallarla sağlanan, iyonlar ve küçük moleküllere geçiren dış zar; (ii) matriks ve sitozol arasında protein, lipid ve metal iyonlarının değişimi, apoptotik yolağın başlaması gibi önemli süreçlerin meydana geldiği zarlar

arası boşluk; (iii) matriksi çevreleyen ve iyonların, metabolitlerin, proteinlerin özelleşmiş taşıyıcılardan taşınmasını sağlayan, içe doğru kıvrımlarında (krista) solunum komplekslerinin bulunduğu iç zar; (iv) mitokondriyal DNA (mtDNA) ile sitrik asit döngüsü ve yağ asitlerinin beta-oksidasyonu gibi önemli biyokimyasal yollarla ilişkili proteinleri barındıran matriks (Şekil 8) (102-104).



Şekil 8: Mitokondrinin yapısı. Kaynak: Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. Trends Biochem Sci. 2000;25(7):319-24.

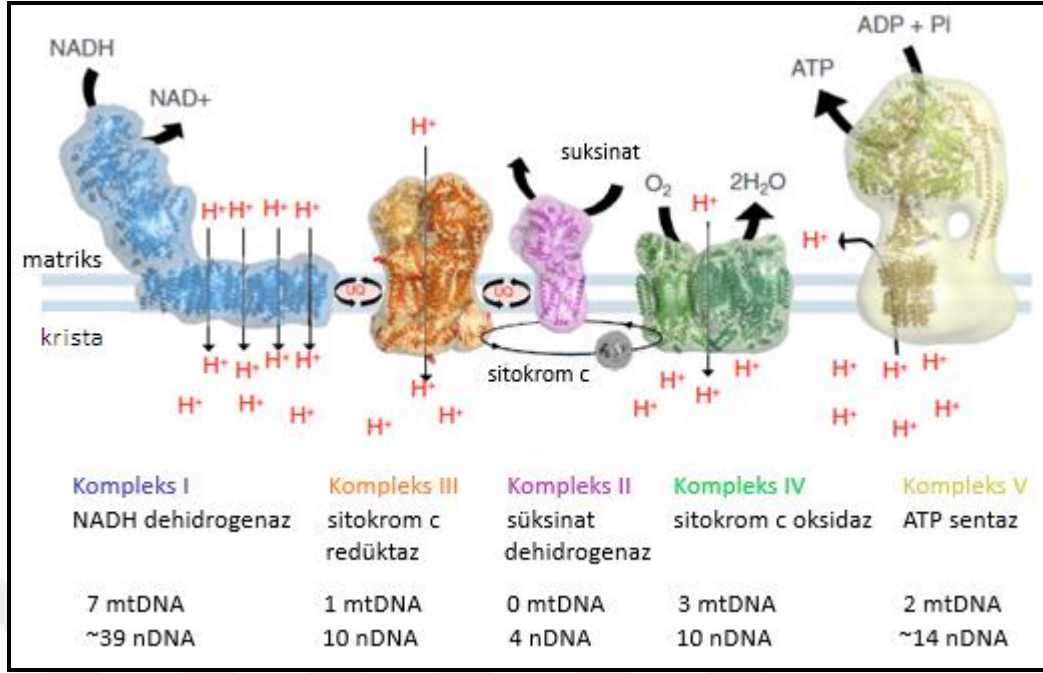
Mitokondrinin en önemli rolü hücreye harcanabilir durumdaki enerjiyi oksidatif fosforilasyon ile üretilen adenozin trifosfat (ATP) şeklinde sağlamaktır (105). Bu temel görevin yanısıra, ısı üretimi, apoptoz, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve detoksifikasyonu, hücre içi Ca^{+2} düzenlenmesi, lipid metabolizması, steroid hormon ve hem sentezi gibi hücre için fizyolojik öneme sahip süreçlerde de görev almaktadır (106).

Oksidatif fosforilasyon sistemi iç mitokondriyal zar da gömülü 5 protein kompleksi ve 2 elektron taşıyıcıyı kapsamaktadır (103). Solunum sırasında, elektronlar sitrik asit döngüsü ürünleri olan NADH ve suksinattan sırasıyla kompleks I ve kompleks II aracılığıyla ubikinona transfer edilirler. Daha sonra kompleks III ve sitokrom c'den geçerek kompleks IV'te sonlanırlar. Elektronlar kompleks I, III ve IV boyunca ilerlerken, açığa çıkan enerji protonları mitokondriyal matriksten iç zar boyunca zarlar arası boşluğa pompalamak için kullanılmaktadır. Bu süreçte, kompleks IV oksijeni suya indirgemektedir (106, 107). Meydana gelen elektrokimyasal gradyan sonucunda kompleks V olan ATP sentazda, adenosin difosfat (ADP) ile fosfatın birleşmesiyle ATP sentezi için gerekli hareketlenme sağlanmaktadır (108). Böylece, yüksek enerjili fosfat üretimi, elektron transferini iç zar boyunca meydana gelen proton translokasyonuna birleştirmek üzere sağlanmaktadır (Şekil 9).

Oksidatif fosforilasyon komplekslerinin birleşme mekanizmasında mitokondriyal genlerle birlikte nükleer genler de rol almaktadır (Şekil 9).

2.2.2. Mitokondriyal genom

Mitokondriyal genom ilk olarak 1963 yılında Margit Nass and Sylvan Nass tarafından tanımlanmış ve izole edilmiştir (109). Ancak, ilk eksiksiz mtDNA dizisi mtDNA Cambridge referans dizisi (Cambridge Reference Sequence - CRS) olarak 18 yıl sonra, 1981 yılında yayınlanmıştır (12). Günümüzde mtDNA genomu nükleotit numaralandırması için, Anderson ve arkadaşları (12) tarafından sunulmuş dizinin modifiye edilmiş hali olan revize CRS (rCRS - revised Cambridge Reference Sequence) kullanılmaktadır (110).



Şekil 9: Oksidatif fosforilasyon sisteminin protein kompleksleri. Kompleks isimlerinin altında komplekslerin meydana gelmesini sağlayan nükleer ve mitokondriyal gen sayıları belirtilmiştir. UQ: Ubikinon. Kaynaklar: Kuhlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. BMC Biol. 2015;13:89. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. Nat Rev Genet. 2012;13(12):878-90.

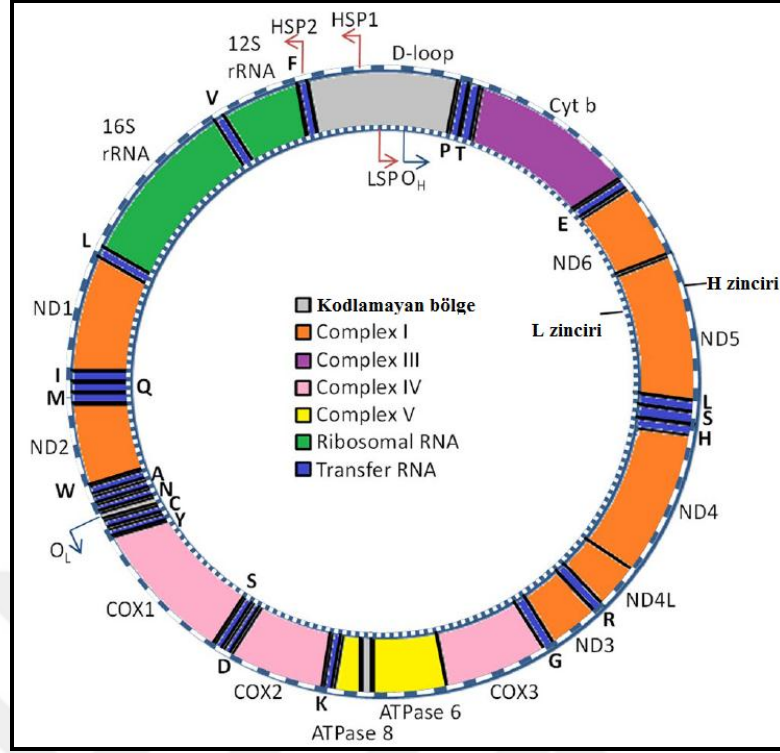
İnsan mitokondriyal genomu, histonları olmayan, 16569 bp (16,6 kb) büyüklüğünde, çift zincirli, dairesel bir DNA molekülüdür. Oksidatif fosforilasyon sistemini oluşturan 5 kompleksin dördünü (kompleks I, III, IV ve V) kodlayan 13 polipeptidin yanı sıra, 22 transfer RNA (tRNA) ve mitokondriyal protein sentezi için gerekli 12S ve 16S ribozomal RNAlar (rRNA) olmak üzere toplam 37 genden oluşmaktadır (Tablo 1) (12). Mitokondriyal genomda hiç intron yoktur ve bütün genler birkaç istisna dışında birbirine bitişiktir. Hafif (light – L) ve ağır (heavy - H) olarak isimlendirilen iki mtDNA zinciri, baz kompozisyonları açısından oldukça farklıdır. Ağır zincir pürinler, hafif zincir ise pirimidinler açısından zengindir. İki zincirdeki genlerin dağılımı asimetriktir. L-zinciri sadece *ND6* geni ile bazı t-RNA kodlayan genleri barındırırken, 12S ve 16S ribozomal RNAlar ve tRNAlar ile proteinleri kodlayan genlerin çoğu H-zincirinde bulunmaktadır. Yaklaşık 1 kb uzunluğundaki kodlanmayan bölge (Displacement loop, D-loop), H-zincir

replikasyon orijinini ve her iki zincirin transkripsiyonu için gerekli promotörleri barındırmaktadır (Şekil 10) (111).

Tablo 1: Mitokondriyal DNA gen yerleşimleri*

Gen / Bölge ismi	Kodladığı protein / tRNA / rRNA	Yerleşim	Büyüklik (bp)
DLOOP2	Kodlamayan bölge	1-576	576
MT-TF	Fenilalanin (F) tRNA	577-647	71
MT-RNR1	12S rRNA	648-1601	954
MT-TV	Valin (V) tRNA	1602-1670	69
MT-RNR2	16S rRNA	1671-3229	1559
MT-TL1	Lösin (L) tRNA 1	3230-3304	75
MT-ND1	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	3307-4262	956
MT-TI	İzolösin (I) tRNA	4263-4331	69
MT-TQ	Glutamin (Q) tRNA	4329-4400	72
MT-TM	Metiyonin (M) tRNA	4402-4469	68
MT-ND2	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	4470-5511	1042
MT-TW	Triptofan (W) tRNA	5512-5579	68
MT-TA	Alanin (A) tRNA	5587-5655	69
MT-TN	Asparajin (N) tRNA	5657-5729	73
MT-TC	Sistein (C) tRNA	5761-5826	66
MT-TY	Tirözün (Y) tRNA	5826-5891	66
MT-CO1	Kompleks IV (Sitokrom c oksidaz)	5904-7445	1542
MT-TS1	Serin (S) tRNA 1	7446-7514	69
MT-TD	Aspartik asit (D) tRNA	7518-7585	68
MT-CO2	Kompleks IV (Sitokrom c oksidaz)	7586-8269	684
MT-TK	Lizin (K) tRNA	8295-8364	70
MT-ATP8	Kompleks V (ATP sentaz)	8366-8572	207
MT-ATP6	Kompleks V (ATP sentaz)	8527-9207	681
MT-CO3	Kompleks IV (Sitokrom c oksidaz)	9207-9990	784
MT-TG	Glisin (G) tRNA	9991-10058	68
MT-ND3	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	10059-10404	346
MT-TR	Arjinin (R) tRNA	10405-10469	65
MT-ND4L	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	10470-10766	297
MT-ND4	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	10760-12137	1378
MT-TH	Histidin (H) tRNA	12138-12206	69
MT-TS2	Serin (S) tRNA 2	12207-12265	59
MT-TL2	Lösin (L) tRNA 2	12266-12336	71
MT-ND5	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	12337-14148	1812
MT-ND6	Kompleks I (NADH dehidrogenaz)	14149-14673	525
MT-TE	Glutamik asit (E) tRNA	14674-14742	69
MT-CYB	Kompleks III (Sitokrom c redüktaz)	14747-15887	1141
MT-TT	Treonin (T) tRNA	15888-15953	66
MT-TP	Prolin (P) tRNA	15956-16023	68
DLOOP1	Kodlamayan bölge	16024-16569	546

(*) MITOMAP veritabanından alınmıştır (112).



Şekil 10: Mitokondriyal DNA. İnsan mtDNA'sı ağır (H, dış çember) ve hafif (L, iç çember) zincirden meydana gelmektedir. L-zinciri tarafından kodlanan genler dairesel DNA'nın içinde, H-zinciri tarafından kodlanan genler ise dairenin dışında listelenmiştir. Protein kodlayan genler oksidatif fosforilasyon için gerekli kompleksleri kodlamaktadır (Kompleks I: turuncu, kompleks III: mor, kompleks IV: pembe, kompleks V: sarı). Kodlamayan D-loop bölgesi L- ve H- zincirlerinin promotörlerini (LSP, HSP1, HSP2) ve H-zincir replikasyon orijinini barındırmaktadır (O_H). Kaynak: van der Wijst MG, van Tilburg AY, Ruiters MH, Rots MG. Experimental mitochondria-targeted DNA methylation identifies GpC methylation, not CpG methylation, as potential regulator of mitochondrial gene expression. Sci Rep. 2017;7(1):177.

Mitokondriyal DNA'nın genetik kodu evrensel genetik koda göre bazı farklılıklar göstermektedir (12). İnsan nükleer kodundaki "UGA" stop kodunu mitokondriyal genomda triptofan, "AUA" (izolösin) ise metiyonin olarak kodlanmaktadır. Arjinini kodlayan "AGA" ve "AGG" ise mitokondride tartışmalı olarak standart olmayan stop kodunu olarak bilinmektedir (112).

Oksidatif fosforilasyon komplekslerinde yer alan diğer tüm alt üniteler ile bunların birleştirilmesi ve mtDNA'nın idame ve ifadesi için gerekli tüm proteinler

nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanmaktadır. Kısaca, mitokondriyal proteom 37 mtDNA genin yanısıra, yaklaşık 1500 nDNA tarafından kodlanan mitokondriyal geni de kapsamaktadır (113). Bu proteinler, mtDNA replikasyonu (*POL γ A* ve *B*, *TWINKLE*), transkripsiyon/translasyon (*TFAM*, *TFB1 M*, *mTERFs*, *LRPPRC*) veya mitokondriyal dNTP havuzunun dengeli idamesi (maintenance) (*TP*, *TK*, *ANTI* ve *RRM2B*) için gereklidir (104).

Mitokondriyal DNA'nın, evrim hızı nükleer DNA'ya göre 10-20 kat daha fazladır ve bu yüzden mutasyonlara daha açıktır. Aynı zamanda, solunum sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin de direkt hedefidir. Koruyucu histonların eksikliği, intronik bölgelerin olmaması, tamir mekanizmalarının etkin olmaması, mtDNA'daki replikasyon hızının yüksek olması ve mtDNA polimerazın düşük doğruluğu (fidelity) mtDNA mutasyonlarının daha fazla olmasının nedenlerindedir (114, 115).

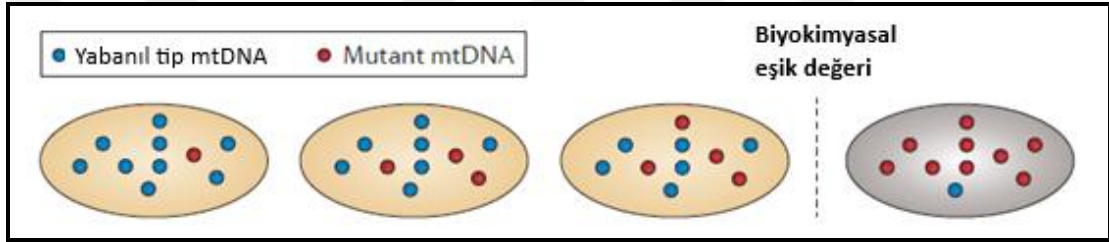
Mendel kalıtım yasalarına göre kalıtılan diploid nükleer DNA'dan farklı olarak, mtDNA özellikle matrilineal kalıtım göstermektedir (13).

2.2.2.1. Heteroplazmi ve eşik değeri etkisi

Her insan hücresinde yüz ile birkaç bin arasında mitokondri bulunmaktadır. Her mitokondri, içinde 10 kopyaya kadar mtDNA'yı nükleoid olarak isimlendirilen nükleoprotein yapılar içerisinde paketlenmiş halde barındırmaktadır (116).

Daha çok enerji ihtiyacı olan hücre ve dokularda genellikle daha fazla mtDNA bulunmaktadır. Çoğunlukla tüm mtDNA kopyaları birbiriyle aynıdır ve bu homoplazmi olarak isimlendirilmektedir (14). Ancak, mtDNA replikasyonu veya tamiri sırasında meydana gelen hatalar, mutant bir mtDNA molekülü oluşumuna

neden olabilmekte ve bunlar nedeni bilinmeyen mekanizmalar ile klonal olarak çoğalarak sonunda heteroplazmi olarak isimlendirilen yarı kararlı bir durum meydana gelebilmektedir. Heteroplazmide aynı organel/hücre/doku içerisinde mutant ve yabancı tip genomlar farklı oranlarda birlikte bulunmaktadır (15). Düşük orandaki heteroplazminin normal hücrelerde de olabildiği, bir dokuda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu meydana gelebilmesi için mtDNA'nın mutasyon yükünün minimum kritik biyokimyasal eşik değeri (genellikle %70-90) aşması gerektiği gösterilmiştir (Şekil 11) (14). Doku ve organların enerji gereksinimleri birbirinden farklı olduğundan, mutant mtDNA oranının semptomatik etkisi organlara göre farklılık göstermektedir (15).

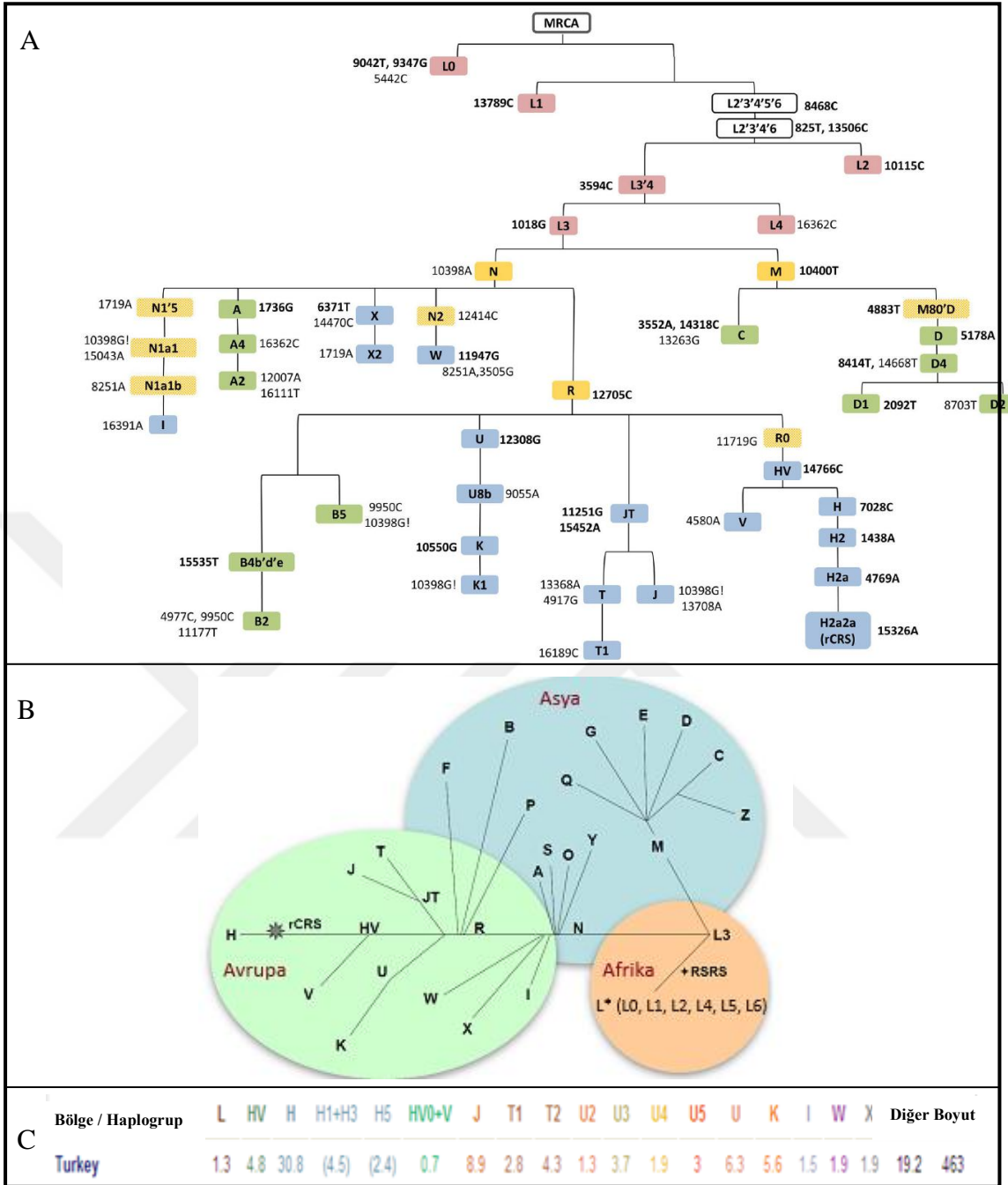


Şekil 11: Mitokondriyal heteroplazmi ve biyokimyasal eşik değeri etkisi. Aynı hücre içerisinde yabancı tip ve mutant mtDNA birlikte bulunabilir. Eğer mutasyon patojenik ise, hücre biyokimyasal eşik değeri aşıp solunum zinciri etkilenmeden önce, bu varyantı yüksek oranda tolere edebilmektedir. Çoğu mtDNA mutasyonunun haplo-yetersiz olduğuna işaret etmek üzere, genellikle bu oran >%80'dir. Kaynak: Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. Nat Rev Genet. 2015;16(9):530-42.

2.2.2.2. Haplogrup

Bireyler arasındaki mtDNA varyasyonlarının çoğu, kontrol bölgesinin iki hiper değişken bölgesinde (HV1 - hypervariable region 1, pozisyon 16024 – 16383 ve HV2 - hypervariable region 2, pozisyon 57 - 372) yer almaktadır (117). Üçüncü bir hiper değişken bölge de (HV3 - hypervariable region 3, pozisyon 438 - 574) tanımlanmıştır (118).

İnsanlar ve insan toplulukları arasında özellikle hiper değişken bölgede rCRS'ye göre saptanan farklılıkların (polimorfizmler) kombinasyonu haplogrupları belirlemede kullanılmaktadır (Şekil 12A) (119). Mitokondriyal DNA özellikle maternal geçişli olduğundan, haplogruplar, insanların etnik kökenleri ve dünya çapında yer değiştirimleri hakkında fikir vermektedir (Şekil 12B) (120). Türk popülasyonundaki haplogrupların oranları Şekil 12C'de verilmiştir (121). Bu varyasyonlar mitokondriyal fonksiyon değişikliklerine neden olabildiği için kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmişlerdir (11, 122).



Şekil 12: Mitokondriyal haplogrup dağılımları. **A.** Mitokondriyal filogenetik ağacın sadeleştirilmiş hali. Avrupalı (mavi), Afrikalı (kırmızı), yerli Amerikalı / Asyalı (yeşil), Avrasya (sarı). Kaynak: Mitchell SL, Goodloe R, Brown-Gentry K, Pendergrass SA, Murdock DG, Crawford DC. Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. Hum Genet. 2014;133(7):861-8. **B.** Mitokondriyal haplogrupların etnik kökene göre dağılımları (MITOMAP veritabanından alınmıştır (112)). **C.** Türk popülasyonundaki haplogrup dağılımları (Eupedia veritabanından alınmıştır (121)).

2.2.3. Mitokondriyal mutasyonlar ve hastalık ilişkisi

Literatürde mitokondriyal mutasyonlar, çoğunlukla sinir sistemi ve kasa ilişkin dokuları etkileyen farklı mitokondriyal hastalıklar (mitokondriyal sitopatiler) ile ilişkilendirilmiştir (123). Mitokondriyal sitopatilerin moleküler-hücrel ve biyokimyasal belirtileri oksidatif fosforilasyon enzim komplekslerine ait polipeptit zincirlerindeki bozukluklar, transkripsiyon sürecindeki hatalar, mitokondriyal genomdaki tRNA ve rRNA mutasyonları ile ilişkilidir (124).

Primer mtDNA hastalıkları, çoğunlukla maternal kalıtılan nokta mutasyonları ile genellikle embriyonik gelişim sırasında *de novo* meydana gelen büyük delesyonlardan kaynaklanmaktadır (125). Nokta mutasyonları tüm mtDNA kodlayan genlerde bulunmaktadır. En sık görülen hastalıklar: (i) esas olarak *tRNA^{LEU}* (lösin) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz, inme benzeri epizodlar (MELAS); (ii) *tRNA^{LYS}* (lizin) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan miyoklonik epilepsi, “ragged red” lifler (MERRF); (iii) kompleks I genlerindeki (*ND1*, *ND4* ve *ND6*) mutasyonlardan kaynaklanan Leber’in herediter optik atrofi (LHON); (iv) *ATP6* mutasyonları ile ilişkili nöropati, ataksi, retinitis pigmentosa (NARP). Kompleks III ve IV’ü kodlayan genlerle de ilişkilendirilmiş farklı klinik tablolar bulunmaktadır (126, 127).

Büyük delesyonlar homoplazmik durumda hayatla bağdaşamayacağından, mtDNA yeniden düzenlenme sendromları hemen her zaman heteroplazmiktir ve klinik tabloları çok farklı şiddetlerde olabilmektedir (126, 127). Delesyonların büyüklükleri birkaç yüz bazdan birçok kilobaza kadar olabilmekte ve genellikle birden çok gen etkilenmektedir. mtDNA’nın yeniden düzenlenmesi ile ilişkili sendromlar kopyalanma (duplikasyon) kaynaklı, maternal kalıtım gösteren tip 2 diyabet ve sağırlıktan; sporadik büyük tek delesyon veya çoklu daha küçük delesyonlar ile ilişkili olan, erişkin başlangıçlı kronik progresif eksternal oftalmopleji

(PEO), çocukluk veya genç dönem başlangıçlı multisistem Kearns Sayre sendromu (KSS) veya perinatal, ölümcül Pearson sendromuna (PS) kadar dağılım göstermektedir (125-127).

2.2.4. Mitokondriyal varyantlar ve kanser ilişkisi

Mitokondri, hücre büyümesi ve çoğalmasının oldukça hızlı ve büyük ölçekte olduğu kanser durumunda enerji ve yapıtaşı sağladığı için anahtar roldedir. Mitokondriyal genlerde mutasyonlar sıklıkla saptanmasına rağmen, bunlar mitokondriyal enerji metabolizmasını inaktive edici nitelikte değil, biyoenerjik ve biyosentetik durumu değiştirecek şekildedir (11).

Nükleer ve / veya mitokondriyal genomda somatik mutasyona sahip bireylerin oranının kanser türüne bağlı olarak %13 ile %63 arasında farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (128). mtDNA varyasyonları farklı kanser türlerinde veya sadece bir tümör tipinde saptanabilmektedir (129).

Tümör oluşumu ile ilişkili olabilecek, özellikle mitokondriyal solunum zincir proteinlerini kodlayan genler olmak üzere birçok mitokondriyal gende somatik mutasyonlar bildirilmiştir (130). Bu mutasyonlar eş anlamlıdan (synonymous) çok eş anlamlı olmayan (non-synonymous) somatik mtDNA değişikliklerini kapsamaktadır (128, 131). Tümörögenез ile ilişkili en çok kompleks I genlerinde varyasyon saptanırken (132), sadece mtDNA tarafından kodlanan kompleks III (sitokrom b, *mt-CYB* geni) için bildirilmiş somatik varyasyon sayısı, mesane kanseri istisna olmak üzere, oldukça nadirdir (133). Protein kodlayan genler arasında, kompleks I ve IV değişikliklerinin tümörögenезi tetiklemekte daha etkili olabileceği değerlendirilmektedir (134).

Mitokondri tarafından kodlanan tRNAlar'da diğer solunum zinciri hastalıklarında sıklıkla mutasyonlar bildirilmesine rağmen (135), kanser ile ilişkilendirilen varyasyonların sayısı oldukça azdır. Bunun nedeni, tRNA mutasyonlarının ikincil yapıları etkilemesi (136) ve “stem” ile “loop” bölgelerinde kararsızlığa (instabilite) neden olarak mitokondriyal fonksiyonu değiştirmesidir (137). Benzer şekilde, rRNA mutasyonlarının etkileri protein kodlayan genlerdeki değişikliklere göre oldukça kötüdür (135), bu nedenle rRNA modifikasyonları daha da nadirdir.

Kanser araştırmalarında mitokondriyal genomun kodlayan bölgelerinin yanısıra kodlamayan ancak mitokondriyal replikasyon ve transkripsiyonda etkili olan D-loop kontrol bölgesinin analizi büyük önem taşımaktadır (138). D-loop bölgesinin somatik mutasyonları ileri evre kanserlerde daha sık saptanmaktadır (139) ve artmış mutasyon sayıları bazı kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (140). Farklı kanser türlerinde bildirilmiş mitokondriyal mutasyonlar Tablo 2’de özetlenmiştir (130).

Nokta mutasyonlarının yanısıra mtDNA’da saptanan delesyonlar da farklı kanserler ile ilişkilendirilmiştir. *mt-CYB* geninin aşırı ifadesi nedeniyle artmış hücre büyümesine yol açan 21 bç delesyonu (141) mesane kanserlerinde (142) ve 5 tRNA geni ile 7 protein kodlayan geni kapsayan 4977 bç büyüklüğündeki delesyon meme, kolorektal, mide ve baş-boyun gibi farklı kanser türlerinde en sık saptanan yapısal varyasyonlardır (130, 143).

Farklı kanserlerde mitokondriyal kopya sayısı da değişiklik gösterebilmektedir. mtDNA kopya sayısının bazı kanserlerde (tiroid, pankreas, prostat gibi) arttığı bazılarında (mesane, meme, kolorektal, mide gibi) ise azaldığı gösterilmiştir ancak yapılan farklı çalışmalardaki sonuçlar birbiriyle çelişmektedir (130). Kopya sayısı değişikliklerinin mekanizması tam olarak bilinmemekte; artışın hasarlı oksidatif

fosforilasyonu telafi etmek amacıyla (130), azalmış kopya sayısının ise replikasyonda rolü olan D-loop bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklanabileceği (139) değerlendirilmektedir.

Mitokondrideki mutasyonlar, yapısal varyasyonlar ve kopya sayısı değişikliklerinin dışında mitokondriyal proteomun parçası olan nükleer genlerdeki mutasyonlar da mtDNA'da kopya sayısı ve stabilite değişikliklerine neden olabilmekte ve böylece kanser oluşumu ve gelişiminde rol alabilmektedir (144, 145).



Tablo 2: Farklı kanser türleri ile ilişkilendirilmiş mtDNA mutasyonları*

Tümör türü	D-loop varyasyonları	Diğer mitokondriyal genlerde sıklıkla saptanan varyasyonlar
Mesane	Vakaların %57'sinde nokta ve indel mutasyonları	Protein kodlayan genler (<i>ND3</i> , <i>ND4</i> , <i>ND5</i> ve <i>CYB</i>) ile rRNAlar'da eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları
Meme	Vakaların %16-43'ünde nokta ve indel mutasyonları; %29'unda D310 instabilitesi	Mutasyonlar <i>ATP6</i> 'da <i>ATP8</i> 'den daha sık, vakaların %9'unda <i>ND5</i> mutasyonları; <i>ND3</i> (G10398A) önemli olabilir (ama tartışmalı)
Kolorektal	Vakaların %7-40'ında nokta ve indel mutasyonları; %23-44'ünde D310 instabilitesi	Protein kodlayan genlerde ve tRNAlar'da düşük sıklıkta, rRNAlar'da daha yüksek sıklıkta mutasyonlar; tüm genlerde eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları; vakaların %56'sında eş anlamlı olmayan mutasyonlar
Mide	Vakaların %4-48'inde nokta ve indel mutasyonları	Protein kodlayan genlerde eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları; tRNAlar'da nokta ve indel mutasyonları
Baş ve boyun	Çoğu D310 instabilitesi ile ilişkili olmak üzere vakaların %21-37'sinde nokta ve indel mutasyonları	Protein kodlayan genlerde (<i>ND4</i> , <i>ND5</i> , ve Kompleks IV) eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları; tRNA ve rRNAlar'da nokta ve indel mutasyonları
Akciğer	Vakaların %23-35'inde nokta ve indel mutasyonları; %20'sinde D310 instabilitesi	Protein kodlayan genlerde (özellikle Kompleks I) eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları; tRNA ve rRNAlar'da nokta ve indel mutasyonları
Yumurtalık	Vakaların %20-57'sinde nokta ve indel mutasyonları; D310 instabilitesi nadiren olabilir	Protein kodlayan genlerde (<i>ND4</i>) eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları; rRNA'da nokta mutasyonları
Prostat	<i>DLOOP</i> 'ta birkaç mutasyon; D310 instabilitesi hiç yok	Protein kodlayan genlerde (<i>COI</i> , Kompleks I) eş anlamlı ve eş anlamlı olmayan nokta mutasyonları; tRNA ve rRNAlar'da nokta ve indel mutasyonları; metastaz ile birlikte mutasyon yükünde artış

(*) Listedeki mtDNA varyasyonları kanser türleri için en iyi karakterize edilmiş olanları temsil etmektedir. Araştırmalar genellikle somatik nokta mutasyonlar ve homopolimer değişikliklerini kapsamak üzere küçük insersiyon / delesyonlar (indel) üzerinde yoğunlaşmaktadır. D310, D-loop bölgesinde 310. baz yakınında bulunan Cytosine (C) nükleotidi tekrarıdır. Kaynak: Hertweck KL, Dasgupta S. The landscape of mtDNA modifications in cancer: A tale of two cities. *Front Oncol.* 2017;7:262.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta örnekleri

Bu çalışmaya, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Bölümü'nde gliom nedeniyle ameliyat olan hastalardan, daha önce, TÜBİTAK 112s149, 1001 projesinde çalışılmış, 300 gönüllü birey dahil edilmiştir. Bu hastalardan aydınlatılmış onam alındıktan sonra (EK 1), ameliyat öncesinde EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örnekleri eppendorf tüplere bölünerek -80°C'de saklanmış ve ameliyat sırasında çıkarılan tümör örnekleri sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Takipte olan hastaların çalışmaya katılmak istemesi durumunda, bu hastaların Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarı'nda oda sıcaklığında saklanan parafin bloklarından 50 mikronluk kesit alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, mtDNA yeni nesil dizi analizi çalışmasında kullanılan normal beyin dokusu ile 30 hastaya ait tümör / periferik kan örneklerinden elde edilmiş ekzom analizi verileri Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi öğretim üyesi Prof. Dr. Koray Özdoğan tarafından içtenlikle sağlanmıştır.

İlk aşamada 300 hastada belirli nükleer genomik varyasyonlar (*IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C250 ve C228 mutasyonları) incelenmiş, ikinci aşamada ise bu hastalar arasından 29 hasta seçilerek 1 normal beyin dokusu ile birlikte mtDNA yeni nesil dizi analizi yapılmıştır. 29 hasta, Ek 3'te listelenen ve parafin kesit olmayan hastalar arasından özellikle farklı patoloji, morfolojik aşama ve *IDH / TERT* grupları olacak şekilde seçilmiştir. İkinci aşamanın istatistiksel analizleri toplam 59 hastada (seçilen 29 hasta ve ekzom analizi yapılan 30 hasta) gerçekleştirilmiştir. Sanger dizi analizinde ise mtDNA analizi yapılan 59 hasta ve

nükleer genomik varyasyon analizi yapılan hastalardan 19 tanesi olmak üzere toplam 78 hasta kullanılmıştır.

3.1.2. Cihazlar

Çalkalayıcı: Maxi-Mix III, type 65800 – Barnstead / Thermolyne, ABD

Çekerocak: Tezsan, Türkiye

Dizi analizi cihazı: GeXP Genetic Analysis System – Beckman Coulter Life Sciences, ABD

Elektroforez güç kaynağı: Power-Pac-Basic – Bio-rad, ABD

Elektroforez tankı: Horizon 11.14 – Whatman-Biometra, Almanya

Florometrik kantitasyon: Qubit Fluorometer – Thermo Fisher Scientific, ABD

Fragman analizi cihazı: 3130XL Genetic Analyzer – Applied Biosystems, ABD

Hassas terazi: Adventurer Pro – Ohaus, ABD

Isıtıcı blok: Thermo Block TDB-120 – Biosan, Letonya

Jel görüntüleme sistemi: ChemiDoc MP – Bio-rad, ABD

Manyetik plaka: Beckman Coulter Life Sciences, ABD

Mikropipet seti: Pipetman (P10, P20, P200, P1000) – Gilson, ABD

pHmetre: Inolab – WTW, Almanya

Santrifüj: Biofuge pico – Heraeus, Almanya

Spektrofotometre: NanoPhotometer Pearl – Implen, Almanya

Termal döngü cihazı: DNA Engine, PTC-200 – Biorad MJ Research, ABD

Vorteks: Velp Scientifica, İtalya

Yeni nesil dizi analizi cihazı: MiSeq FGx – Illumina, ABD

3.1.3. Kimyasallar ve kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler aşağıda belirtilen üretici firmalardan temin edilmiştir (Tablo 3):

Tablo 3: Kimyasal ve kitlerin temin edildiği firmalar

KİMYASAL / KİT	ÜRETİCİ FİRMA
DNA izolasyonu	
Etanol	Merck, Almanya
Ksilen	Sigma-Aldrich, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat anhidrus (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, ABD
Potasyum klorür (KCl)	Sigma-Aldrich, ABD
QIAamp DNA mini kit	Qiagen, ABD
Sodyum fosfat anhidrus (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich, ABD
PZR	
Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP)	Promega, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, ABD
GoTaq Flexi DNA polimeraz	Promega, ABD
Steril distile su	Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye
Agaroz Jel	
Agaroz	Applichem, Almanya
Borik asit	Sigma-Aldrich, ABD
EDTA	Applichem, Almanya
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich, ABD
Generuler 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific, ABD
Generuler 1 kb DNA ladder	Thermo Scientific, ABD
Tris-Base	Sigma-Aldrich, ABD
Yükleme boyası	Thermo Scientific, ABD
Restriksiyon enzim kesimi	
<i>PvuI</i> restriksiyon enzimi	Thermo Fisher Scientific, ABD

Tablo 3 (devam): Kimyasal ve kitlerin temin edildiği firmalar

PZR ürün saflaştırma	
ExoSAP-IT	Affymetrix, ABD
Sanger dizileme	
GenomeLab DTCS - Quick Start Kit	Beckman Coulter Life Sciences, ABD
Mineral yağ	Sigma-Aldrich, ABD
Separation Gel, LPA 1	Beckman Coulter Life Sciences, ABD
Minidizileme	
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, ABD
LIZ-120 size marker	Applied Biosystems, ABD
POP-7 polimer	Applied Biosystems, ABD
SNaPshot Multiplex Kit	Applied Biosystems, ABD
Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi	
Agencourt AMPure XP Beads	Beckman Coulter Life Sciences, ABD
Agencourt CleanSEQ System	Beckman Coulter Life Sciences, ABD
LA <i>Taq</i> DNA polimeraz	TaKaRa Bio, ABD
MiSeq Reagent Kit v2	Illumina, ABD
Nextera XT DNA Library Prep Kit	Illumina, ABD
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, ABD

3.1.4. Cam ve plastik malzemeler

Solüsyon ve tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan cam şişeler (250, 500 ve 1000 ml) İsolab (Almanya) firmasından alınmıştır. Eppendorf tüpler (200, 500, 1500 µl), pipet uçları (10, 20, 200 ve 1000 mikrolitre) ve plastik plaklar (PZR, Sanger ve yeni nesil dizi analizi için), Axygen (ABD) firmasından sağlanmıştır. GeXP Genetic Analysis System, 3130XL Genetic Analyzer ve MiSeq FGx cihazlarının plastik malzemeleri sırasıyla Beckman Coulter Life Sciences (ABD), Applied Biosystems (ABD) ve Illumina (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

3.1.5. Oligonükleotitler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Sanger dizi analizi ve minidizileme reaksiyonlarında kullanılan primerler İontek (İstanbul, Türkiye); yeni nesil dizi analizi ve bu analizden elde edilen verilerin doğrulanması için yapılan Sanger analizinde kullanılan primerler Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firmaları tarafından sentezlenmiştir. Bu primerlerin nükleotit dizileri sırasıyla Tablo 3, Tablo 6, Tablo 12 ve Tablo 20’de verilmiştir.

Primer tüpleri, sentezleyen firma tarafından liyofilize (dondurarak kurutulmuş) halde gönderilmektedir. Primerler, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek içlerine üretici firma tarafından 100 µM stok elde etmek için belirtilen miktarda PZR’ye uygun steril distile H₂O eklenerek çözülmüştür. 50 µl hacimlerde porsiyonlanarak -20°C’de saklanmıştır. Çalışmalarda kullanılmak üzere steril distile H₂O ile dilüsyon yapılarak 10 pmol primerler elde edilmiştir.

3.1.6. Standart solüsyonlar ve tampon çözeltiler

0,5X TBE (Tris - borik asit - EDTA)	44,5 mM Tris-base, 44,5 mM borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,3
10X PBS (Phosphate buffered saline)	1 litre için: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

3.1.6.1. PZR'ye uygun steril distile H₂O

Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılacak sular, litrelik steril distile su şişesinden 1000 µl olarak 1,5 mL eppendorf tüplere porsiyonlanmış ve 85°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Soğuduktan sonra kullanıma hazır olarak +4°C'de saklanmıştır.

3.1.6.2. dNTP kokteyli

Deoksinükleotit (dNTP) kokteylinin içinde, deoksiadenozin trifosfat (dATP), deoksisitozin trifosfat (dCTP), deoksiganin trifosfat (dGTP), deoksitimin trifosfatın (dTTP) her birinden 10mM olacak şekilde, 100 mM'lık stok solüsyonlarından 100 µl alınmış, üzerine 600 µl H₂O eklenerek toplam 1000 µl hacimde karıştırılmış ve 50-100 µl hacimlerde porsiyonlanarak -20°C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

-80°C'de saklanan periferik kan örneklerinden, sıvı nitrojende saklanan tümör örneklerinden ve oda sıcaklığında saklanan parafin bloklardan elde edilen kesitlerden "QIAamp DNA Mini Kit" kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde genomik DNA elde edilmiştir.

3.2.1.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

-80°C’de saklanan periferik kan örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra vorteks ile iyice karıştırılmış ve içlerinden 200 µl alınarak temiz eppendorf tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 200 µl Lysis Buffer (AL) ve 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra vortekslenmiş ve 10 dakika 56°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ısıtıcıdan alınan örneklere 200 µl etanol (absolut) eklenmiştir. Vortekslenildikten sonra filtreli tüplere aktarılan örnekler 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve altlarındaki tüpler atılarak filtreler temiz tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 500 µl Washing Solution I (AW1) eklenmiş ve 10000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra aynı işlem 500 µl Washing Solution 2 (AW2) ile tekrar edilmiştir. Temiz tüpe aktarılan filtreler kurutulmak üzere 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra temiz tüplere aktarılmış ve üzerlerine 200 µl Elution Buffer (AE) eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNAlar temiz eppendorf tüplere aktarılarak +2°C / +8°C’de saklanmıştır. Uzun süreli saklamalar için -20°C kullanılmıştır.

Elde edilen DNAlar’ın konsantrasyonları ve saflığı saptanmak üzere 260 nm ve 280 nm dalga boylarında NanoPhotometer Pearl cihazı kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. A_{260}/A_{280} oranı 1,8 – 2,0 olan DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir.

3.2.1.2. Sıvı azotta saklanan tümör örneklerinden DNA izolasyonu

Sıvı nitrojende saklanan doku örnekleri oda sıcaklığında petri kabına aktarılmış ve toplamda en fazla 25 mg olacak şekilde dokunun her köşesinden alınan küçük parçaların tamamı bir eppendorf tüpte toplanmıştır. 500 µl 1X PBS eklenerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dibe çöken doku

parçaları üzerindeki PBS uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 200 µl Tissue Lysis Buffer (ATL) ve 20 µl Proteinaz K eklenerek iyice vortekslenmiş ve gece boyu 56°C’de inkübe edilmiştir. Gece boyu bekletilen örneklerin tamamen erimiş olanlarının üzerine 200 µl Lysis Buffer (AL) eklendikten sonra 1 saat 70°C’de inkübe edilmiştir. Örneklerin tamamen erimemiş olması durumunda 20 µl Proteinaz K daha eklenerek 1 saat daha beklenmiş ve sonrasında 70°C’de inkübasyon aşamasına geçilmiştir. İnkübasyon sonunda ısıtıcıdan alınan örneklere 200 µl etanol (absolut) eklenmiş ve bu aşamadan itibaren periferik kan ile aynı protokol uygulanmıştır.

3.2.1.3. Oda sıcaklığında saklanan parafin bloklardan elde edilen kesitlerden DNA izolasyonu

Oda sıcaklığında saklanan parafin bloklardan DNA izolasyonu yapmadan önce deparafinizasyon işlemi aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır:

Eppendorf tüp içindeki 50 mikron kalınlığındaki kesitler üzerine 1000 µl Ksilen eklenerek iyice vortekslenildikten sonra 56°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve çöken örnek üzerindeki Ksilen atılmıştır. 1000 µl absolut etanol eklenmiş, vorteks ile karıştırılmış ve 13000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Absolut etanol için yapılan işlem bir kez daha absolut etanol ve iki kez de steril distile su için tekrarlanmıştır. Son santrifüj aşamasından sonra örnekler 56°C’de en az 10 dakika kapakları açık şekilde bekletilerek kurutulmuştur. Deparafinize edilen örnekler üzerine 200 µl Tissue Lysis Buffer (ATL) ve 20 µl Proteinaz K eklenip iyice vortekslenildikten sonra gece boyu 56°C’de inkübe edilmiş ve bu aşamadan itibaren sıvı azotta saklanan tümör örnekleri ile aynı protokol uygulanmıştır.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

IDH1 (NG_023319.1), *IDH2* (NG_023302.1) ve *TERT* (NG_009265.1) genlerinin sırasıyla *IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C228T ve C250T mutasyonlarını, 8q24.21 bölgesindeki rs55705857 polimorfizmini kapsayan bölgeler toplam 50 µl hacimde 50-100 ng genomik DNA kullanılarak son konsantrasyonlar 1X Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, %1 DMSO, 20 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 4) ve 1.25 U GoTaq Flexi DNA polimeraz olacak şekilde PZR yapılarak çoğaltılmıştır. Yayınlardan alınmayan primerler, Primer3web (v.4.1.0) programı kullanılarak tasarlanmıştır (146). PZR koşulları Tablo 5'teki gibidir ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları (BS) Tablo 4'teki primerlerin erime sıcaklığı (melting temperature – T_m) değerlerine göre ayarlanmıştır. Her primer çifti için en uygun PZR koşulu, farklı bağlanma sıcaklıklarında PZR yapılarak optimize edilmiştir. Bütün PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

Tablo 4: *IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C228T ve C250T mutasyonları ile rs55705857 polimorfizmini kapsayan bölgelerin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer ismi	Primer dizisi	Ürün boyu (bç)	BS (°C)	Kullanılacak analiz yöntemi
<i>pIDH1f</i> -R132* (ileri)	TGGGTAAAACCTATCATCATCGAT	261	58	Enzim kesimi
<i>pIDH1r</i> -132(lf)* (geri)	TGTGTTGAGATGGACGCCTA			
<i>IDH1fc</i> ** (ileri)	ACCAAATGGCACCATACGA	254	60	Sanger dizileme
<i>IDH1rc</i> ** (geri)	TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT			
<i>IDH1</i> -Exon4-1F (ileri)***	ACCAAGGATGCTGCAGAAGCTAT	363	55	Minidizileme
<i>IDH1</i> -Exon4-2R (geri)***	TACCTTGCTTAATGGGTGTAGATACCA			
<i>IDH2</i> -Exon4-1F (ileri)***	CTGTCCTCACAGAGTTCAAGCTGAAG	207	55	Sanger dizileme ve Minidizileme
<i>IDH2</i> -Exon4-2R (geri)***	CAGGTCAGTGGATCCCCTCTCCA			
<i>TERT</i> -F [§] (ileri)	GGCCGATTCGACCTCTCT	489	61	Sanger dizileme
<i>TERT</i> -R [§] (geri)	AGCACCTCGCGGTAGTGG			
<i>TERT</i> -PRMT-3F (ileri)***	GCGGAAAGGAAGGGGAGGGGCT	112	64	Minidizileme
<i>TERT</i> -PRMT-4R (geri)***	CTTCACCTTCCCAGCTCCGCCTCCT			
rs55705857-PCR1F (ileri)***	CAATGCCAGGAGCTTACAAAGAC	222	55	Minidizileme
rs55705857-PCR1R (geri)***	CTTGTAAGCTGTGTTGAATGAGATTCT			

(*) Meyer ve diğerlerinden (147) alınmıştır.

(**) Balss ve diğerlerinden (43) alınmıştır.

(***) Primer3web (v.4.1.0) programı kullanılarak tasarlanmıştır (146).

(§) Killela ve diğerlerinden (7) alınmıştır.

Tablo 5: PZR koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
96°C ilk denatürasyon	2 dakika	1
95°C denatürasyon	30 saniye	
55 – 64°C bağlanma*	35 saniye	35
72°C uzatma	45 saniye	
72°C son uzatma	5 dakika	1
4°C	sonsuz	1

(*) Bağlanma sıcaklıkları, Tablo 3'teki primerlere göre değişiklik göstermektedir.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri, 0,5X TBE kullanılarak yatay elektroforez ile görüntülenmiştir.

Bir şişe içine kullanılacak konsantrasyondaki jeli elde etmek için gerekli miktar agaroz ve 0,5X TBE eklenerek tamamen çözülüp homojen bir görüntü elde edilinceye kadar mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Biraz soğuması beklendikten sonra, çeker ocak altında içine EtBr son konsantrasyon 30-50 ng/ml olacak şekilde eklenmiştir.

Örnekler agaroz jele, ticari olarak temin edilen yükleme boyası (örneklerin 1/5 hacminde) ile birlikte yüklenmiş ve analiz için uygun sürede (30-60 dakika) 120V'da yürütülmüştür. Ürün boylarının belirlenebilmesi için örneklerle birlikte DNA moleküler ağırlık standardı da (ürün boyutuna göre 100 bp veya 1 kb) yürütülmüştür.

3.2.4. Restriksiyon enzim kesimi

PvuI (tanıma dizisi CGAT[^]CG) restriksiyon enzim kesimi ile *IDH1* R132 mutasyon analizi yapabilmek için önce *pIDH1f*-R132 ve *pIDH1r*-132(lf) primerleri (Tablo 4) ile PZR yapılmış ve %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Mutasyon analizi için toplam 20 µl hacimde 15 µl PZR ürünü ve 2 U *PvuI* restriksiyon enzimi kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde enzim kesimi yapılmıştır. Örnekler 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve sonrasında 80°C'de 20 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. Hasta örnekleri ile birlikte pozitif (R132H mutasyonu taşıyıcısı) ve negatif (yabani tip) hasta örnekleri de kontrol olarak çalışılmıştır.

Enzim kesimi sonrasında, kesilmiş ve kontrol olarak kesilmemiş PZR ürünleri %3'lük agaroz jelde 120V'da 1 saat yürütülmüş ve analiz edilmiştir.

3.2.5. PZR ürün saflaştırma

Sanger dizileme ve minidizileme yapılacak PZR ürünleri ticari "ExoSAP-IT" kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde 5 µl PZR ürünü 2 µl enzim ile 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 85°C'de 15 dakika bekletilerek saflaştırılmıştır.

3.2.6. DNA dizi analizi

3.2.6.1. Dizi analizi reaksiyonu

Tablo 4'teki Sanger dizileme primerleri ile yapılmış PZR ürünleri agaroz jelde kontrol edildikten sonra saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünleri kullanılarak, ticari "Genome Lab DTCS - Quick Start Kit" ile, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde toplam 10 µl hacimde, 1 µl saflaştırılmış örnek içine 20 pmol ileri veya geri primer (Tablo 4) ve 4 µl Genome Lab DTCS - Quick Start Master Mix eklenerek Tablo 6'daki programda dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Toplam 10 µl olan dizi analizi reaksiyonu ürünlerinin üzerine 42 µl %85'lik etanol eklenmiştir. 7 kez pipetaj yapıldıktan sonra Beckman örnek plağına aktarılmış ve örnek plağı 3 dakika manyetik plaka içinde bekletilmiştir. 3 dakika sonunda, manyetik plaktan çıkartılmadan, kuyuların içindeki etanol uzaklaştırılmış ve kuyulara 100 µl %85'lik etanol eklenmiştir. 30 saniye beklendikten sonra kuyuların içindeki etanol, örnek plağı manyetik plaktan çıkartılmadan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örnek plağı manyetik plaktan çıkartılmış ve kuyulara 40 µl Sample Loading Solution (SLS) eklenmiştir. Pipetaj yapılarak kuyu duvarlarındaki pelletlerin çözünmesi sağlandıktan sonra örnek plağındaki kuyuların sadece dipleri manyetik plağa değecek şekilde yerleştirilmiş ve 3 dakika inkübe edilmiştir. Süre bitiminde, örnekler üzerine birer damla mineral yağ damlatılarak cihaza yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

Tablo 6: Dizi analizi reaksiyon koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
96°C denatürasyon	10 saniye	
50°C bağlanma	5 saniye	25
60°C uzatma	4 dakika	
4°C	sonsuz	1

3.2.6.2. Otomatik DNA dizi analizi ve verilerin incelenmesi

Etanol presipitasyonu yapılmış dizi analizi reaksiyonu örnekleri, otomatik dizi analizi cihazı Beckman Coulter GeXP Genetic Analysis System’de GenomeLab Separation Gel LPA 1 kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen diziler Lasergene Seqman II, v5.08 (Dnastar, 2005) programı kullanılarak analiz edilmiştir (148).

3.2.7. Minidizileme analizi

3.2.7.1. Minidizileme analizi reaksiyonu

Tablo 4’teki minidizileme primerleri ile yapılmış PZR ürünleri agaroz jelde kontrol edildikten sonra saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünleri kullanılarak, ticari “SNaPshot Multiplex Kit” ile, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde toplam 4 µl hacimde, 1,5 µl saflaştırılmış örnek içine 10 pmol ilgili mutasyona özgü minidizileme primerleri (Tablo 7) ve 0,5 µl SnaPshot Multiplex Ready Reaction Mix eklenerek Tablo 8’deki programda minidizileme analizi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Minidizileme primerleri, Primer3web (v.4.1.0) programı kullanılarak tasarlanmıştır (146).

3.2.7.2. Otomatik minidizileme analizi ve verilerin incelenmesi

Minidizileme analizi reaksiyonu tamamlandıktan sonra ABI 3130 örnek plağına 1,5 µl örnek içine 9 µl Hi-Di Formamide ve 1 µl LIZ-120 size marker eklenmiştir. Örnek plağı, 95°C’de 5 dakika denatüre edilip 3 dakika buzda bekletildikten sonra Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer cihazında POP-7 polimeri kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen veriler GeneMapper Software, versiyon 5 (Applied Biosystems, 2012) programı kullanılarak analiz edilmiştir (149).

Tablo 7: *IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C228T ve C250T mutasyonları ile rs55705857 polimorfizminin minidizileme analizi için kullanılan primerler

Primer ismi	Primer dizisi
<i>IDH1</i> -R132G/S/C	TGGGTAAAACCTATCATCATAGGT
<i>IDH1</i> -R132L/H/P	TTTTATGACTTACTTGATCCCCATAAGCATGA
<i>IDH2</i> -R140Q/L	TGGAAAAGTCCCAATGGAACTATCC
<i>IDH2</i> -R140W	TTTTTGTGGAAAAGTCCCAATGGAACTATC
<i>IDH2</i> -R172K/M	TTTTTCCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCA
<i>IDH2</i> -R172W	TTTTTTTTTTTTCCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGC
<i>hTERT</i> -C228T	GAGGGGCTGGGAGGGCCCGGA
<i>hTERT</i> -C250T	TTTTCGCGGACCCCGCCCCGTCCCGACCCCT
rs55705857-MSQR	TGGCCCTTTGTTCAAGRAATGCAT

Tablo 8: Minidizileme analizi reaksiyon koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
96°C denatürasyon	10 saniye	
50°C bağlanma	5 saniye	25
60°C uzatma	30 saniye	
4°C	sonsuz	1

3.2.8. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi

Genomik DNA örnekleri kullanılarak yapılan mitokondriyal genomun yeni nesil dizi analizi aşamaları Şekil 13’te özetlenmiştir.



Şekil 13: mtDNA genomu yeni nesil dizi analizi deney akış şeması özeti

3.2.8.1. Mitokondriyal genomun amplifikasyonu ve kantifikasyonu

Tüm mitokondriyal genom iki ayrı reaksiyon halinde, 50 µl hacimde 200-250 ng genomik DNA kullanılarak son konsantrasyonlar 1X LA PCR Buffer II (1,5 mM MgCl₂), 1600 µM dNTP, 20 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 9) ve 2,5 U TaKaRa LA *Taq* DNA polimeraz olacak şekilde Tablo 10’daki koşullarda PZR yapılarak çoğaltılmıştır.

Elde edilen mitokondriyal amplikonlar %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiş ve "Qubit dsDNA HS Assay Kit" ile Qubit Fluorometer cihazında kantifikasyonu yapılarak 0,2 ng/μL DNA olacak şekilde normalize edilmiştir.

Tablo 9: Tüm mitokondriyal genomun çoğaltılması amacıyla kullanılan PZR primerleri

Primer ismi	Primer dizisi	Ürün boyu (bp)	B. S. (°C)
MTL-F1* (ileri)	AAAGCACATACCAAGGCCAC	9065	60
MTL-R1* (geri)	TTGGCTCTCCTTGCAAAGTT		
MTL-F2* (ileri)	TATCCGCCATCCCATACATT	11171	60
MTL-R2* (geri)	AATGTTGAGCCGTAGATGCC		

(*) Stawski (150)'den alınmıştır.

Tablo 10: Long-range (uzun) PZR koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
94°C ilk denatürasyon	5 dakika	1
98°C denatürasyon	15 saniye	30
68°C bağlanma (0,2/saniye)	10 saniye	
60°C bağlanma	15 saniye	
68°C uzatma	11 dakika	1
72°C son uzatma	10 dakika	
4°C	sonsuz	1

3.2.8.2. Kütüphane hazırlanması

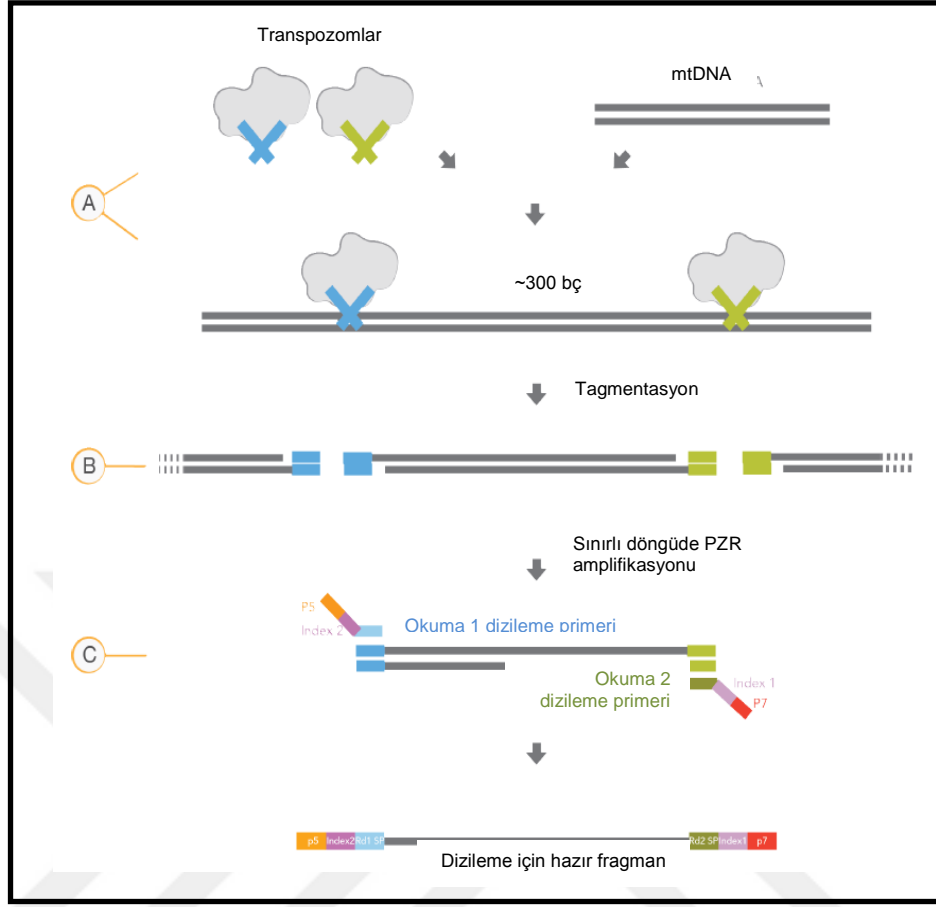
Normalize edilmiş örnekler ile “Nextera XT DNA Library Prep Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kütüphane oluşturulmuştur (151).

I. İşaretleme (tagmentasyon): Bu aşamada, normalize edilmiş mitokondriyal amplikonlardan toplam 1 ng (5 µL) kullanılarak, transpozom aracılığıyla DNA tek aşamada parçalara (fragmanlara) ayrılmış ve adaptör diziler eklenerek işaretlenmiştir (Şekil 14A, 14B).

II. İkinci amplifikasyon: İşaretlenmiş DNA, sınırlı döngüdeki PZR programı (Tablo 11) ile çoğaltılmıştır [PZR ile küme (cluster) oluşumu için gerekli indeks 1 (i7) ve indeks 2 (i5) dizileri de eklenmektedir] (Şekil 14B, 14C).

III. DNA kütüphanesinin pürifikasyonu: AmPure XP boncukları kullanılarak DNA kütüphanesinin pürifikasyonu yapılarak kısa kütüphane parçalarının uzaklaştırılması sağlanmıştır.

IV. Boncuk tabanlı normalizasyon ve kütüphanelerin birleştirilmesi: Bu aşama, her kütüphanenin miktarını normalize etmek için kullanılmıştır. Böylece, örnekler tek tüpte birleştirildiğinde her kütüphanenin daha eşit dağılımı sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 14: “Nextera XT kütüphane hazırlama kiti” çalışma prensibi. Kaynak: Illumina. Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide: Illumina; 2019 [Document # 15031942 v05] (151).

Tablo 11: Sınırlı döngüdeki PZR koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
72°C ilk denatürasyon	3 dakika	1
95°C ilk denatürasyon	30 saniye	
95°C denatürasyon	1 saniye	
55°C bağlanma	30 saniye	12
72°C uzatma	30 saniye	
72°C son uzatma	5 dakika	1
4°C	sonsuz	1

3.2.8.3. Yeni nesil dizi analizi ve verilerin incelenmesi

Birleştirilmiş kütüphaneler, cihaza yüklemeye uygun şekilde seyreltikten ve 98°C’de 2 dakika denatüre edildikten sonra, “MiSeq Reagent Kit v2” kullanılarak MiSeq FGx cihazında dizilemeleri gerçekleştirilmiş, MiSeq Reporter v2.6 (Illumina, ABD, 2016) yazılımı ile FASTQ dosyaları oluşturulmuştur (152). Elde edilen R1 (Read 1 – okuma 1) ve R2 (Read 2 – okuma 2) FASTQ dosyaları paired-end (çift sonlu okuma) olarak, mtDNA Server (v1.0.7) veritabanına yüklenmiş, mitokondriyal haplogrup, varyasyonlar ve bunların heteroplazmi oranları belirlenmiştir (153). Referans dizi olarak revised Cambridge Reference Sequence (rCRS, accession: NC_012920.1) kullanılarak varyasyonlar isimlendirilmiştir. Saptanan varyasyonların patojenite skorlamaları MITOMAP ve HmtVar veritabanları kullanılarak yapılmıştır (112, 154).

3.2.8.4. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler hastaların cinsiyet, saptanmış olan nükleer genetik değişiklikleri ve klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiş ve SPSS Release 18.0.0’da (PASW Statistics 2009) istatistik hesapları yapılmıştır (155). P değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Toplam mitokondriyal genom varyasyon sayıları ve bölgeye göre varyasyon frekansları [bölge varyasyon sayısı genin kilobaz (kb) olarak büyüklüğüne bölünerek normalize edilmiştir] hesaplanmış ve belirli özelliklere göre analiz edilmiştir. Örnekler normal dağılım göstermediğinden, bağımsız grupların ortalamalarını karşılaştırmak için non-parametrik Mann-Whitney U (ikili karşılaştırmalar için) veya Kruskal-Wallis testi (ikiden çoklu karşılaştırmalar için) kullanılmıştır. Cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, nükleer genetik

değişiklikler (*IDH*, *IDH / TERT* durumu) ve haplogruplara göre karşılaştırma yapılmıştır. Cinsiyet (kadın / erkek), morfolojik aşama (derece II & III / IV, derece II / III & IV), *IDH1* R132H mutasyon durumunun (mutant / yabanıl tip) ikili karşılaştırmaları için Mann Whitney U test; DSÖ sınıflandırması (oligodendrogliom / astrositom / GBM), *IDH / TERT* durumu (çifte mutant / sadece *IDH*-mutant / sadece *TERT*-mutant / çifte negatif), morfolojik aşamanın (derece II / III / IV), haplogrup (R / N / L3) ikiden çoklu karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

Saptanan haplogrup frekanslarının *IDH / TERT* durumuna göre analizi ve saptanan mitokondriyal varyant frekanslarının cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, nükleer genetik değişiklikler (*IDH / TERT* durumu) ile haplogruplara göre karşılaştırılması amacıyla saptanan frekanslar ile beklenen frekanslar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının anlaşılması için kullanılan ki-kare testi kullanılmıştır. En küçük teorik frekans <5 olduğu için yapılan ki-kare testlerinden Fisher Exact test değerleri dikkate alınmıştır.

Hastaların sağkalım analizleri için Prof. Dr. Koray Özdoğan tarafından karşılaştırma için logaritmik transformasyon ve log-rank test kullanılarak Kaplan Meier yöntemi uygulanmıştır.

3.2.8.5. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması

Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla 4 örnekte *mt-TR* ve *DLOOP1* lokusları için Tablo 12'deki primerler kullanılarak PZR ve Sanger dizi analizi yapılmıştır.

Tablo 12: *mt-TR* ve *DLOOP1* lokuslarının çoğaltılması ve Sanger analizi için kullanılan primerler

Primer ismi	Primer dizisi	Ürün boyu (bp)	BS (°C)
<i>MT-TR-F10127*</i> (ileri)	ACTACCACAACCTCAACGGCTAC	430	58
<i>MT-TR-R10556*</i> (geri)	GGAGGATATGAGGTGTGAGCG		
<i>MT-DLOOP1-F15971*</i> (ileri)	TTAACTCCACCATTAGCACC	481	58
<i>MT-DLOOP1-R16451*</i> (geri)	GCGAGGAGAGTAGCACTCTTG		

(*) Levin ve diğerlerinden (156) alınmıştır.

3.3. Sınırlılıklar

Çalışma sırasında nükleer genomik varyasyonların analizinde karşılaşılan tek zorluk, optimize PZR koşullarının bulunması sürecinde olmuştur. Bu problemin çözümü için, her primer çifti için farklı bağlanma sıcaklıklarında PZR denemeleri yapılarak optimizasyon sağlanmıştır.

Mitokondriyal genomik varyasyonların analiz süreci, nükleer analizlere göre çok daha zorlu olmuştur. Öncelikle çok büyük olan mitokondriyal genomun amplifikasyonunda zorluklar yaşanmıştır. İlk çalışmalarda iki büyük ampikon elde etmek için kullanılan Q5-High Fidelity DNA Polimeraz (New England Biolabs, ABD) enzimi ile tek bant halinde amplifikasyon elde edilememiştir. Öncelikle farklı MgCl₂ ve primer konsantrasyonları ile bağlanma sıcaklıkları değişiklikleri denenmiş, ancak sonuç elde edilemeyince kullanılan polimeraz sisteminin değiştirilmesine karar verilmiştir. LA Taq DNA polimeraz (TakaraBio, ABD) kullanılarak farklı bağlanma sıcaklıklarında optimizasyon yapılmış ve başarı sağlanmıştır (Şekil 25).

Yeni nesil dizi analizinde karşılaşılmış diğerk bir problem, kapsama derinliğidir (coverage). mtDNA yeni nesil dizi analizi ile çalışılan örneklerin kapsama derinlikleri farklı platformlar kullanılması nedeniyle, eksom analizinde elde edilen derinliklere göre oldukça azdır. Saptanacak varyasyonların atlanmaması için, 4 örnek her iki platformda da çalışılmış ve sadece heteroplazmi oranlarının fark göstermesi nedeniyle daha ekonomik yöntem olan mtDNA yeni nesil dizi analizine devam edilmesine karar verilmiştir.

Ekonomik kısıtlılık da karşı karşıya kaldığımız ayrı bir problemdir. Çok sayıda örnek çalışmak için yeterli bütçemiz olmadığından, bütün tümör örnekleriyle birlikte periferik kan örneklerini çalışmak mümkün olamamıştır. Ancak, kanda mtDNA yenilenmesi (turnover) yüksek olması nedeniyle (157) ikili (tümör ve periferik kan) çalışma yerine, daha fazla tümör örneği çalışılmasına karar verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Dizileme Analizi Yapılan Hastaların Genel Bilgileri

Çalışmaya 167'si (%55,7) düşük dereceli [111 derece II (%66,5), 56 derece III (%33,5)] ve 133'ü (%44,3) yüksek dereceli (IV) olmak üzere toplam 300 hasta dahil edilmiştir. 123'ü (%41) kadın (K), 177'si (%59) erkek (E) olan hastaların 82'si (%27,3) oligodendrogliom (%41,5 K, %58,5 E), 85'i (%28,3) astrositom (%35,3 K, %64,7 E) ve 133'ü (%44,3) glioblastom (%44,4 K, %55,6 E) tanısı ile opere edilmiştir. Oligodendrogliom tanılı hastaların %75,6'sı derece II (%35,5 K, %64,5 E), %24,4'ü derece III (%60 K, %40 E) iken, astrositom tanılı hastaların %57,7'si derece II (%40,8 K, %59,2 E), %42,3'ü derece III (%27,8 K, %72,2 E) ve glioblastom hastalarının hepsi derece IV'tür. Tüm hastaların ameliyat yaşı ortalaması $45,1 \pm 14,63$ olmakla birlikte bu ortalama kadın hastalarda $45,12 \pm 14,83$, erkeklerde ise $45,08 \pm 14,53$ 'tür. Hasta bilgileri Tablo 13'te özetlenmiş, analiz sonuçları ile birlikte detaylı olarak Ek 3'te verilmiştir.

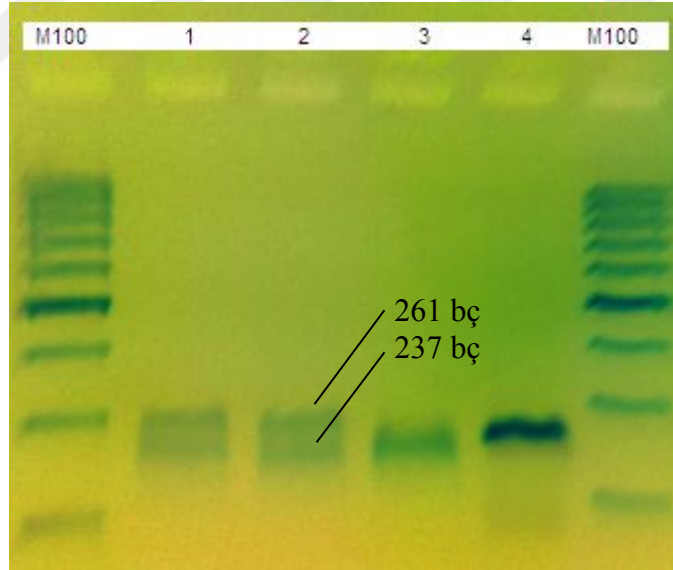
Tablo 13: Dizileme analizi yapılan hastaların genel bilgileri

	İlk tanıda DSÖ Derecesi						Toplam
	II		III		IV		
	K	E	K	E	K	E	
Hasta sayısı (%)	42 (14)	69 (23)	22 (7)	34 (11)	59 (20)	74 (25)	300
Oligodendrogliom (%)	22 (26,8)	40 (48,8)	12 (14,6)	8 (9,8)	0	0	82 (27,3)
Astrositom (%)	20 (23,5)	29 (34,1)	10 (11,8)	26 (30,6)	0	0	85 (28,3)
GBM (%)	0	0	0	0	59 (44,4)	74 (55,6)	133 (44,3)

4.2. *IDH1* 132. Kodon Mutasyonlarının Analizi

4.2.1. *IDH1* R132 mutasyonlarının *PvuI* enzim kesimi ile saptanması

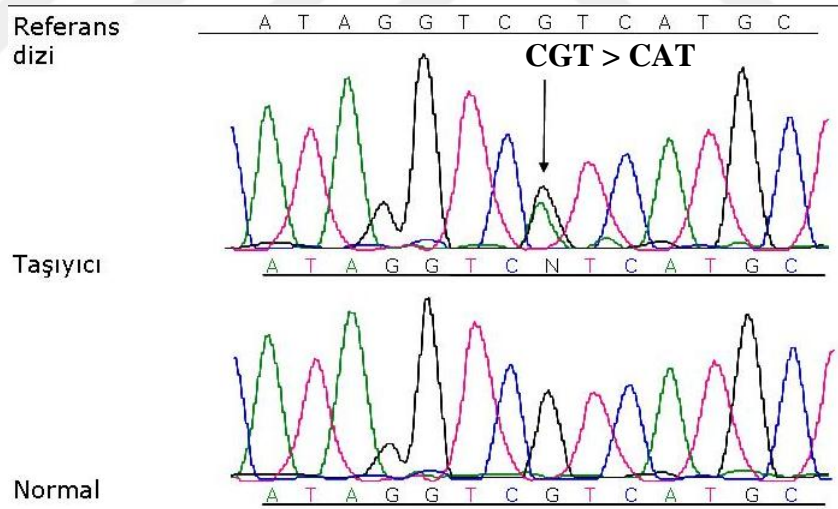
IDH1 geni 132. kodonda Arg→His (R132H), Arg→Cys (R132C), Arg→Gly (R132G), Arg→Leu (R132L) veya Arg→Ser (R132S) mutasyonları bildirilmiştir (5). *PvuI* restriksiyon enziminin tanıma dizisi CGAT[^]CG'dir. *IDH1* geni için diziye özgü ileri primer (*pIDH1f*-R132) ile PZR yapıldığında enzim tanıma bölgesi oluşturulmuş olmaktadır. *pIDH1f*-R132 ve *pIDH1r*-132(lf) (Tablo 4) primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda, yabancı tip için *PvuI* tanıma dizisine sahip ampikon meydana gelmektedir. Özetle, *PvuI* enzim kesimi yapıldığında yabancı tip örneklerde 237 bç uzunluğunda kesilmiş bant saptanırken, mutasyona sahip örneklerde 261 bç uzunluğunda kesilmemiş bant saptanmaktadır (Şekil 15).



Şekil 15: *PvuI* restriksiyon enzim kesimi sonucu. Kesim sonrası PZR ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütülmüştür. 1: *PvuI* enzim kesimi yapılmış hasta örneği (T12-18), 2: *PvuI* enzim kesiminde kullanılan pozitif kontrol (R132H mutasyonu taşıyıcısı), 3: *PvuI* enzim kesiminde kullanılan negatif kontrol (yabancı tip), 4: Restriksiyon enzim kesimi yapılmamış PZR ürünü, M100: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı.

4.2.2. *IDH1* R132 mutasyonuna sahip örneklerin genotip tayini için Sanger dizi analizi

Restriksiyon enzim kesimi sonucunda, kesilmemiş uzun ampikon saptanması durumunda, örneğin genotipi bu yöntem ile belirlenmemektedir. Genotipin belirlenebilmesi için her mutasyona (R132H, R132C, R132G, R132L, R132S) özgü primer ile tekrar PZR yapılması ve sonrasında farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim yapılması gerekmektedir (147). Bu örneklerin genotiplerinin belirlenmesi amacıyla, genomik DNA örneklerinden *IDH1*_{fc} ve *IDH1*_{rc} (Tablo 4) primerleri kullanılarak PZR yapılmış ve saflaştırılmış ürünler Sanger yöntemi kullanılarak aynı primerler ile dizilenmiştir. *PvuI* restriksiyon enzim kesiminde çift bant saptanmış taşıyıcı bir hasta için yapılan Sanger dizileme sonucu [CGT>CAT (Arg→His) mutasyonu] Şekil 16'da gösterilmiştir.

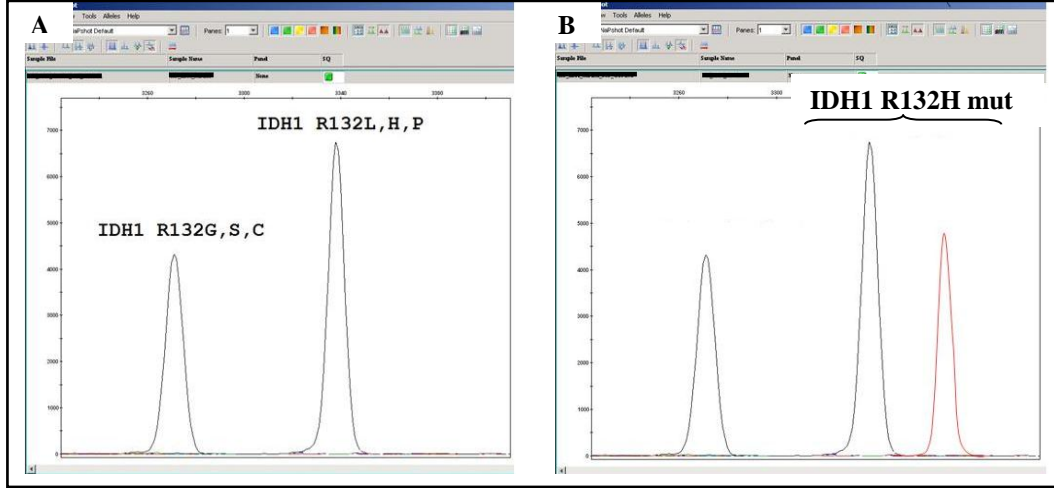


Şekil 16: *IDH1* 132. kodon genotipinin Sanger dizileme sonucu. N: T12-43 kodlu örnekte saptanan heterozigot G>A mutasyonuna işaret etmektedir.

4.2.3. *IDH1* R132 mutasyonunun minidizileme yöntemi ile saptanması

İzositrat dehidrogenaz 1 geni 132. kodonda hangi mutasyonun olduğunun saptanması amacıyla yapılan Sanger dizi analizinde, tümör örneklerinin heterojen olmaları ve Sanger dizi analizi yönteminin hassasiyetinin %15 olması sebebiyle, özellikle tümör / normal doku oranı düşük örneklerde mutasyon saptanmasında zorluklar yaşanmıştır. Bu nedenle, *IDH1* R132 mutasyon analizi için minidizileme yöntemi optimize edilerek kullanılmıştır.

IDH1-Exon4-1F ve *IDH1*-Exon4-2R primerleri (Tablo 4) kullanılarak PZR yapılmış ve sonrasında R132G / R132S / R132C ile R132L / R132H / R132P mutasyonlarına özgü primerler (Tablo 7) ile minidizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Bir hasta örneği için yapılmış *IDH1* R132 bölgesini kapsayan minidizileme sonucu Şekil 17'de gösterilmiştir. Minidizileme sonucunda R132G / R132S / R132C ve R132L / R132H / R132P mutasyonlarına ait birer siyah pik (yabanıl tip) elde edilmektedir (Şekil 17A). Bu piklerden birinin yanında ikinci bir pik daha olması bu hastada kodon 132 mutasyonu olduğu anlamına gelmektedir (Şekil 17B) ve bu pikin rengine göre hastadaki mutasyon isimlendirilmektedir.



Şekil 17: *IDH1* 132. kodon mutasyonlarının minidizileme sonuçları. **A.** Yabanıl tip sonucu. T13-93 kodlu örnekte R132G / R132S / R132C ve R132L / R132H / R132P mutasyonlarına ait birer tane siyah pik olması, yabanıl tipe işaret etmektedir. **B.** *IDH1* R132H mutasyonu için taşıyıcı hasta sonucu (T13-659). *IDH1* R132L, H, P bölgesinde siyah pik (yabanıl tip) yanındaki kırmızı pik, CGT>CAT (Arg→His, R132H) mutasyonuna aittir.

Tüm hastaların minidizileme ile *IDH1* R132 mutasyon analizi sonuçları Tablo 14’te özetlenmiştir.

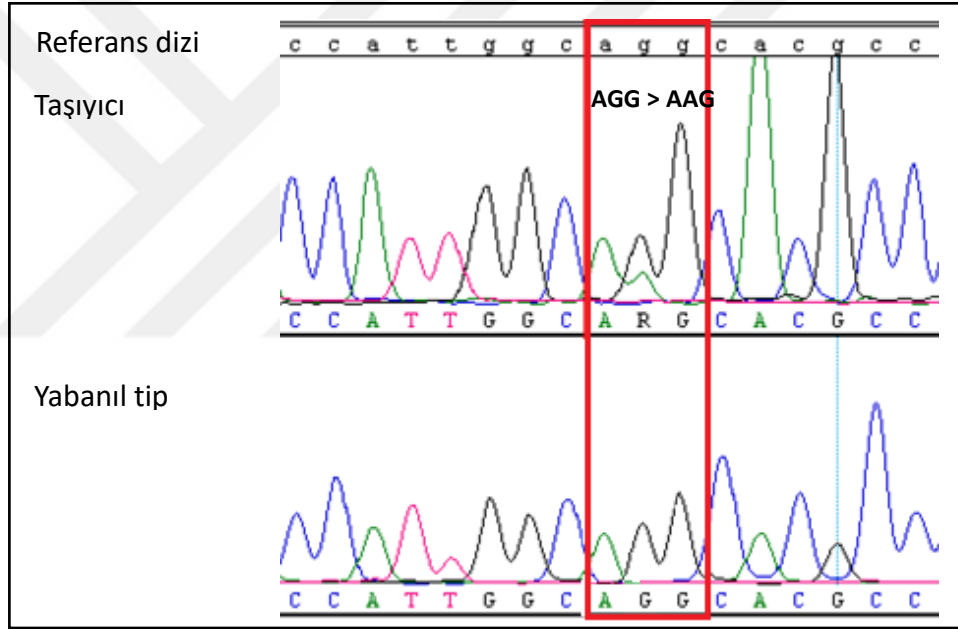
Tablo 14: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların *IDH1* R132 genotip özeti

<i>IDH1</i> R132 Genotip	Hasta sayısı (%) (n = 300)
WT (yabanıl tip)	145 (%48,3)
R132H	139 (%89,7)
R132C	9 (%5,8)
R132S	5 (%3,2)
R132G	2 (%1,3)

4.3. *IDH2* R140 ve R172 Mutasyonlarının Analizi

4.3.1. *IDH2* R140 ve R172 mutasyonlarının Sanger dizi analizi ile saptanması

İzositrat dehidrogenaz 2 geninin 140 ve 172. kodonlarını kapsayan bölgenin PZR ve Sanger dizi analizi *IDH2*-Exon4-1F ile *IDH2*-Exon4-2R primerleri (Tablo 4) kullanılarak yapılmıştır. *IDH2* kodon 172 bölgesini kapsayan Sanger dizi analizi sonucu Şekil 18’de gösterilmiştir.



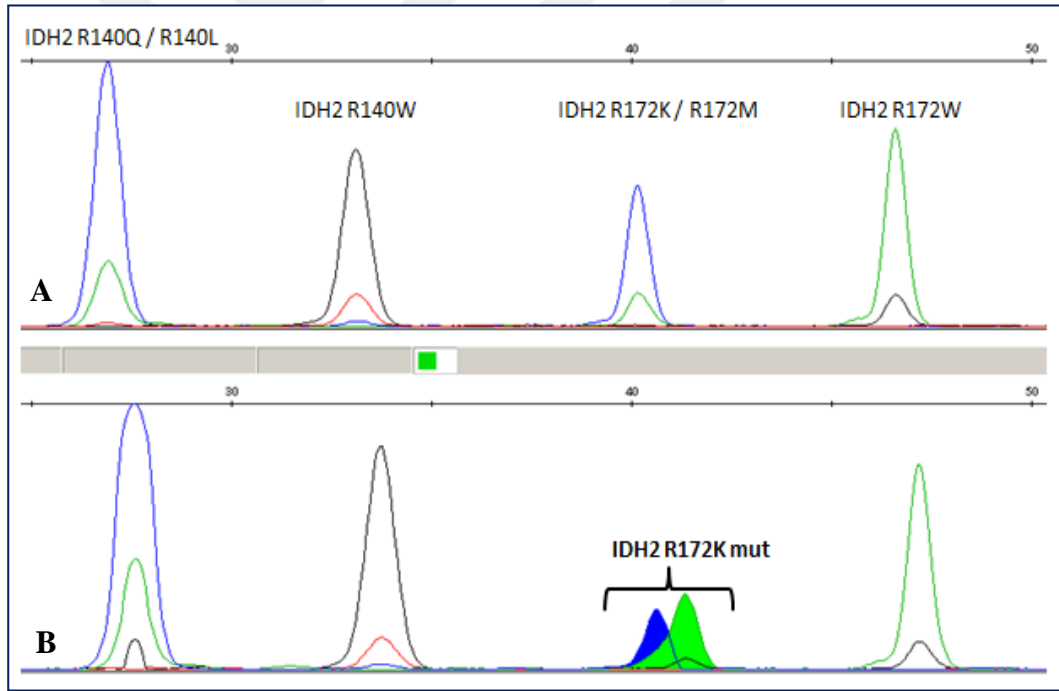
Şekil 18: *IDH2* geninde Sanger dizileme sonucunda 172. kodonda saptanan R172K mutasyonu. R: T14-134 kodlu örnekte saptanan heterozigot G>A mutasyonuna işaret etmektedir.

4.3.2. *IDH2* R140 ve R172 mutasyonları için minidizileme analizi

Minidizileme analizinde *IDH2*-Exon4-1F ile *IDH2*-Exon4-2R primerleri (Tablo 4) ile PZR yapıldıktan sonra, kodon 140 için R140Q / R140L ile R140W

mutasyonları ve kodon 172 için R172K / R172M ile R172W mutasyonlarına özgü minidizileme primerleri (Tablo 7) kullanılmıştır. *IDH2* R140 ve R172 bölgesini kapsayan minidizileme sonucu Şekil 19'da gösterilmiştir. Minidizileme sonucunda sırasıyla kodon 140 için R140Q / R140L (mavi) ile R140W (siyah) mutasyonları ve kodon 172 için R172K / R172M (mavi) ile R172W (yeşil) mutasyonlarına ait toplam dört pik elde edilmektedir (Şekil 19A). Bu piklerden birinin yanında ikinci bir pik daha olması bu hastada ilgili mutasyonun varlığına işaret etmektedir (Şekil 19B) ve bu pikin rengine göre hastadaki mutasyon isimlendirilmektedir.

İzositrat dehidrogenaz 2 geni R140 ve R172 mutasyon analizi çalışılan düşük dereceli hastaların minidizileme sonuçları Tablo 15'te özetlenmiştir.



Şekil 19: *IDH2* 140 ve 172. kodon mutasyonlarının minidizileme sonuçları. **A.** Yabani tip sonucu. T14-115 kodlu örnekte R140Q / R140L ile R140W mutasyonları ve kodon 172 için R172K / R172M ile R172W mutasyonlarına ait sırasıyla birer tane mavi, siyah, mavi ve yeşil pik olması, yabani tipe işaret etmektedir. **B.** *IDH2* R172K mutasyonu için taşıyıcı hasta sonucu (T14-134). *IDH2* R172K bölgesinde mavi pik (yabani tip) yanındaki yeşil pik, AGG>AAG (Arg→Lys, R172K) mutasyonuna aittir.

Tablo 15: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların *IDH2* genotip (R140 ve R172 mutasyonları) özeti

<i>IDH2</i> Genotip (R140 ve R172)	Hasta sayısı (%) (n = 37)
WT (yabancıl tip)	36 (%97,3)
R172K	1

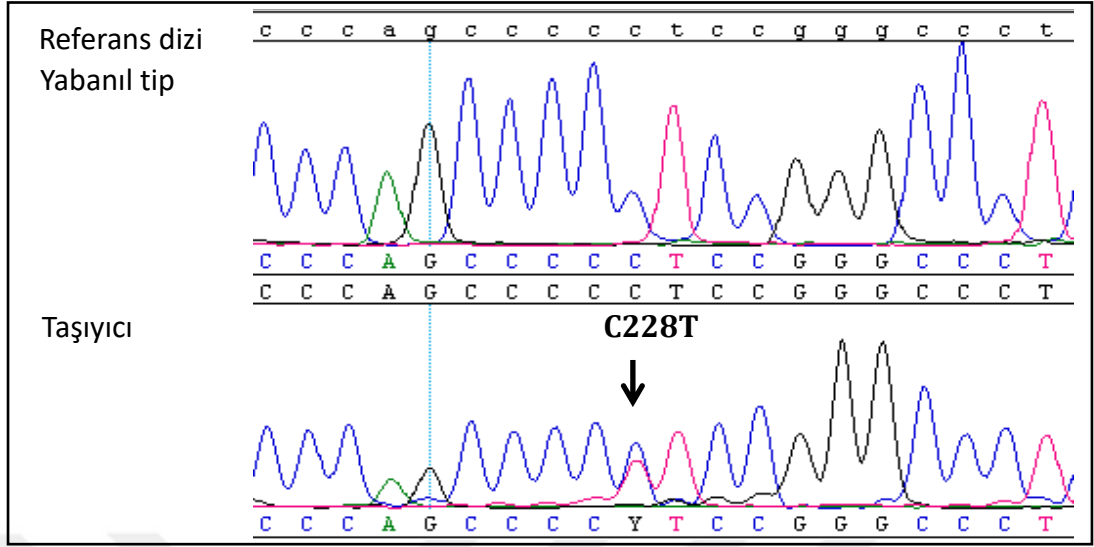
4.4. *TERT* Promotör C228T ve C250T Mutasyonlarının Analizi

4.4.1. *TERT* C228T ve C250T mutasyonlarının Sanger dizi analizi ile saptanması

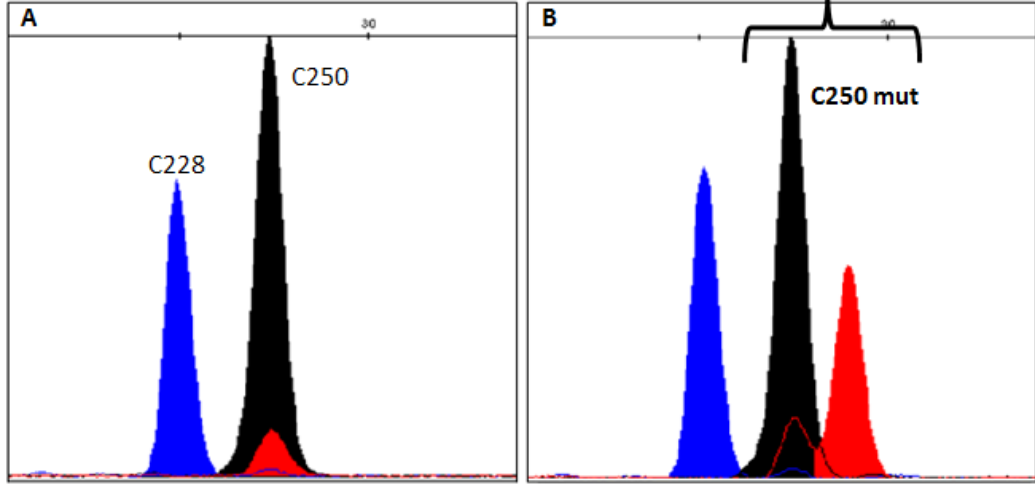
Telomeraz revers transkriptaz geni promotör bölgesindeki C228T ve C250T mutasyonlarını kapsayan bölge *TERT-F* ve *TERT-R* primerleri (Tablo 4) kullanılarak PZR ile çoğaltılmış ve sadece *TERT-R* primerleri ile Sanger dizi analizi yapılmıştır. Heterozigot C228T Sanger dizi analizi sonucu Şekil 20’de gösterilmiştir.

4.4.2. *TERT* C228T ve C250T mutasyonlarının minidizileme analizi

TERT-PRMT-3F ve *TERT-PRMT-4R* (Tablo 3) primerleri ile PZR yapılmış ve C228T ile C250T mutasyonlarına özgü minidizileme primerleri (Tablo 7) ile analiz gerçekleştirilmiştir. *TERT* C228 ve C250 bölgelerini kapsayan minidizileme sonucu Şekil 21’de gösterilmiştir. Minidizileme sonucunda C228 (mavi) ve C250 (siyah) mutasyonları için ayrı ayrı toplam iki pik elde edilmektedir (Şekil 21A). Bu piklerden birinin yanında ikinci bir pik daha olması bu hastada ilgili mutasyon için taşıyıcılığa işaret etmektedir (Şekil 21B).



Şekil 20: *TERT* promotör bölgesi Sanger dizileme sonucunda saptanan C228T mutasyonu. Y: T13-606 kodlu örnekte saptanan heterozigot G>A mutasyonuna işaret etmektedir.



Şekil 21: *TERT* promotör C228 ve C250 mutasyonlarının minidizileme sonuçları. **A.** Yabanıl tip sonucu. T13-646 kodlu örnekte C228T ve C250T mutasyonlarına ait sırasıyla bir mavi ve vir siyah siyah pik olması, yabanıl tipe işaret etmektedir. **B.** *TERT* C250 mutasyonu için taşıyıcı hasta sonucu (T13-645). C250 bölgesinde siyah pik (yabanıl tip) yanındaki kırmızı pik, C>T (C250T) mutasyonuna aittir.

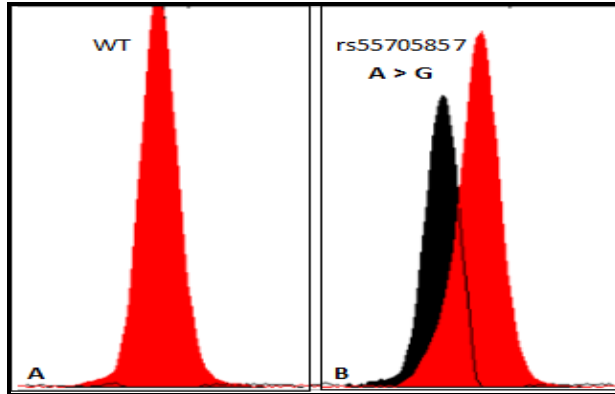
Tüm hastalara ait *TERT* promotör mutasyonları için yapılan minidizileme sonuçları Tablo 16'da özetlenmiştir.

Tablo 16: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların *TERT* promotör (C228 ve C250 mutasyonları) genotip özeti

<i>TERT</i> (C228 ve C250) Genotip	Hasta sayısı (%) (n = 300)
WT (yabanıl tip)	137 (%45,7)
C228T	113 (%69,3)
C250T	50 (%30,1)

4.5. rs55705857 Polimorfizmi İçin Minidizileme Analizi

rs55705857-PCR1F ve rs55705857-PCR1R primerleri (Tablo 4) ile PZR ve sonrasında rs55705857-MSQR primeri (Tablo 7) ile minidizileme analizi yapılmıştır. 8q24.21 bölgesindeki rs55705857 polimorfizmini kapsayan minidizileme sonucu Şekil 5'te gösterilmiştir. Minidizileme sonucunda rs55705857 polimorfizmi için tek bir kırmızı pik elde edilmektedir (Şekil 22A). Bu pikin yanında ikinci bir pik daha olması bu hastada rs55705857 polimorfizmi için taşıyıcılık olduğu anlamına gelmektedir (Şekil 22B).



Şekil 22: rs55705857 polimorfizminin minidizileme sonuçları. **A.** Yabanıl tip sonucu. T13-234 kodlu örnekte rs55705857 polimorfizmine ait tek bir kırmızı pik olması, yabanıl tipe işaret etmektedir. **B.** rs55705857 polimorfizmi için taşıyıcı hasta sonucu (T13-238). Kırmızı pik yanında siyah pik de olması taşıyıcılık anlamına gelmektedir.

rs55705857 polimorfizmi için yapılan minidizileme sonuçları Tablo 17’de özetlenmiştir.

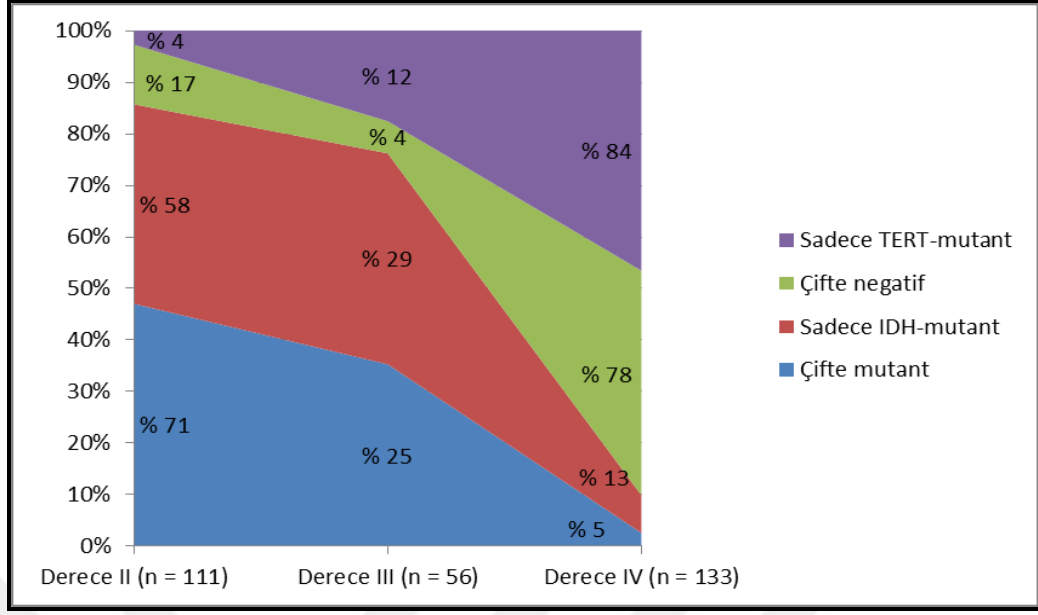
Tablo 17: Minidizileme yöntemiyle analiz edilen hastaların rs55705857 polimorfizmi genotip özeti

rs55705857 polimorfizmi genotip	Hasta sayısı (%) (n = 279)
WT – AA (yabancıl tip)	235 (%84,2)
A/G (taşıyıcı)	41 (%93,2)
G/G (homozigot mutant)	3 (%6,8)

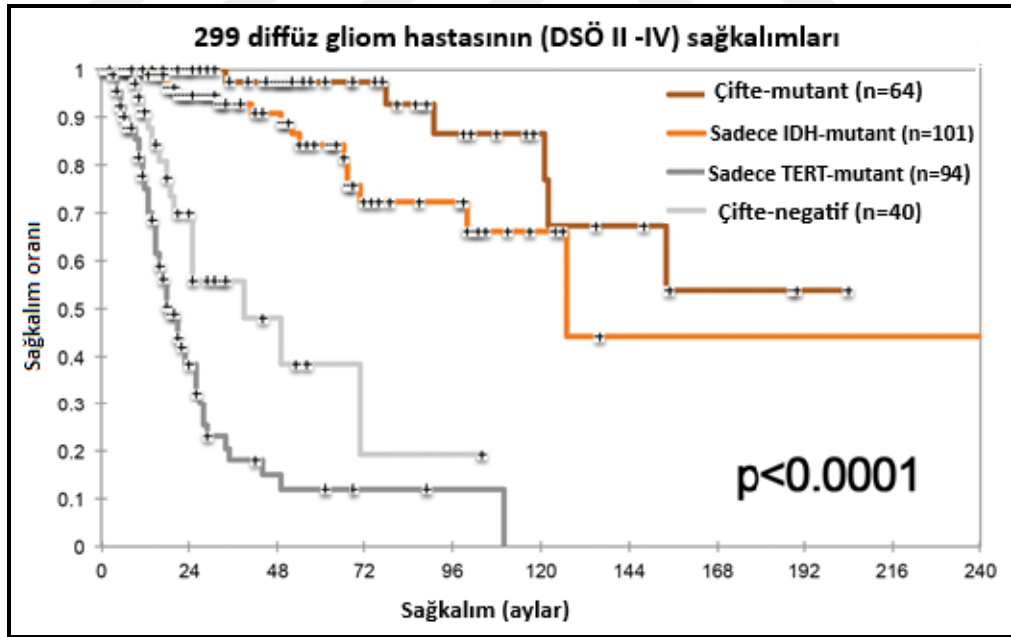
Hastaların *IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C228T ve C250T mutasyonları ile rs55705857 polimorfizm sonuçları detaylı olarak Ek 3’te listelenmiştir.

4.6. *IDH* ve *TERT* Promotör Mutasyonlarının Birlikte Değerlendirilmesi

Hastaların *IDH* ve *TERT* promotör mutasyon sonuçları birlikte değerlendirilmiş ve 4 moleküler alt grup (sadece *IDH*-mutant, sadece *TERT*-mutant, çifte-mutant, çifte-negatif) belirlenmiştir (Şekil 23). Bu moleküler alt gruplara göre hastaların sağkalımları da analiz edilmiştir (Şekil 24).



Şekil 23: Histopatolojik sınıflandırmadan bağımsız olarak *IDH / TERT* durumuna göre moleküler alt gruplara ayrılan hastaların insidansları.



Şekil 24: Hasta sağkalımlarının moleküler alt gruplara göre değerlendirilmesi. Yatay eksen genel sağkalımı (aylar), dikey eksen ise sağkalım oranını göstermektedir. Kaynak: Akyerli CB, Yuksel S, Can O, Erson-Omay EZ, Oktay Y, Cosgun E, et al. Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas. J Neurosurg. 2018;128(4):1102-14.

4.7. Mitokondriyal DNA Yeni Nesil Dizi Analizi

4.7.1. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi yapılan örneklerin genel bilgileri

Çalışılan 300 hasta içinden farklı patoloji ve morfolojik aşamalara sahip gruplardan rastgele seçilmiş 29 tümör ve ilaveten 1 normal beyin dokusu örneği için mtDNA yeni nesil dizi analizi yapılmıştır. Ayrıca, bu hasta örneğine Prof. Dr. Koray Özdoğan tarafından sağlanan 30 hastaya ait tümör ve periferik kan örneklerinden elde edilmiş ekzom analizi verileri (analizler Yale Center for Genome Analysis merkezinde MiSeq platformunda yapılmıştır) de eklenmiştir. Böylece, toplam 59 hasta örneği ile 1 normal beyin dokusu için analiz yapılmıştır. mtDNA yeni nesil dizi analizi yapılmış örneklerin kapsama derinliği (coverage) 100X, ekzom analizi verilerinininki ise 100-300X'tir.

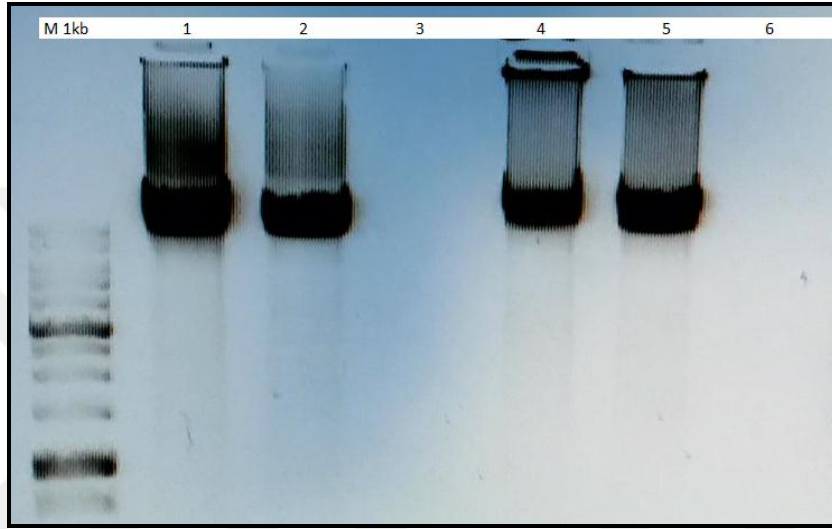
Elli dokuz hasta örneğinin 32'si (%54,2) düşük dereceli [20 derece II (%62,5), 12 derece III (%37,5)] ve 27'si (%45,8) yüksek dereceli (IV) olmak üzere 25'i (%42,4) kadın, 34'ü (%57,6) erkek hastalara aittir. Oligodendrogliom nedeniyle opere olan 12 hastanın (%20,3 - %50 K, %50 E), 8'i (%66,7) derece II (%25 K, %75 E), 4'ü (%33,3) derece III (%100 K) hastalardır. Astrositom tanılı 20 hastanın (%33,9 - %45 K, %55 E), %60'ı derece II (%50 K, %50 E), %40'ı derece III'tür (%37,5 K, %62,5 E). Hepsi derece IV olan 27 (%45,8 - %37 K, %63 E) glioblastom hastası bu çalışmaya dahil edilmiştir. *IDH1* R132 ve *TERT* promotör C228 / C250 mutasyonları için bu hastaların 17'si (%29) sadece *IDH*-mutant, 19'u (%32) sadece *TERT*-mutant, 12'si (%20) çifte-mutant ve 11'i (%19) çifte-negatiftir. Tüm hastaların ameliyat yaşı ortalaması $44,8 \pm 14,25$ olmakla birlikte bu ortalama kadın hastalarda $47,08 \pm 16,43$, erkeklerde ise $43,15 \pm 12,34$ 'tür. Hasta bilgileri Tablo 18'de özetlenmiş, genel değerlendirmeler ile birlikte detaylı olarak Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 18: mtDNA yeni nesil dizi analizi yapılan hastaların genel bilgileri

		Hasta sayısı	Oligodendrogliom (%)	Astrositom (%)	GBM (%)	
Genel toplam (%)		59	12 (20,3)	20 (33,9)	27 (45,8)	
İlk tanıda DSÖ Derecesi	II	Toplam (%)	20 (33,9)	8 (66,7)	12 (60)	0
		Cinsiyet (%)	K: 8 (40) E: 12 (60)	K: 2 (25) E: 6 (75)	K: 6 (50) E: 6 (50)	0
		Sadece <i>IDH</i> mutant	10	0	10	0
		Sadece <i>TERT</i> mutant	1	0	1	0
		Çifte mutant	8	8	0	0
		Çifte negatif	1	0	1	0
	III	Toplam (%)	12 (20,3)	4 (33,3)	8 (40)	0
		Cinsiyet (%)	K: 7 (58,3) E: 5 (41,7)	K: 4 (100) E: 0	K: 3 (37,5) E: 5 (62,5)	0
		Sadece <i>IDH</i> mutant	6	0	6	0
		Sadece <i>TERT</i> mutant	2	0	2	0
		Çifte mutant	4	4	0	0
		Çifte negatif	0	0	0	0
	IV	Toplam (%)	27 (45,8)	0	0	27 (45,8)
		Cinsiyet (%)	K: 10 (37) E: 17 (63)	0	0	K: 10 (37) E: 17 (63)
		Sadece <i>IDH</i> mutant	0	0	0	1
		Sadece <i>TERT</i> mutant	0	0	0	16
		Çifte mutant	0	0	0	0
		Çifte negatif	0	0	0	10

4.7.2. Mitokondriyal genomun amplifikasyonu

Tüm mitokondriyal genom iki reaksiyon halinde uygun primerler kullanılarak (Tablo 9) çoğaltılmış (Şekil 25) ve sonrasında yeni nesil dizi analizi gerçekleştirilmiştir.



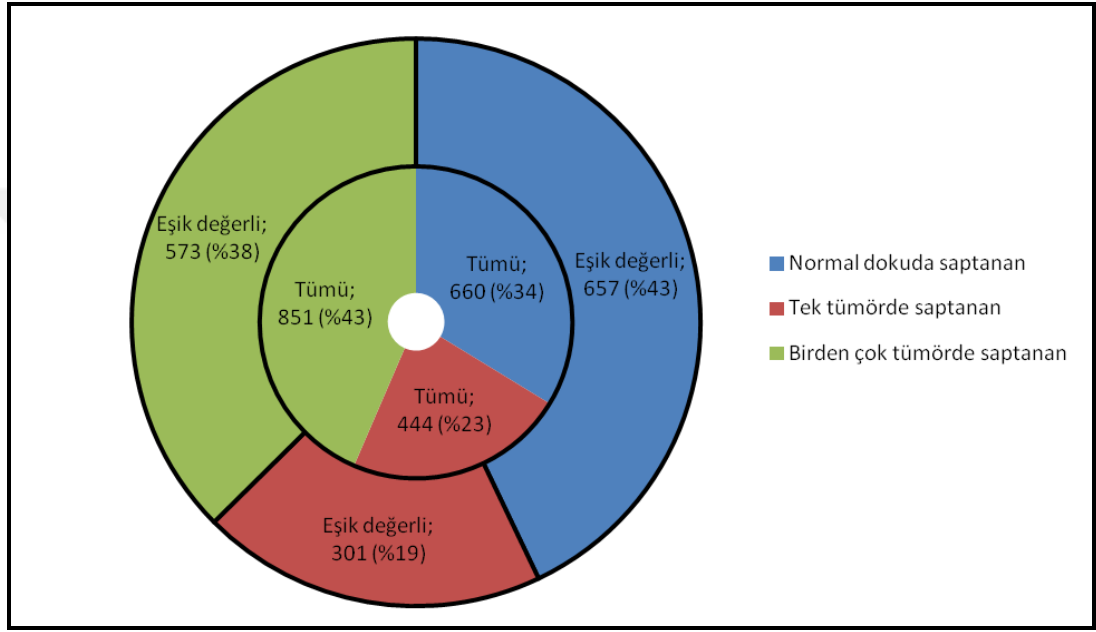
Şekil 25: Takara LA Taq polimeraz ile yapılan mtDNA PZR sonucu. Ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 1-3: MTL-F1 ve MTL-R1 primerleri ve 4-6: MTL-F2 ve MTL-R2 primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. 3. ve 6. kuyularda örnek bulunmamaktadır (negatif kontrol). M1kb: 1kb DNA moleküler ağırlık standardı.

4.7.3. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi verilerinin değerlendirilmesi

4.7.3.1. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyon sayıları

Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen FASTQ dosyaları her örnek için ayrı ayrı mtDNA Server (v1.0.7) veritabanına yüklenmiş (153), mitokondriyal haplogrup, ortalama heteroplazmi oranı ve varyasyonlar belirlenmiştir.

Elli dokuz hasta örneğinde 692'si birbirinden farklı toplam 1955 mutasyon saptanmıştır. Eşik değeri %10 olarak kabul edildiğinde, 472 farklı mutasyon olmak üzere toplam mutasyon sayısı 1531 olmaktadır. Tümör örneklerinde saptanan varyasyonlar normal beyin dokusunda saptanan varyasyonlar ile karşılaştırılarak, bir veya birden fazla tümörde veya normal dokuda da saptananlar kategorize edilmiştir (Şekil 26).

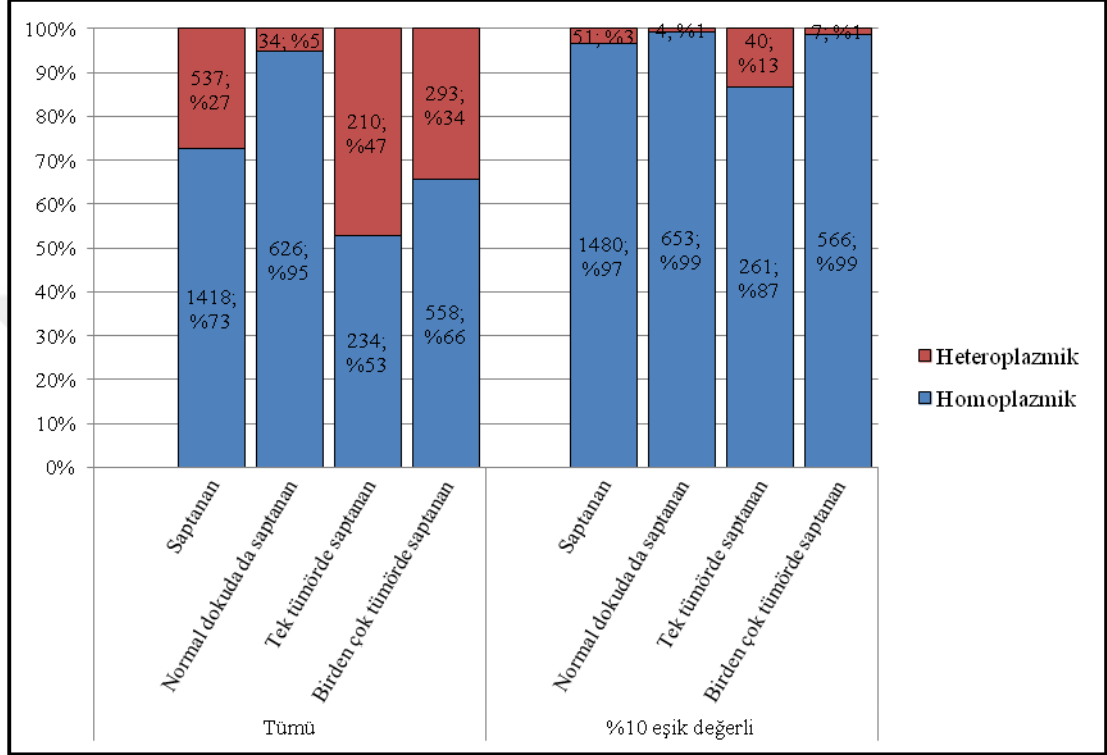


Şekil 26: mtDNA yeni nesil dizi analizinde saptanan varyasyon sayıları. Tümör örneklerinde saptanan varyasyonlar diğer tümörler veya normal beyin dokusunda da saptanmalarına göre gruplandırılmıştır.

4.7.3.2. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonların heteroplazmi durumları

Saptanan varyasyonların heteroplazmi durumu Şekil 27'de özetlenmiştir. Tüm varyasyonlar değerlendirilirken, herhangi bir eşik değeri kullanılmaksızın, heteroplazmi saptanan tüm varyasyonlar sayılmıştır. %10 eşik değerine göre hesaplamada ise sadece eşik değerini geçen varyasyonlar dikkate alınmıştır.

Analiz sonucunda belirlenen mitokondriyal haplogruplar, ortalama heteroplazmi oranları ve varyasyon sayıları (homoplazmik ve %10 eşik değerine göre heteroplazmik) örnek bilgileri ile birlikte Tablo 19’da verilmiştir. Bundan sonraki aşamalarda tüm veriler eşik değeri dikkate alınarak analiz edilmiştir.



Şekil 27: mtDNA analizinde saptanan varyasyonların heteroplazmi değerlendirilmesi

Tablo 19: mtDNA yeni nesil dizi analizi çalışılan örnek bilgileri ve genel değerlendirmeleri

Örnek kodu	Cinsiyet	Patoloji	Derece	IDH/TERT	Haplogrup (üst grup)	Ort. het. oranı (%)	Saptanan varyasyon sayısı
NGA	K	Normal beyin dokusu	-	YOK	U4a (R)	0	32 hom
12-21	E	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	H (R)	5	8 hom
12-25	E	Astrositom	2	sadece IDH-mut	U4c1a (R)	3	33 hom
12-37	E	Astrositom	2	sadece IDH-mut	I2 (N)	1	36 hom
12-38	K	GBM	4	sadece TERT-mut	H5 (R)	1	13 hom
12-46	E	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	H15b (R)	33	1 het, 13 hom
12-100	E	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	U1a1a1 (R)	29	1 het, 36 hom
13-01	K	Oligodendrogliom	3	çifte mutant	K1a+195 (R)	1	31 hom
13-03	E	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	J1c3f (R)	4	30 hom
13-05	K	Astrositom	2	sadece IDH-mut	X2 (N)	6	1 het, 29 hom
13-06	E	Astrositom	3	sadece IDH-mut	H (R)	2	9 hom
13-23	K	Astrositom	2	sadece IDH-mut	K1a8b (R)	0	33 hom
13-25	K	Astrositom	2	sadece IDH-mut	H5a3a (R)	0	0 het, 13 hom
13-27	E	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	H13a1a1 (R)	1	16 hom
13-30	E	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	H13a2 (R)	25	1 het, 13 hom
13-266	K	Oligodendrogliom	3	çifte mutant	W6b (N)	0	37 hom
13-601	E	GBM	4	çifte negatif	H1bd (R)	23	3 het, 11 hom
13-708	K	Oligodendrogliom	3	çifte mutant	H2a2a (R)	2	3 hom
13-743	K	Oligodendrogliom	3	çifte mutant	H11a2 (R)	2	1 het, 18 hom
13-1013	E	Astrositom	2	sadece IDH-mut	W (N)	1	30 hom
13-1022	K	Astrositom	2	sadece IDH-mut	M18 (L3)	10	2 het, 32 hom
14-01	K	Astrositom	2	sadece IDH-mut	H (R)	0	10 hom
14-16	E	Astrositom	3	sadece TERT-mut	U5b1e1 (R)	21	1 het, 27 hom
14-58	E	Astrositom	2	sadece IDH-mut	U3b (R)	0	1 het, 23 hom
14-126	E	Astrositom	3	sadece IDH-mut	H5b (R)	7	1 het, 11 hom
14-176	K	Astrositom	3	sadece IDH-mut	H55 (R)	16	4 het, 12 hom
14-218	K	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	H15b1 (R)	1	14 hom
15-01	K	GBM	4	sadece TERT-mut	W6 (N)	1	35 hom
15-08	K	Oligodendrogliom	2	çifte mutant	W+194 (N)	14	1 het, 37 hom
15-16	E	Astrositom	2	sadece TERT-mut	H16 (R)	3	2 het, 11 hom
NOT-47*	E	GBM	4	çifte negatif	H2+152 (R)	10	2 het, 10 hom

(*) Ekzom analizi yapılmış hastalar.

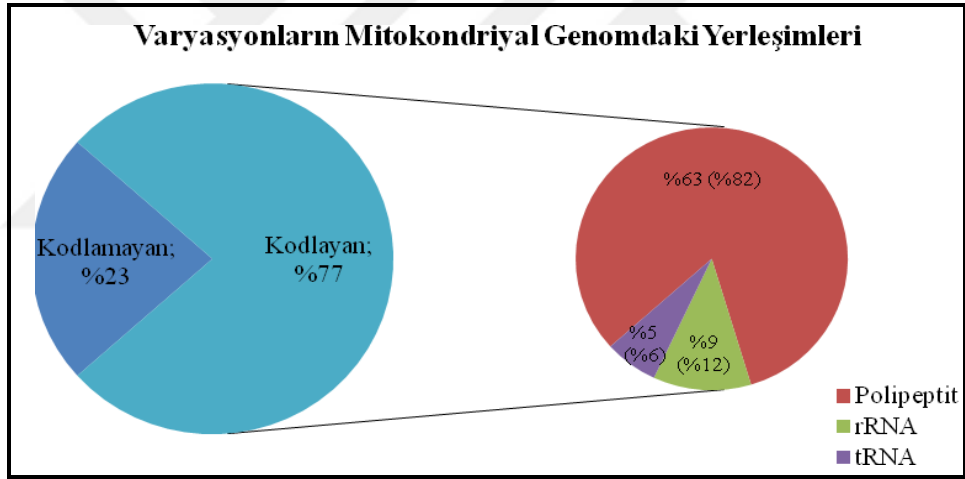
Tablo 19 (devam): mtDNA yeni nesil dizi analizi çalışılan örnek bilgileri ve genel değerlendirmeleri

Örnek kodu	Cinsiyet	Patoloji	Derece	IDH/TERT	Haplogrup (üst grup)	Ort. het. oranı (%)	Saptanan varyasyon sayısı
NOT-48*	K	GBM	4	çifte negatif	J1b1b1 (R)	1	36 hom
NOT-49*	E	Astrositom	2	sadece IDH-mut	U3b2a1 (R)	1	28 hom
NOT-50*	K	Astrositom	3	sadece IDH-mut	T1b3 (R)	1	31 hom
NOT-51*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	U5b1b1a (R)	4	1 het,27 hom
NOT-52*	K	Astrositom	3	sadece TERT-mut	T2b (R)	10	4 het, 32 hom
NOT-53*	E	GBM	4	sadece IDH-mut	H20 (R)	6	1 het,9 hom
NOT-54*	K	GBM	4	sadece TERT-mut	K1a12a (R)	1	33 hom
NOT-55*	E	GBM	4	çifte negatif	H28 (R)	7	3 het, 11 hom
NOT-56*	K	GBM	4	sadece TERT-mut	H1c22 (R)	6	1 het, 13 hom
NOT-58*	K	GBM	4	sadece TERT-mut	T1b3 (R)	4	3 het, 32 hom
NOT-59*	K	GBM	4	çifte negatif	U5a1b1 (R)	2	1 het, 25 hom
NOT-60*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	U1a1b (R)	9	1 het, 37 hom
NOT-61*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	T2b (R)	1	34 hom
NOT-62*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	T1a2a (R)	4	1 het, 40 hom
NOT-63*	E	GBM	4	çifte negatif	J1c10 (R)	14	2 het, 35 hom
NOT-65*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	H+16311 (R)	0	10 hom
NOT-66*	K	GBM	4	sadece TERT-mut	HV2a (R)	5	2 het, 28 hom
NOT-67*	K	GBM	4	çifte negatif	K1b2a2 (R)	1	1 het, 37 hom
NOT-68*	E	GBM	4	çifte negatif	H76 (R)	4	1 het, 14 hom
NOT-69*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	U7b (R)	1	33 hom
NOT-70*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	T2g1 (R)	1	40 hom
NOT-71*	E	GBM	4	çifte negatif	M3a1+204 (L3)	6	1 het, 31 hom
NOT-72*	E	Astrositom	3	sadece IDH-mut	W4d (N)	29	3 het, 35 hom
NOT-73*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	T2c1a (R)	5	1 het, 42 hom
NOT-74*	E	GBM	4	çifte negatif	K1a8b (R)	3	35 hom
NOT-75*	K	GBM	4	sadece TERT-mut	U8b1a2 (R)	3	35 hom
NOT-76*	E	GBM	4	sadece TERT-mut	J2a2d (R)	3	2 het, 42 hom
NOT-77*	E	Astrositom	3	sadece IDH-mut	H14a (R)	2	12 hom
NOT-78*	K	Astrositom	2	çifte negatif	X2d1 (N)	1	35 hom

(*) Ekzom analizi yapılmış hastalar.

4.7.3.3. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonlar

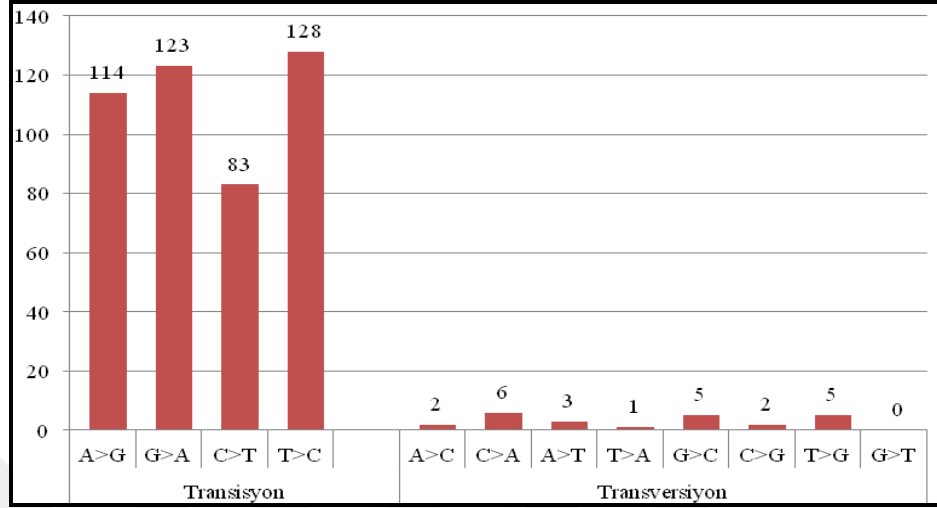
Tümör örneklerinde saptanan varyasyonlar rCRS referans dizisine göre isimlendirilmiş ve detaylı olarak Ek 4’te listelenmiştir. Varyasyonların %77’si mitokondrinin kodlayan bölgesinde, %23’ü ise kodlamayan kontrol bölgesindedir. Varyasyonların bulunduğu bölgeler (kodlamayan kontrol *DLOOP* bölgesi; polipeptitleri, rRNAları veya tRNAları kodlayan genler) Şekil 28’de gruplandırılmıştır. Polipeptitleri kodlayan bölgedeki varyasyonların %32,4’ü eş anlamlı olmayan mutasyonlardır. Bunların 3 tanesi (%3,1) anlamsız (nonsense) mutasyondur. *mt-TF*, *mt-TLI*, *mt-TI*, *mt-TN*, *mt-TY*, *mt-TK*, *mt-TS2*, *mt-TE* tRNA genlerinde varyasyon saptanmamıştır.



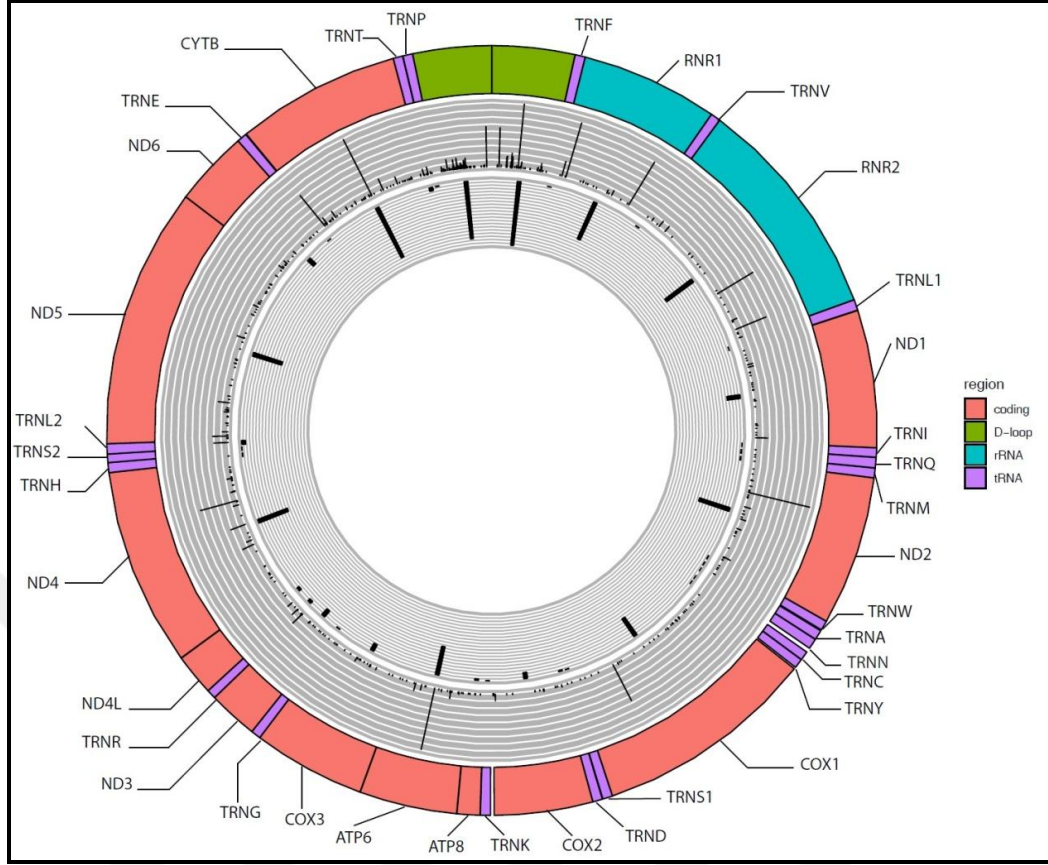
Şekil 28: Varyasyonların mitokondriyal genomda bulunduğu bölgeler. Kodlayan bölge için verilen yüzdeler saptanan bütün varyasyonlara göre orana, parantez içindeki yüzde ise kodlayan bölgede saptanan varyasyonlara göre orana işaret etmektedir.

Saptanan 472 farklı varyasyonun %94,9’u transisyon, kalanları (%5,1) ise transversiyon mutasyonlarıdır. Değişikliklerin hangi nükleotitler arasında olduğu Şekil 29’da gösterilmiştir.

Tüm örnekler için mitokondriyal genomda saptanan varyasyon sayıları (varyantlara göre) ve bölgelere göre varyasyon frekansları Şekil 30'da özetlenmiştir.



Şekil 29: Varyasyonlardaki nükleotit değişikliklerinin dağılımı. Transisyonların oranı (%94,9) transversiyonlara (%5,1) göre oldukça fazladır.



Şekil 30: Mitokondriyal varyasyon sayıları ve bölgelere göre frekansları. Dıştaki gri çizgili alandaki siyah ince barlar varyasyon sayılarını, içteki siyah kalın barlar ise bölgelere göre varyasyon frekanslarını (sıklık) göstermektedir. Gri çizgiler 10'ar aralığa işaret etmektedir.

4.7.3.4. Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonların patojenite skorlamaları

Mitokondriyal genomda saptanan bütün varyasyonlar için patojenite skorlamaları MITOMAP ve HmtVar veritabanları kullanılarak yapılmıştır (112, 154). Toplam 204 varyasyon (%43,5) literatürde GBM (%1), GBM ve diğer kanserler (%4,9) veya GBM dışı kanserler (%85,8) ile ilişkilendirilirken, 24 tanesi HmtVar veritabanında patojenik (%11,8) olarak bildirilmiştir. Patojenik olarak bildirilen varyasyonların sadece %29'u GBM dışı kanserlerle ilişkilendirilmiş,

diğerleri herhangi bir kanser ile ilişkilendirilmemiştir. Literatürde bildirilen varyasyonlar Tablo 20’de listelenmiştir.

Tablo 20: Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonların patojenite değerdendirmeleri. MITOMAP (112) ve HmtVar (154) veritabanlarında GBM, GBM ve / veya diğer kanserler ile ilişkilendirilmiş veya patojenik olarak bildirilmiş varyasyonlar listelenmiştir.

A73G	T1243C	A6146G	A10283G	A13651G ^{§,¥}	G15734A	C16261T
A93G	A1438G	T6221C	G10290A	C13680T	G15884C	C16270T
G143A	A1736G	T6253C	A10398G	G13708A	A15924G [§]	C16278T
T146C	A1811G	G6261 [§]	C10400T	A13780G	G15928A	C16286T
C150T	A2706G	C6371T	T10463C	A13966G	C16069T	C16287T
T152C	G3010A	T6392C	A10550G	A13973T ^{§,¥}	T16092C	C16292T
A153G	T3197C	C7028T	C10822T	A14233G	T16093C	A16293G
G185A*	G3380A ^{§,¥}	C7476T	T10915C	G14364A	C16111T	C16294T
A189G	G3413C ^{§,¥}	G7521A	A11002G	T14470C	T16126C*	C16296T
T195C*	A3480G	T7645C	T11009C	A14587G	G16129A	T16304C
T199C	A3505G	A7768G	A11251G	C14620T [□]	G16145A	A16309G
A200G	G3666A	G8251A	C11332T	C14766T	G16153A	T16311C
G203A	G3705A	G8269A	G11377A	T14783C	A16163G	T16325C
T204C*	G3834A	G8519A ^{§,¥}	C11674T	T14798C*	A16183C	A16335G
G207A	T4216C	G8572A [§]	A11708G	G14846A ^{§,¥}	C16185T	A16343G
G228A	T4336C	G8697A	G11711A ^{§,¥}	C14866T	C16186T	C16354T
T246C	G4580A	A8701G	A11812G	G14869A	T16189C	T16356C*
T250C	C4640A ^{§,¥}	G9055A [§]	A11947G	G14905A	C16192T	T16357C
A263G	T4646C [□]	T9070G	T11961C ^{§,¥}	T14924C ^{§,¥}	C16193T	T16362C
C295T*	A4769G	G9477A	A12033G ^{§,¥}	A15218G	T16209C	G16390A
C456T	G4794A ^{§,¥}	T9498C ^{§,¥}	A12172G [§]	A15244G	C16214T	G16391A
C462T	A4811G	T9540C	A12308G [§]	G15301A	T16217C	A16399G
T477C	A4917G	G9575A	G12372A	A15326G	C16218T	C16465T
T482C	G5226A ^{§,¥}	G9612A ^{§,¥}	T12384C	C15452A	C16223T	T16519C*
T489C	G5460A	G9655A [§]	T12414C	C15535T	T16224C	
C497T	A5656G	A9667G	G12561A	G15591A ^{§,¥}	C16234T	
G499A	G5913A	C9841T ^{§,¥}	C12705T	A15607G	T16249C	
G513A	T5999C*	G9932A	T13064C ^{§,¥}	A15631G	C16256T	
G709A	A6047G ^{§,¥}	T10034C	T13500C	A15662G	C16259T	
A750G	G6129A	T10238C	T13617C	T15693C	C16260T	

(□) GBM ile ilişkilendirilmiş, (*) GBM ve diğer kanserler ile ilişkilendirilmiş, (§) HmtVar veritabanında patojenik olarak bildirilmiş, (¥) herhangi bir kanser ile ilişkilendirilmemiş varyasyonlar.

4.7.3.5. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinde saptanan varyasyonların somatik mutasyon analizi

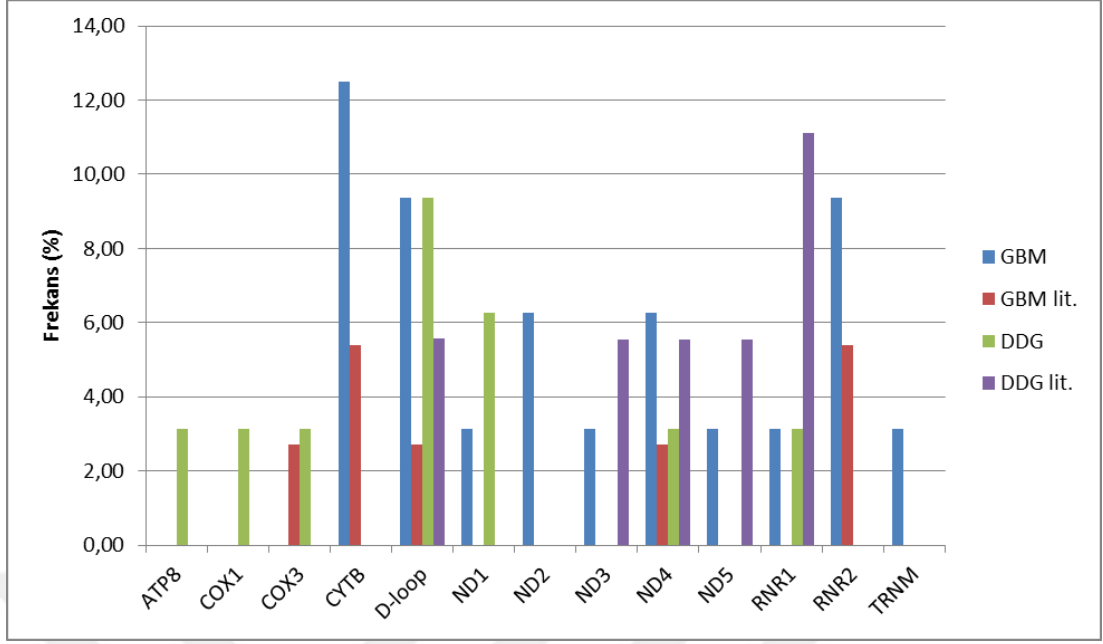
Tümör örnekleri ile birlikte periferik kan örnekleri de çalışılmış 32 hastanın her iki örneğinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak somatik mutasyon analizi yapılmıştır. Buna göre 10 hastada (%31,25) herhangi bir somatik değişiklik saptanmamıştır. 22 hastada tümör ve periferik kan karşılaştırmasında saptanan farklılıklar Tablo 21’de listelenmiştir.

Hasta örneklerimizde saptanan somatik varyasyonların bölgelere göre frekanslarının literatürdeki düşük ve yüksek dereceli gliomlar (136) ile karşılaştırılması Şekil 31’de gösterilmiştir. Hasta grubumuzda GBMler’de *mt-CYB*, *mt-RNR2* ve *DLOOP* bölgelerinin, düşük dereceli gliomlarda (DDG) ise *mt-ND1* ve *DLOOP* bölgelerinin somatik varyasyonları öne çıkmaktadır. Literatürle karşılaştırıldığında, bu sonuçlar GBMler için uyumludur, ancak DDG’lerde *mt-RNR1*’de daha az varyasyon saptanmıştır. Örneklerimizdeki somatik varyasyonların gliom dışı kanserler (136, 158) ile karşılaştırılması ise Şekil 32’de özetlenmiştir. Mide kanserindeki *mt-ND5* geni hariç, *DLOOP* varyasyonları gliom dışı kanserlerde de dikkati çekmektedir.

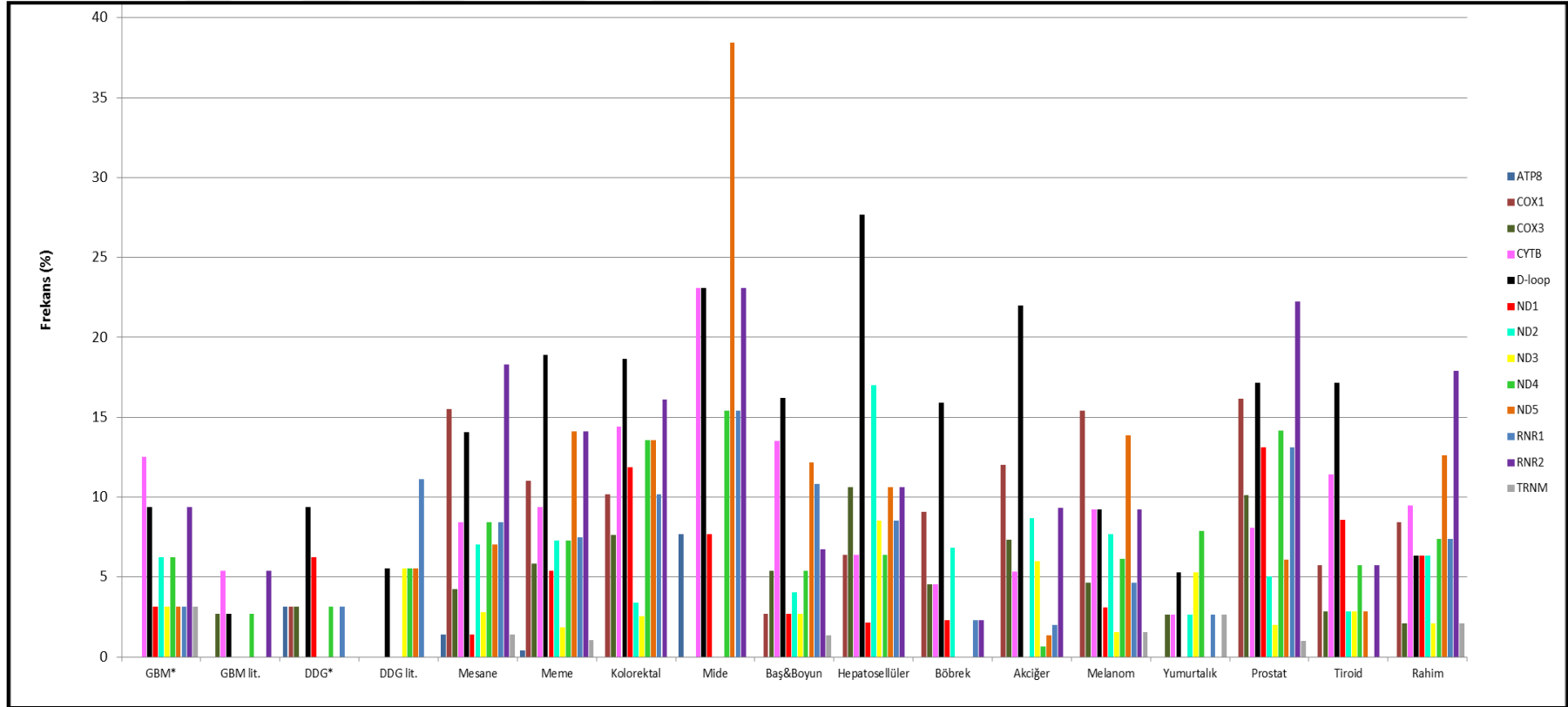
Tablo 21: Tümör ve periferik kan örneklerinin karşılaştırmasında saptanan farklılıklar.

14-176	NOT-49	NOT-51	NOT-52
T690C (0,40 T)	C7028T (hom) [§]	A15746G (0,25 G)	T6109C (0,14 C)
G3380A (0,36 G)		T16189C (hom) ^{§,**}	G9932A (0,30 A)
G3413C (0,38 G)			G11711A (0,14 A)
G8519A (0,21 A)			G7642A (0,38; 0,10 A)*
NOT-53	NOT-55	NOT-58	NOT-59
G3563A (0,39 A)	T146C (0,43 T)	T1420C (0,24 C)	G15761C (0,24 C)
	G5226A (0,30 G)	T11961C (0,36 C)	G5585A (0,07; 0,28A)*
	G11330A (0,10 A)	C16104T (0,19 T)	
		T16189C (hom) ^{§,**}	
NOT-60	NOT-62	NOT-63	NOT-66
G10290A (0,43 G)	G4408A (0,40 A)	G1782A (0,25 G)	T13064C (0,17 C)
C308T (hom) ^{§,**}	C16186T (0,04; 0,27 C)*	G2673A (0,36 G)	
A10768G (0,05; 0,15 G)*			
NOT-67	NOT-68	NOT-71	NOT-72
G4794A (0,19 A)	T16093C (0,28; 0,07 T)*	G3705A (0,21; 0,37 G)*	C194T (0,26 T)
			T196C (0,36 T)
NOT-73	NOT-74	NOT-75	NOT-76
G15731A (0,16 A)	G15591A	C16192T (0,36 T) [§]	G2464A (0,17 A)
	T5291C (0,13) [§]		T16519C (0,29 C)
NOT-77	NOT-78		
T6367C (0,05; 0,21 C)*	A16183C		

(*) Hem tümörde hem periferik kanda bulunan ancak heteroplazmi oranları farklılık gösteren varyasyonlardır. Sırasıyla tümör ve periferik kan örneklerindeki minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir. (§) Periferik kanda saptanan ancak tümörde olmayan varyasyonlar. (**) Düşük kapsama derinliği nedeniyle yalancı pozitif olma ihtimali olan varyasyonlar.



Şekil 31: Bölgelere göre somatik mitokondriyal varyasyon frekanslarının literatür ile karşılaştırılması. GBM ve DDG (düşük dereceli gliomlar) hasta grubumuzu, GBM lit. ve DDG lit. literatürdeki frekansları göstermektedir. Kaynak: Stewart JB, Alaei-Mahabadi B, Sabarinathan R, Samuelsson T, Gorodkin J, Gustafsson CM, et al. Simultaneous DNA and RNA mapping of somatic mitochondrial mutations across diverse human cancers. PLoS Genet. 2015;11(6):e1005333.



Şekil 32: Bölgelere göre somatik mitokondriyal varyasyon frekanslarının literatürdeki gliom dışı kanser frekansları ile karşılaştırılması. Kaynaklar: Stewart JB, Alaei-Mahabadi B, Sabarinathan R, Samuelsson T, Gorodkin J, Gustafsson CM, et al. Simultaneous DNA and RNA mapping of somatic mitochondrial mutations across diverse human cancers. PLoS Genet. 2015;11(6):e1005333. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. Elife. 2014;3. (*) Hasta grubumuzu göstermektedir.

4.7.4. Verilerin istatistiksel analizi

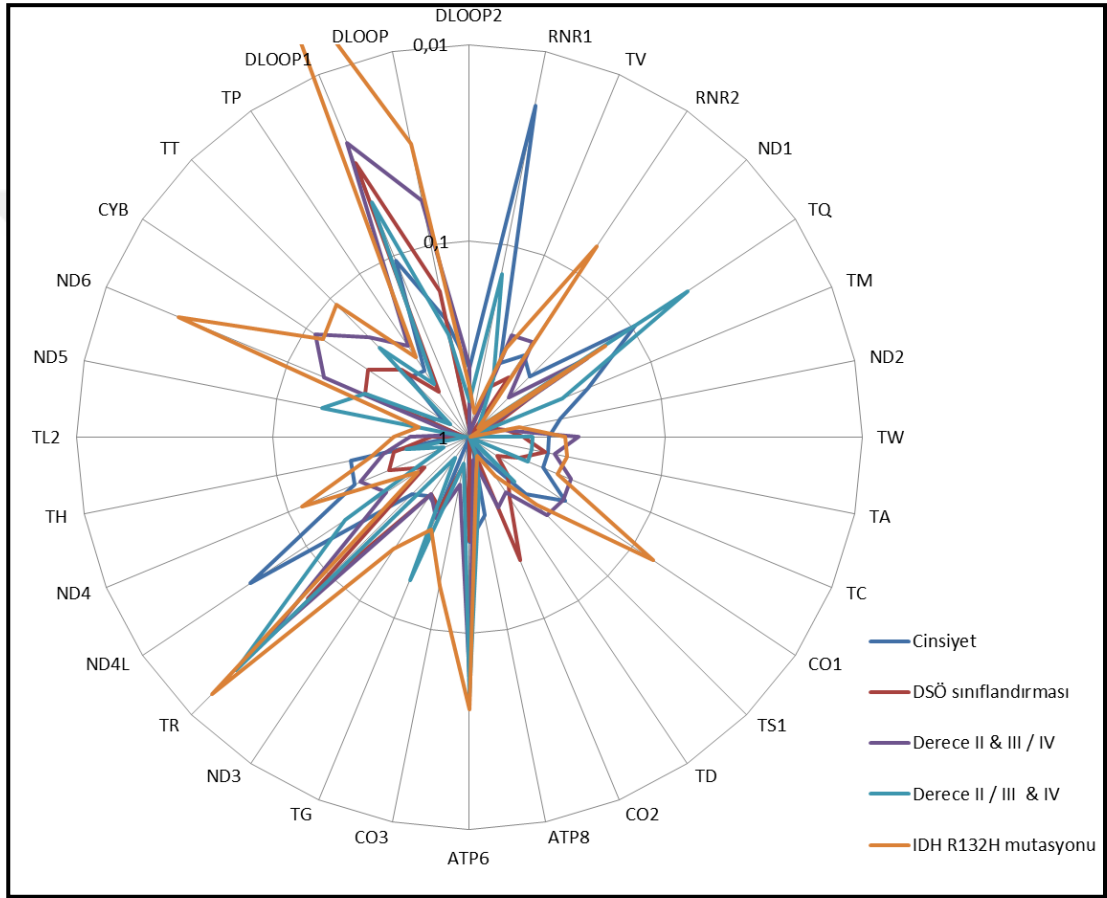
4.7.4.1. Toplam mitokondriyal genom varyasyon sayılarının ve bölgelere göre varyasyon frekanslarının karşılaştırılması

Mitokondriyal bölgelere göre varyasyon frekansları; varyasyon sayısı genin kb olarak büyüklüğüne bölünerek normalize edilmiştir. Kontrol bölgesi *DLOOP* bütün (16024 - 576) olarak ve ayrıca *DLOOP1* (16024 - 16569) ve *DLOOP2* (1 - 576) olmak üzere iki ayrı kısımda değerlendirilmiştir.

Hastaların toplam mitokondriyal genom varyasyon sayısı ve bunların frekansları; hastaların cinsiyet, klinik bulguları (DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama), saptanmış nükleer genetik değişiklikleri (*IDH1*, *IDH* / *TERT* durumu) ve haplogrupları ile birlikte değerlendirilmiş ve istatistik hesapları yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U [cinsiyet (kadın / erkek), morfolojik aşama (derece II & III / IV, derece II / III & IV), *IDH1* R132H mutasyon durumu (mutant / yabani tip)], ikiden çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis [DSÖ sınıflandırması (oligodendrogliom / astrositom / GBM), *IDH* / *TERT* durumu (çifte mutant / sadece *IDH*-mutant / sadece *TERT*-mutant / çifte negatif), morfolojik aşama (derece II / III / IV), haplogrup (R / N / L3)] testleri kullanılmıştır. Lokus varyasyon frekanslarının belirli gruplara göre karşılaştırması Şekil 33'te gösterilmiştir.

Bu değerlendirmelerde morfolojik aşama için derece II / III / IV karşılaştırmasında herhangi bir bölgenin varyasyon frekansı istatistiksel anlamlı olarak saptanmamıştır. DSÖ sınıflandırmasına göre karşılaştırmada *DLOOP1* bölgesi oligodendrogliom ve GBM arasında ($p=0,03$); cinsiyete göre karşılaştırmada *mt-RNR1* ($p=0,02$) ve *mt-ND4L* ($p=0,046$) genleri; morfolojik aşama derece II & III / IV karşılaştırmasında ise *mt-TR* ($p=0,036$) geni ile *DLOOP1* ($p=0,02$) bölgesinin

varyasyon frekansı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İki den çoklu karşılaştırmalarda *IDH / TERT* durumuna göre bütün anlamlı farklar çifte-mutant ile sadece *TERT*-mutant örnekler arasında; haplogrurlara göre *mt-ND3* geni dışındakiler R ve N haplogrurları arasında; *mt-ND3* geninde ise N ve L3 ile R ve L3 haplogrurları arasında saptanmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda üçten fazla bölgede istatistiksel anlamlı olarak saptanan sonuçlar Tablo 22’de özetlenmiştir.



Şekil 33: Bölgelere göre varyasyon frekanslarının cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama ve *IDH1* R132H mutasyonu durumlarına göre istatistiksel karşılaştırılması. Radar grafiğinde logaritmik ölçek kullanılmıştır.

Tablo 22: Mitokondriyal genomdaki toplam varyasyon sayısı ve bölgelere göre frekanslarının belirli özelliklere göre karşılaştırılması. Kırmızı değerler istatistiksel olarak anlamlı (<0,05) verileri göstermektedir.

Lokus	Morfolojik aşama* [¥]	IDH1*	IDH/TERT**	Haplogrup** [⊙]
<i>DLOOP2</i>	0,65	0,55	0,74	0
<i>MT-RNR1</i>	0,14	0,75	0,50	0,034
<i>MT-TV</i>	0,47	0,33	0,55	0,90
<i>MT-RNR2</i>	0,80	0,07	0,32	0,72
<i>MT-ND1</i>	0,85	0,86	1,00	0,048
<i>MT-TQ</i>	0,046	0,15	0,53	0,81
<i>MT-TM</i>	0,31	0,98	0,73	0,81
<i>MT-ND2</i>	1,00	0,55	0,75	0,002
<i>MT-TW</i>	0,47	0,33	0,55	0,90
<i>MT-TA</i>	0,47	0,31	0,48	0,041
<i>MT-TC</i>	0,47	0,33	0,55	0,90
<i>MT-CO1</i>	0,99	0,08	0,04	0,007
<i>MT-TS1</i>	0,47	0,33	0,55	0,90
<i>MT-TD</i>	0,98	0,58	0,68	0,73
<i>MT-CO2</i>	0,80	0,79	0,86	0,002
<i>MT-ATP8</i>	0,54	0,65	0,60	0,81
<i>MT-ATP6</i>	0,048	0,041	0,10	0,09
<i>MT-CO3</i>	0,73	0,17	0,53	0,06
<i>MT-TG</i>	0,16	0,31	0,48	0,041
<i>MT-ND3</i>	0,75	0,21	0,43	0,012 [§]
<i>MT-TR</i>	0,021	0,014	0,016	0,35
<i>MT-ND4L</i>	0,17	0,48	0,90	0,40
<i>MT-ND4</i>	0,72	0,12	0,17	0,23
<i>MT-TH</i>	0,47	0,31	0,48	0,90
<i>MT-TL2</i>	0,96	0,42	0,83	0,13
<i>MT-ND5</i>	0,17	0,55	0,86	0,07
<i>MT-ND6</i>	0,27	0,025	0,15	0,27
<i>MT-CYB</i>	0,76	0,13	0,44	0,26
<i>MT-TT</i>	0,23	0,11	0,33	0,72
<i>MT-TP</i>	0,47	0,33	0,55	0,90
<i>DLOOP1</i>	0,051	0,002	0,007	0,09
Total DLOOP	0,29	0,03	0,17	0
Toplam varyasyon	0,33	0,024	0,13	0,035

(*) Mann-Whitney U test, (**) Kruskal-Wallis test uygulanmıştır. (¥) Morfolojik aşama derece II / III & IV. (⊙) R ve N haplogrupları, (§) N ve L3 ile R ve L3 haplogrupları birbirinden anlamlı olarak farklı.

4.7.4.2. Saptanan mitokondriyal varyantların karşılaştırılması

Saptanan 472 farklı varyasyon arasından, birden fazla hastada saptanan 169 varyasyon DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, *IDH* ve *IDH / TERT* durumuna göre karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı saptanan varyasyonlar Tablo 23'te listelenmiştir. Ayrıca, sadece *mt-ATP6* G9055A varyasyonu cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,035).

Tablo 23: Mitokondriyal genomda saptanan varyasyonların belirli özelliklere göre karşılaştırılması.

Varyasyon	DSÖ	Aşama I*	Aşama II**	Aşama III***	IDH	IDH/TERT
<i>DLOOP2_T55C</i>	0,039					
<i>DLOOP2_T57C</i>	0,039					
<i>DLOOP2_T152C</i>	0,043		0,033		0,012	0,049
<i>DLOOP2_C462T</i>						0,032
<i>RNR1_A1438G</i>	0,039					
<i>RNR2_G1719A</i>	0,048	0,042		0,035		
<i>RNR2_C2259T</i>	0,039					
<i>ND1_T3847C</i>	0,039					
<i>ND1_T4216C</i>					0,042	
<i>ND2_A4917G</i>						0,018
<i>CO1_T6253C</i>	0,039					
<i>CO1_C7028T</i>					0,033	
<i>CO2_G8251A</i>	0,04					
<i>ATP6_G8697A</i>						0,018
<i>TR_T10463C</i>						0,019
<i>ND4_A11251G</i>					0,042	
<i>ND5_C12705T</i>	0,02					
<i>ND5_G13368A</i>						0,018
<i>CYB_C14872T</i>	0,039					
<i>CYB_G14905A</i>						0,018
<i>CYB_C15452A</i>					0,042	
<i>CYB_A15607G</i>						0,018
<i>TT_G15928A</i>						0,018
<i>DLOOP1_T16126C</i>					0,042	
<i>DLOOP1_C16223T</i>	0,02					
<i>DLOOP1_C16294T</i>						0,018
<i>DLOOP1_C16296T</i>						0,014
<i>DLOOP1_T16519C</i>					0,033	

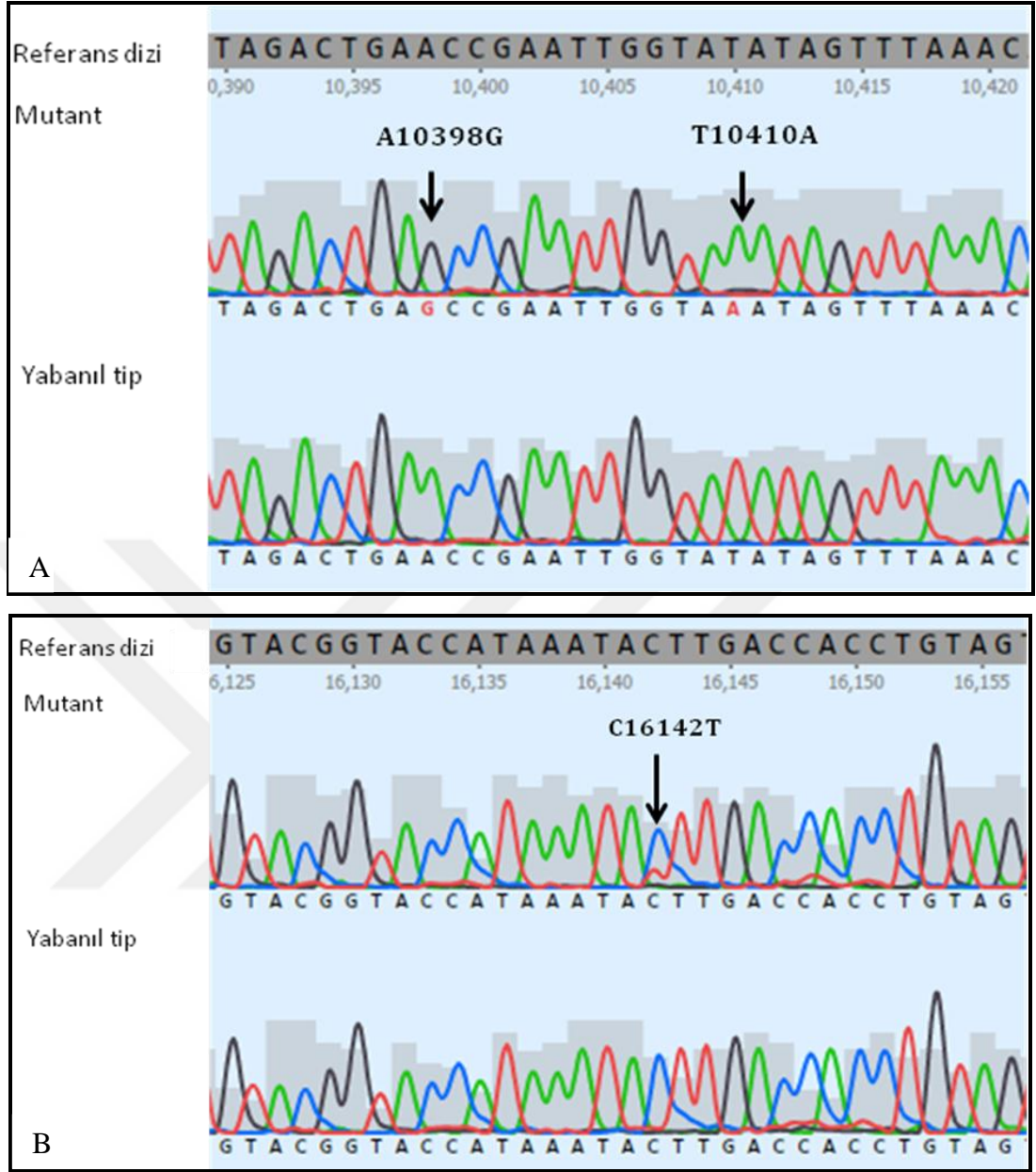
(*) Morfolojik aşamaya göre derece II / III / IV, (**) derece II & III / IV, (***) derece II / III & IV.

4.7.5. Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması

Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinden elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla 4 örnekte istatistiksel analizlerde en çok kategori için anlamlı çıkan *mt-TR* ve *DLOOP1* bölgeleri için PZR ve aynı primerler ile Sanger dizi analizi yapılmıştır. Kullanılan primerler ile kısmi *mt-ND3* (10238-10404) ve bütün *mt-TR* (10405 – 10469) ile kısmi *DLOOP1* (16063 – 16391) lokusları taranmıştır. Sanger analizi ile sadece homoplazmik olarak saptanan varyantlar doğrulanmıştır (Şekil 34A), heteroplazmik (<%10) varyantlar saptanamamıştır.

Ayrıca, bu bölgeler için çalışılan hasta sayısının artırılması amacıyla 19 hasta daha analiz edilmiş ve mtDNA analizinden saptanan varyasyonlardan farklı varyasyonlar da saptanmıştır (Şekil 34B). Hasta bilgileri ve saptanan varyasyonlar Tablo 24’te listelenmiştir.

Toplam 78 hastada en sık (>%10) rastlanan varyasyonlar *mt-ND3* A10398C (%21), *mt-TR* T10463C (%12) ve *DLOOP1* T16126C (%21), T16189C (%18), C16223T (%17), T16311C (%17), C16294T (%14) ve C16261T’dir (%10).



Şekil 34: mtDNA’da Sanger analizi ile saptanan varyasyonlar. **A.** NOT-48 kodlu örnekte mtDNA yeni nesil dizi analizinde saptanan *mt-ND3* A10398G ve *mt-TR* T10410A varyasyonları Sanger dizi analizi ile doğrulanmıştır. **B.** T14-84 kodlu örnekte *DLOOP1* bölgesinde C16142T varyasyonu heteroplazmik olarak saptanmıştır.

Tablo 24: Sanger dizi analizi yapılan hasta bilgileri ve saptanan varyasyonlar.

Örnek	10-04	11-01	12-41	12-42	12-58
Cinsiyet	E	E	E	E	E
Patoloji	GBM	Astrositom	GBM	GBM	GBM
Derece	4	3	4	4	4
IDH	WT	WT	WT	WT	WT
TERT	WT	C228T	C228T	WT	C228T
8q24	A/G	WT	WT	WT	WT
Varyasyonlar	T10238C**	T16093C	A10398G	T16311C	T16304C
	A10398G	T16126C	C16069T		
	G16129A**		T16126C		
	C16223T		C16193T*		
	T16311C		T16311C		
	T16325C**				
G16391A**					
Örnek	12-117	13-739	13-767	13-768	13-799
Cinsiyet	K	K	E	E	K
Patoloji	Oligodendrogliom	Oligodendrogliom	GBM	Astrositom	GBM
Derece	3	3	4	2	4
IDH	R132H	R132H	WT	R132H	WT
TERT	C228T	C228T	C228T	WT	WT
8q24	A/G	WT	A/G	WT	WT
Varyasyonlar	T10463C	T10238C**	A16207C*	C16223T	C16223T
	T16126C	G16145A	C16218T**	C16278T	C16278T
	A16163G	C16176G*		C16286T***	C16286T***
	C16186T**	G16390A**		C16294T	C16294T
	T16189C			A16309G	A16309G
	C16294T			G16390A**	G16390A**
	A16335G**				
Örnek	13-821	13-897	14-08	14-61	14-84
Cinsiyet	K	K	E	K	K
Patoloji	GBM	Astrositom	Astrositom	GBM	Oligodendrogliom
Derece	4	3	2	4	2
IDH	WT	R132H	R132H	WT	R132H
TERT	C228T	WT	WT	WT	C228T
8q24	WT	G/G	A/G	WT	WT
Varyasyonlar	A10398G	T16189C	G16129A**	A10398G	C16142T*
	T10410A**		A16309G	T16224C	T16356C
	C16069T			T16311C	
	T16126C				
	G16145A				
	C16261T				

(*) Yeni nesil dizi analizi yapılan hastalarda saptanmamış, Sanger dizi analizinde tek tümörde saptanmış varyasyon, (**) Yeni nesil dizi analizi yapılan hastaların sadece birinde saptanmış, Sanger analizi ile birlikte sayısı artmış varyasyon, (***) Yeni nesil dizi analizi yapılan hastalarda saptanmamış, Sanger dizi analizinde birden çok tümörde saptanmış varyasyon.

Tablo 24 (devam): Sanger dizi analizi yapılan hasta bilgileri ve saptanan varyasyonlar.

Örnek	14-96	14-109	14-111	14-131
Cinsiyet	E	K	E	E
Patoloji	Astrositom	Astrositom	Astrositom	GBM
Derece	3	2	3	4
<i>IDH</i>	R132H	R132H	R132H	WT
<i>TERT</i>	WT	WT	WT	WT
8q24	WT	A/G	WT	WT
Varyasyonlar	C16354T*	T10463C	G10310A*	C16184A*
		T16126C	C16192T	T16189C
		A16163G	C16261T	T16209C
		C16186T**		C16261T
		T16189C		
		C16294T		

(*) Yeni nesil dizi analizi yapılan hastalarda saptanmamış, Sanger dizi analizinde tek tümörde saptanmış varyasyon, (**) Yeni nesil dizi analizi yapılan hastaların sadece birinde saptanmış, Sanger analizi ile birlikte sayısı artmış varyasyon, (***) Yeni nesil dizi analizi yapılan hastalarda saptanmamış, Sanger dizi analizinde birden çok tümörde saptanmış varyasyon.

Hastalarda *mt-ND3*, *mt-TR* ve *DLOOP1* lokuslarında birden fazla tümörde saptanan varyasyonlar DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, *IDH* ve *IDH / TERT* durumuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Artan örnek sayısı ile birlikte karşılaştırma sonucunda sadece *DLOOP1*'deki C16278T (p=0,05) ve C16296T *IDH / TERT* (p=0,01) durumuna göre, T16126C *IDH* (p=0,05) ve *IDH / TERT*'e (p=0,032) göre, T16311C ise DSÖ sınıflandırması (p=0,017) ve morfolojik aşama derece II & III / IV'e (p=0,03) göre anlamlı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Primer beyin tümörlerinin yaklaşık %30'unu (2), malign primer beyin tümörlerinin ise %80'ini oluşturan (3) glial tümörler neuroglial progenitör hücrelerden geliştiği düşünülen oldukça heterojen bir tümör grubudur (1). Tedavileri tüm bilimsel, teknolojik ve tıbbi gelişmelere rağmen yüz güldürücü değildir. Bunun asıl nedeni glial tümör biyolojisinin yeterli bilinmemesidir. Bu nedenle, nükleer ve mitokondriyal genomun gliom biyolojisi üzerindeki etkisinin araştırılması oldukça önemli bir konudur.

Amacımız doğrultusunda 300 gliom hasta örneğinde belirli nükleer genomik varyasyonlar (*IDH1* R132, *IDH2* R140 ve R172, *TERT* promotör C250 ve C228 mutasyonları) dizi analizi ile incelenmiştir. Ayrıca, 59 hastada mitokondriyal genom yeni nesil yöntemlerle dizilenmiş, haplogrup, mitokondriyal varyasyonlar ve mutasyon oranları (heteroplazmi) analiz edilmiştir. Saptanan mitokondriyal çeşitlilik ve mutasyonların belirli değişkenlerle [cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, nükleer genetik değişiklikler (*IDH*, *IDH/TERT* durumu), haplogruplar] olan ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bölgelerdeki varyasyonların doğrulanması ve daha fazla hastada incelenmesi için Sanger dizileme yapılmıştır.

5.1.1. *IDH1* ve *IDH2* genlerindeki mutasyonların analizi

Hücrede oksidatif strese yol açarak kanseri tetiklediği bilinen *IDH* (*IDH1* veya *IDH2* geninde) mutasyonları çoğunlukla *IDH1* geni 132. kodon (%90'ından fazlasında Arg132His mutasyonu) veya *IDH2* geni 140 veya 172. kodonlarda görülmektedir (5). Bu nedenle çalışmamızdaki tümör örnekleri öncelikle *IDH1* R132 mutasyonları için Sanger dizileme veya minidizileme yöntemleriyle analiz edilmiştir. Çalışılan 300 hastanın %48,3'ü *IDH* mutasyonları için yabancı tip bulunurken, mutasyona sahip hastaların %89,7'sinde R132H mutasyonu saptanmıştır. Saptanan diğer *IDH1* mutasyonları R132C (%5,8), R132S (%3,2) ve R132G'dir (%1,3). Bu oranlar Waitkus ve diğerleri tarafından bildirilmiş oranlar ile uyumludur (51).

İzositrat dehidrogenaz R132 mutasyonları için yabancı tip olan özellikle düşük dereceli tümörlerde *IDH2* geninin 140 ve 172. kodon mutasyonları da incelenmiş ve çalışılan 37 hastanın sadece 1 tanesinde R172K mutasyonu saptanmıştır. Bu sonuç da *IDH1* yabancı tip düşük dereceli hastalarda saptanan *IDH2* mutasyonlarından en sık görülenin R172K olması açısından literatür ile uyumludur (51).

İzositrat dehidrogenaz (*IDH1* veya *IDH2*) mutasyonları düşük dereceli gliomlarda %80-90, GBMler'de ise %10-15 oranında saptanmaktadır (5) Çalışmamızda *IDH* mutasyonları oligodendrogliomlarda %92,7, astrositomlarda %75,6, GBMler'de ise %11,4 oranında saptanmıştır.

5.1.2. *TERT* promotör C228T ve C250T mutasyonlarının analizi

Kanserde görülen artmış telomeraz aktivitesi, telomerlerin korunmasına ve tümörlerin yaşlanmadan kaçışına olanak sağlamaktadır (6). *TERT* geni promotör bölgesindeki somatik mutasyonlar farklı kanserlerle birlikte gliomlarda da gösterilmiştir (7). *TERT* promotör mutasyonları sıklıkla oligodendrogliomlarda (%80-90) ve primer GBMler'de (%75-85) bildirilmiştir (7, 41). Çalışmamızda oligodendrogliomlarda %76,8, GBMler'de %63,6, astrositomlarda ise %18,6 oranında *TERT* promotör mutasyonu saptanmıştır.

En sık saptanan mutasyonlar *TERT* C228T ve C250T mutasyonlarıdır ve yeni ETS/TCF transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri yarattıkları gösterilmiştir (81). Çalışılan 300 hastanın %45,7'sinde *TERT* promotör C228T veya C250T mutasyonlarına rastlanmamıştır. Mutasyon saptanan hastaların %69,3'ünde C228T, %30,1'inde ise C250T mutasyonu saptanmıştır. Farklı malignitelerde C228T mutasyonlarına C250T mutasyonlarından daha çok rastlandığı bildirilmiştir (159, 160).

5.1.3. *IDH* ve *TERT* promotör mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesi

IDH / *TERT* durumu hastaların histolojileriyle birlikte değerlendirildiğinde astrositomların %73,3'ünde sadece *IDH* mutasyonu, %16,3'ünde sadece *TERT* promotör mutasyonu, %2,3'ünde hem *IDH* hem *TERT* mutasyonu saptanırken, %8,1'inde mutasyon saptanmamıştır. Oligodendrogliom hastalarının %73,2'sinde hem *IDH* hem *TERT* mutasyonu (%19,5 sadece *IDH*, %3,7 sadece *TERT* mutasyonu) bulunmuş, %3,7'sinde ise *IDH* ve *TERT* mutasyonlarına rastlanmamıştır. GBM hastalarının %61,4'ünde sadece *TERT* promotör mutasyonu (%9,1 sadece *IDH*, %2,3 hem *IDH* hem *TERT* mutasyonu) saptanırken, %27,3'ü taranan mutasyonlar için

yabanıl tiptir. Ancak, 2020 Ocak ayında cIMPACT-NOW tarafından DSÖ sınıflandırmasında güncelleme yapılması önerilmiştir. Buna göre, “DSÖ derece IV, IDH-mutant GBM” olarak sınıflandırılan fakat genetik olarak IDH-yabanıl tip GBMler’den çok derece II veya III IDH-mutant astrositomlara benzerlik gösteren tümörlerin “DSÖ derece IV, IDH-mutant astrositom” olarak sınıflandırılması söz konusu olabilecektir (161).

Hastalarda saptanan *IDH* ve *TERT* promotör mutasyon profili histolojiden bağımsız olarak değerlendirildiğinde ayrı prognostik özelliklere sahip; sadece *IDH*-mutant, sadece *TERT*-mutant, çifte-mutant ve çifte-negatif olmak üzere 4 moleküler alt grup belirlenmiştir (Şekil 23). *IDH*-mutant gliomlar arasında, çifte-mutant olanların sadece *IDH*-mutant olanlara oranla daha iyi sağkalıma sahip olduğu ve tümörün ileri evreye geçme oranının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Sadece *TERT*-mutant alt grup ise diğer gruplara kıyasla daha kötü sağkalıma sahiptir ve primer GBM biyolojisi göstermektedir. Çifte-negatif örnekler ise genetik ve biyolojik olarak oldukça heterojen olmakla birlikte sağkalımları iyi değildir (Şekil 24).

5.1.4. rs55705857 polimorfizminin minidizileme analizi

Sağlıklı insanlarda görülebilen nükleer genetik farklılıkların belirgin bir gliom yatkınlığı oluşturabileceği gösterilmiştir. 8q24.21 bölgesindeki rs55705857 polimorfizminin özellikle *IDH 1/2* mutasyonu taşıyan glial tümörlere yatkınlık ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (8, 9). Çalışılan 279 hastanın %84,2’si rs55705857 polimorfizmi için yabanıl tip (AA) olarak bulunmuştur. Varyasyon saptanan örneklerin %93,2’si rs55705857 polimorfizmi için heterozigot (A/G), %6,8’i ise homozigottur (G/G). rs55705857 polimorfizmi saptanan (heterozigot veya homozigot) hastaların %81,8’i *IDH* mutasyonları için taşıyıcıdır (Ek 3).

5.1.5. Tümör örneklerinin mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizi

Hücrenin genetik kodu, hücre çekirdeği ve mitokondri olmak üzere iki farklı organelde yerleşimlidir. Nükleer genom, eşeyli kalıtılan ve hücre içi tüm olaylardan sorumlu genleri taşıyan, son derece detaylı araştırılmış bir bilgi aktarım sistemidir. Mitokondri, nükleer genoma göre çok daha küçük bir genoma sahiptir ve matrilineal kalıtım göstermektedir. Mitokondriyal genomda, az sayıda, hücrenin yapıtaşları olan ve enerji metabolizması için çok önemli enzimler kodlanmaktadır. Mitokondriyal genom, hücre biyolojisini farklı şekilde etkilemektedir.

Paketlenme ve tamir mekanizmalarının nükleer genomdaki kadar etkin olmayışı nedeniyle, mtDNA mutasyonlara nükleer DNA'dan daha çok açıktır (114). mtDNA mutasyonları kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (125, 126, 130). Çalışmamızda, mtDNA yeni nesil dizi analizi yapılan 59 gliom hastasında 692'si birbirinden farklı olmak üzere toplam 1955 varyasyon saptanmıştır. Bunlar literatürdeki rCRS referans dizisine (accession: NC_012920.1) göre isimlendirilmiştir (110).

Çoğunlukla ağır mutasyonlar hücre içinde normal mtDNA ile karışık halde bulunurlar. Heteroplazmi olarak bilinen bu durum, bir bireyde birden fazla mtDNA tipinin bulunmasıdır. Heteroplazmik alellerin yüzdesi, hücre bölünmeleri sırasında değişiklik gösterebilmektedir. Mutant mtDNA yüzdesinin artışı, enerji metabolizmasındaki hasarı arttırmaktadır ve doku / organın enerji gereksinimine göre fenotipe etkisi değişmektedir (15). Literatürde yapılan çalışmalarda eşik değeri genellikle %20 olarak değerlendirilmektedir (162). Çalışmamızda düşük heteroplazmiye sahip varyasyonların da atlanmaması için, eşik değeri %10 olarak kabul edildiğinde, 472'si farklı olmak üzere toplam 1531 varyasyon saptanmıştır.

Saptanan mutasyonların hastalık biyolojisi ile ilişkisinin araştırılabilmesi için tümör örneklerinde belirlenen varyasyonlar, birbirleriyle ve normal beyin dokusunda saptanan varyasyonlar ile karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz verileri genel olarak değerlendirdiğimizde, bu varyasyonların %37'si birden fazla tümörde saptanırken, %20'si sadece tek tümörde, %43'ü de normal beyin dokusunda da bulunmuştur (Şekil 26).

Evrin sürecinde mtDNA'da çok sayıda mutasyon meydana gelmiştir ve bu nedenle nükleer genomda olduğu gibi, mitokondriyal genomda da insanlar arası ve insan toplulukları arası çeşitlilik oldukça fazladır. Bu değişiklikler günümüzde mitokondriyal haplogrupları belirlemek üzere kullanılmaktadır (15, 119). Gliom hasta örneğimizdeki mitokondriyal haplogrup dağılımı 23H (%39), 10 U (%16,9), 7 T (%11,9), 5 K (%8,5), 5 W (%8,5), 4 J (%6,8), 2 M (%3,4), 2 X (%3,4), 1 I (%1,7) olarak belirlenmiştir. Bu oranlar Eupedia veritabanında Türk popülasyonu için verilen değerlerle (Şekil 12C) büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Örneğimizde değişik etnik kökenlere sahip hastaların da (yaklaşık %8,5) olması haplogrup dağılımlarındaki küçük farklılıkların nedenini açıklayabilir.

Haplogrupların mitokondriyal fonksiyon değişikliklerine neden olarak kanser yatkınlığını direkt olarak etkilediği gösterilmiştir (11, 18). Meme kanseri yatkınlığı ile ilişkili olduğu bilinen *BRCA2* mutasyonlarının, o insanın mitokondriyal haplogrubuna göre kanser riskini etkilediği kanıtlanmıştır (18). Hasta grubumuzdaki haplogruplar çok farklılık göstermektedir. Bu nedenle haplogruplar R, N ve L3 (Şekil 12A) olmak üzere üst gruplara göre sınıflandırılmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde *IDH*, *IDH / TERT* durumuna göre haplogruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bunun yanısıra, toplam varyasyon sayıları ve birçok bölgenin varyasyon frekansları R ve N haplogrupları arasında anlamlı farklılık göstermektedir (Tablo 22), ancak sadece iki hasta L3 haplogrubundadır.

Mitokondriyal genom enerji metabolizması ve hücre çoğalması için anahtar rolde olan ve hücre sağkalımı için stabil kalması gereken az sayıda geni kodlamaktadır. Bu nedenle, mtDNA'daki çok ağır mutasyonlar tolere edilememekte ve hücrede apoptoza neden olmaktadır (105, 106). Hasta örneğimizde saptanan varyasyonların %77'si mitokondrinin kodlayan bölgesinde, %23'ü ise kodlamayan kontrol bölgesindedir (Şekil 28). Polipeptitleri kodlayan genlerdeki varyasyonların %67,6'sı eş anlamlı varyasyonlardır. Eş anlamlı olmayan varyasyonların (%32,4) üç tanesi (G3563A, G6129A, G15234A) anlamsız mutasyona neden olmaktadır. Bu varyasyonlar tümör örneklerinde heteroplazmik (sırasıyla %39, %17, %25) olarak saptanmıştır. %80'lik biyokimyasal eşik değeri (14) geçmeyen bu varyasyonların fenotipe etkisi beklenmemektedir, ancak enerji gereksinimi yüksek kanser hücreleri için bu oran bilinmemektedir.

Nükleer mutasyonlara özgün şekilde (mutational signature) olduğu gibi kanser dokusunun kaynağından bağımsız olarak mtDNA'da da özellikle C>T (veya G>A) olmak üzere transisyonların çok daha sık saptandığı bildirilmiştir (129, 136, 163). Bu durum mtDNA'da özellikle pürinler açısından zengin H-zincirinde öne çıkmaktadır (136, 158). Varyasyon isimlendirmesinde kullanılan rCRS referans dizisi L-zincir dizisine aittir. Literatür ile uyumlu şekilde, hasta örneğimizde de G>A (H-zincirde C>T) değişiklikleri sık olmak üzere transisyonlar (%94,9) daha çok saptanmıştır (Şekil 29).

Tümör örnekleri bölgelerdeki varyasyon sıklıklarına göre incelendiğinde, en çok varyasyon *mt-CYB* geni ve kodlamayan *DLOOP* bölgesinde saptanmıştır (Şekil 30). *mt-CYB*'nin kodladığı sitokrom b, elektron taşıma zincirinin ikinci enzimi olan kompleks III'ün biraraya gelmesi ve fonksiyonu için gereklidir, ayrıca mitokondriyal DNA tarafından kodlanan tek alt ünedir (164). *mt-CYB* varyasyonları oldukça nadir olmakla birlikte özellikle mesane kanserlerinde bildirilmiştir (130). D-loop kontrol bölgesinde herhangi bir gen kodlanmamaktadır, ancak bu bölge mitokondriyal transkripsiyon ve replikasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hücre

için büyüme dezavantajına neden olmayan bu bölgedeki varyasyonlar (16), farklı kanserlerde risk, sağkalım, prognoz ve/veya çeşitli tedavilere yanıt ile ilişkilendirilmiştir (165).

Tüm genler ve *DLOOP* bölgesine göre varyasyon frekansları ve toplam varyasyon sayıları cinsiyet, DSÖ sınıflandırması, morfolojik aşama, nükleer genetik değişiklikler (*IDH*, *IDH / TERT* durumu) ve haplogruplara göre karşılaştırıldığında *mt-ATP6*, *mt-TR* ve *DLOOP1* bölgeleri birçok kategoride istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 22). *mt-ATP6*, *mt-ATP8* ile birlikte ADP ve fosfattan ATP sentezini sağlayan, oksidatif fosforilasyonun son aşamasındaki ATP sentazı (kompleks V) kodlamaktadır (12, 108). Endometrium, prostat, tiroid gibi farklı kanserlerde gösterilmiş *mt-ATP6* varyasyonlarının hücrenin enerji metabolizmasını değiştirerek değil, serbest radikal ve kalsiyum dengesinde düzensizlik yaratarak etkisini gösterdiği değerlendirilmektedir (166). *mt-TR* mitokondriyal arjinini kodlamaktadır (12). Mitokondriyal tRNA mutasyonlarının olgunlaşmamış (immatür) öncü tRNA birikimi nedeniyle kanserlerde bozulmuş tRNA matürasyonuna yol açabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, tRNA ikincil yapısının da doğru oluşturulması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Böylece, tRNA katlanmasını etkileyen mutasyonların sadece ilgili tRNA'yı değil, komşu gen transkriptlerini de etkileyebileceği bildirilmiştir (136).

Farklı kategorilere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan varyasyonların 22 (%75,9) tanesi (Tablo 23) MITOMAP ve HmtVar veritabanlarında (Tablo 20) GBM ve / veya diğer kanserler ile ilişkilendirilmiş veya patojenik olarak bildirilmiştir (112, 154). Bunlar arasında *mt-ATP6* G9055A varyasyonu literatürde meme, mesane ve kolorektal gibi diğer kanserlerde saptanırken (167-169), *DLOOP1* T16126C GBM (16) ve T16519C varyasyonları GBM (16) ve prostat (170), mide (171), yumurtalık (172) gibi diğer kanserlerle ilişkilendirilmiştir.

Otuz iki hasta için tümör örnekleri ile birlikte periferik kan örnekleri de çalışılmış ve 22 hastada somatik varyasyon saptanmıştır. Bu varyasyonların çoğu tümörde saptanmış fakat periferik kanda saptanmamış heteroplazmik değişiklikler veya heteroplazmi oranlarındaki değişikliklerdir. Bu farklılıklar tümördeki düşük heteroplazmi gösteren varyasyonlardan veya periferik kan analizlerindeki kapsama derinliğinin tümör örneklerinden nispeten daha düşük olmasından kaynaklanabilir. Biyokimyasal eşik değerini geçmeyen bu düşük heteroplazmidaki varyasyonların kanser hücrelerinin fenotipine etkisi bilinmemektedir (14). *mt-CYB* genindeki G15591A ve *DLOOP* bölgesindeki A16183C varyasyonları tümörde homoplazmik olmasına rağmen periferik kanda saptanmamıştır. HmtVar veritabanında patojenik olarak bildirilen G15591A varyasyonu literatürde herhangi bir kanser ile ilişkilendirilmemiştir (112, 154) ve örneklerimizde sadece bir tümörde saptanmıştır (Ek 4). Genel popülasyonda oldukça sık görülen A16183C varyasyonunun (173) ise melanom hastalarında kontrol gruba göre daha çok görüldüğü bildirilmiş ama hastalıkla ilişkisi ortaya konmamıştır (174).

Periferik kanda saptanan ancak tümörde bulunmayan varyasyonlar homoplazmik C7028T ile heteroplazmik T5291C ve C16192T varyasyonlarıdır. *mt-COI* C7028T varyasyonu hasta örneklerimizde sıklıkla saptadığımız bir haplogrup belirteçidir (112). Tümörde bu varyasyon saptanmamış olmasına rağmen, tümör ve periferik kan haplogrupları K1a8b olarak belirlenmiştir (153). *mt-ND2* T5291C varyasyonu eş anlamlı bir değişime neden olmaktadır ve literatürde herhangi bir patojenik bildirim mevcut değildir (112, 154). *DLOOP* bölgesindeki C16192T varyasyonu da haplogrup belirteçidir ve hastalıkla ilişkisi ortaya konmamış olmakla birlikte melanom hastalarında kontrol gruba göre daha çok görüldüğü bildirilmiştir (174). Periferik kanda olup tümörde saptanmayan diğer varyasyonların bu bölgelerdeki düşük kapsama derinliği nedeniyle yalancı pozitif olma olasılığı söz konusudur.

Somatik varyasyonların (Tablo 21) bazılarının literatürde de öne çıktığı görülmektedir. Çeşitli beyin tümörlerinde *DLOOP* bölgesindeki somatik

varyasyonların araştırıldığı az sayıda örneği içeren bir çalışmada T16519C varyasyonu ependimom, menenjiyom ve GBM'de homoplazmik olarak saptanmıştır. Ayrıca, T16093C ve T16189C varyasyonları polimorfizm olarak bildirilmiştir (175). T16189C varyasyonu replikasyon hatasına neden olabilecek, daha uzun sitozin tekrar dizisine neden olmaktadır (C₅TC₄ yerine C₁₀) (16). 14 farklı kanser türündeki mitokondriyal somatik varyasyonların analiz edildiği kapsamlı bir çalışmada G11711A varyasyonu düşük dereceli gliomlarda saptanmıştır (136). Diğer bir çalışmada, farklı GBM hücre hatlarında mtDNA varyantları kodlayan ve kodlamayan bölgelerde incelenmiş *DLOOP* C194T, C16186T ve T16519C varyasyonları belirlenmiştir (176). Ayrıca, derece II ve derece III gliom hücre hatlarında yapılan incelemede bulunan ve polimorfizm olarak raporlanan T57C (177) somatik varyantlar arasında yer almamakla birlikte örneklerimizde de saptanmıştır (%3,4).

Saptanan somatik varyasyon sayıları literatürdeki düşük ve yüksek dereceli gliomlar (Şekil 31) ile diğer kanserlerde (Şekil 32) karşılaştırılmıştır. Belirlenen bazı farklılıkların sebebi, gliomların oldukça heterojen bir tümör grubu olması (1), literatürdeki çalışmalarda farklı platformlar kullanılmış olması (136, 158), somatik mutasyon analizinde kullandığımız eşik değerinin daha kapsayıcı olmak adına düşük tutulması, örneklerdeki tümör / normal doku oranı farklılıkları ve çalışılan hasta grubunun kısıtlı sayıda olması olabilir.

Mitokondriyal DNA yeni nesil dizi analizinde saptanan varyasyonların doğrulanması ve hasta sayısının artırılması amacıyla birçok kategoride istatistiksel olarak anlamlı bulunan, ayrıca literatürde de çeşitli kanserlerde önemli olabileceği düşünülen *mt-TR* ve *DLOOP1* bölgeleri için Sanger dizi analizi yapılmıştır. Sadece homoplazmik olarak saptanan varyantlar konfirme edilebilmiş, heteroplazmik (<%10) varyantlar saptanamamıştır. Bu durum, tümör heterojenitesinin yanı sıra Sanger yönteminin hassasiyetinin daha az olmasından kaynaklanabilir.

Çalışılan bölgelerde hasta sayısının arttırılmasıyla toplam 78 hasta *mt-TR* ve *DLOOP1* bölgeleri (ve kısmi olarak *mt-ND3*) için analiz edilmiştir. G10310A, C16142T, C16176G, C16184A, C16193T, A16207C, C16286T, C16354T varyasyonları daha önce çalışılan 59 hastada saptanmamıştır. Analiz sonucunda sadece *DLOOP1* T16126C, C16278T, C16296T, T16311C varyasyonları farklı kategorilere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Bölüm 4.7.5).

DLOOP1 bölgesinde en sık (>%10) rastlanan varyasyonlar sırasıyla T16126C (%21), T16189C (%18), C16223T (%17), T16311C (%17), C16294T (%14) ve C16261T (%10)'dir. Örneklerimizde en sık görülen T16126C varyasyonu literatürde haplogrup belirteci olmakla birlikte glioblastomlarda (16); T16189C, C16223T ve T16311C ise gliom dışı kanserlerde bildirilmiştir (112). *IDH / TERT* durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan C16278T kalın bağırsak tümörlerinde saptanırken C16296T varyasyonunun herhangi bir kanser ile ilişkisi bilinmemektedir (112). Sık olarak saptanmış T16126C *IDH* ve *IDH / TERT*'e göre, T16311C ise DSÖ sınıflandırması ve morfolojik aşama derece II & III / IV'e göre anlamlı bulunmuştur. Bu durum, mitokondriyal varyasyonların nükleer ve klinik parametrelerle karşılaştırılmasının önemini ortaya çıkarmaktadır.

Blein ve diğerleri tarafından haplogrupların *BRCA2* mutasyonlarının varlığında, meme kanseri yatkınlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (18). Haplogrupları belirlenmiş 59 hastada, bu 4 varyantın gliom yatkınlığı ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için R, N, L3 üst gruplarına göre karşılaştırma yapılmış, ancak varyantlardan hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5.2. Sonuç

Bu çalışmada, oldukça heterojen bir tümör grubu olan gliomlarda nükleer ve mitokondriyal varyasyonlar hastalık biyolojisi üzerindeki etkileri araştırılmak üzere incelenmiştir. İlk olarak, 300 hasta örneğinde *IDH1/2* ve *TERT* promotör mutasyonları analiz edilmiştir. Bu mutasyonların profili göz önünde bulundurularak 4 moleküler alt grup belirlenmiştir. Bu alt gruplardan daha iyi sağkalıma ve hastalık seyrine sahip olan *IDH* mutasyonuna sahip olan hastalardır, sadece *TERT* mutasyonuna sahip olanların ise daha kötü prognoza sahip olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, DSÖ 2016 sınıflandırması öncesinde, gliomların sınıflandırılmasında moleküler parametrelerin önemini vurgulayacak ilk çalışmalardan biridir.

İkinci aşamada, 59 hastada mitokondriyal genom yeni nesil yöntemlerle dizilenmiş, varyasyonlar, haplogruplar ve heteroplazmi oranları belirlenmiştir. Nükleer değişkenler ve klinik parametrelerle karşılaştırılarak yapılan istatistiksel analizlerin sonucunda *mt-ATP6*, *mt-TR* ve *DLOOP1* bölgeleri belirli kategoriler için anlamlı bulunmuştur. Yeni nesil dizi analizinde elde edilen sonuçlar Sanger dizileme ile doğrulanmış ve hasta sayısı 78 olacak şekilde artırılmıştır. Bu analizlerin sonucunda *DLOOP1* T16126C, C16278T, C16296T, T16311C varyasyonları farklı kategoriler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma glial tümörlerde mitokondriyal varyasyonların tümör biyolojisini yansıtan nükleer ve klinik değişkenler ile olan ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır. Fonksiyonel anlamda etkileri bilinmemekle birlikte mtDNA varyasyonları da oldukça heterojen olan gliomlarda çeşitlilik göstermektedir. mtDNA'daki varyasyonlarda özellikle *IDH* mutasyonu ve tümör sınıflandırmasına göre anlamlı farklılıklar öne çıkmaktadır.

5.3. Çalışmanın Gelecek Planları

Bu çalışmada son derece kapsamlı bulgular elde edilmiştir. Tümörögenizde önemi vurgulanan özellikle kompleks I (NADH dehidrogenaz) ile IV'ü (sitokrom c oksidaz) kodlayan genlerdeki değişikliklerin ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş *mt-TR* genindeki varyasyonların tRNA katlanmasını etkilemesi açısından detaylı incelenmesi de mitokondrinin gliom biyolojisindeki fonksiyonel rolünün açıklığa kavuşturulmasına olanak sağlayacaktır.

Transkripsiyon ve replikasyonun düzenlenmesinde oldukça önemli olan *DLOOP*'ta özellikle replikasyon bölgesinde (112) bulunan varyasyonlar da detaylı incelenebilecek konular arasındadır. Gelecek çalışmalar, mitokondriyal enerji mekanizmasını etkisiz hale getirmek yerine biyoenerjik ve biyosentez durumunu değiştirerek etkisini gösteren varyasyonların mekanizmasının anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

Çalışmamızda heteroplazmi eşik değeri %10 olarak kabul edilmiştir. Bu değeri %20 olarak aldığımızda, sonuçlarımız çok fazla etkilenmemektedir. Bunun nedeni, heteroplazmik varyantların daha çok tek tümörde saptanmış olması ve bireysel varyant analizlerinde birden çok tümörde saptanan varyantları değerlendirmeye almış olmamızdır. Ancak, eşik değeri için farklı değerler belirlenerek daha detaylı çalışmalar yapılabilir.

Yeni nesil dizi analizi ile elde edilen mitokondriyal varyasyonlar ile haplogrupların, mitokondriyal proteomun parçası olan nükleer genlerdeki varyasyonlar ile nükleer genomdaki kopya sayısı değişikliklerinin de analiz edilmesi oldukça önemlidir. Bu varyantların hastalık prognozu (sağkalım), farklı tedavi araçlarına yanıt, 8q24 rs55705857 polimorfizmi ile korelasyonu da hastalık

biyolojisinin anlaşılmasında yol gösterici olabilecektir. Ayrıca, mitokondriyal mutasyon yükü yaşa göre arttığından, istatistiksel analizler hastaların yaşına göre değerlendirilebilir.

Örneğimizdeki çifte mutant (*IDH* ve *TERT*) tümörler daha çok frontal bölgede, sadece *IDH*-mutantlar ise sıklıkla insulada yerleşimlidir (178). Tümörlerin *IDH* mutasyon durumuna göre farklı anatomik bölgelerde yerleşim göstermesi gibi, mitokondriyal varyant ve haplogruplar ile ilişkisinin araştırılması da farklı genetik yapılara sahip tümörlerin kökeni hakkında aydınlatıcı olabilecektir.

Saptanan mitokondriyal varyantların birçoğunun patojenik etkisi henüz bilinmemektedir. Kodlayan ve kodlamayan bölgelerdeki varyasyonların daha geniş hasta gruplarında ve / veya farklı kanserlerde çalışılması mitokondriyal genomun hastalık biyolojisindeki etkisinin anlaşılmasına olanak sağlayabilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: Advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):319-31.
2. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol*. 2019;21(Supplement_5):v1-v100.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol*. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
5. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-73.
6. Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:177-208.
7. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6.
8. Jenkins RB, Xiao Y, Sicotte H, Decker PA, Kollmeyer TM, Hansen HM, et al. A low-frequency variant at 8q24.21 is strongly associated with risk of oligodendroglial tumors and astrocytomas with IDH1 or IDH2 mutation. *Nat Genet*. 2012;44(10):1122-5.
9. Oktay Y, Ulgen E, Can O, Akyerli CB, Yuksel S, Erdemgil Y, et al. IDH-mutant glioma specific association of rs55705857 located at 8q24.21 involves MYC deregulation. *Sci Rep*. 2016;6:27569.
10. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
11. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):685-98.
12. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.
13. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(11):6715-9.
14. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*. 2015;16(9):530-42.
15. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(11):a021220.
16. Kirches E, Krause G, Warich-Kirches M, Weis S, Schneider T, Meyer-Puttlitz B, et al. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. *Int J Cancer*. 2001;93(4):534-8.
17. Vidone M, Clima R, Santorsola M, Calabrese C, Girolimetti G, Kurelac I, et al. A comprehensive characterization of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;63:46-54.
18. Blein S, Bardel C, Danjean V, McGuffog L, Healey S, Barrowdale D, et al. An original phylogenetic approach identified mitochondrial haplogroup T1a1 as inversely associated with breast cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res*. 2015;17:61.
19. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2018;392(10145):432-46.
20. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
21. IARC. Global Cancer Observatory 2019 [Available from: <https://gco.iarc.fr/>].
22. McNeill KA. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*. 2016;34(4):981-98.

23. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res.* 2015;163:1-14.
24. Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: Advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med.* 2015;3(7):95.
25. Louis DN. The next step in brain tumor classification: "Let us now praise famous men"... or molecules? *Acta Neuropathol.* 2012;124(6):761-2.
26. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(7):405-17.
27. Wood MD, Halfpenny AM, Moore SR. Applications of molecular neuro-oncology - A review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. *Diagn Pathol.* 2019;14(1):29.
28. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH, National Cancer Institute DoCPCO, Prevention Trials Research G. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008(38):1-93.
29. Rice T, Lachance DH, Molinaro AM, Eckel-Passow JE, Walsh KM, Barnholtz-Sloan J, et al. Understanding inherited genetic risk of adult glioma - A review. *Neurooncol Pract.* 2016;3(1):10-6.
30. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol.* 2010;12(1):104-13.
31. Wang S, Hui Y, Li X, Jia Q. Silencing of lncRNA CCDC26 restrains the growth and migration of glioma cells in vitro and in vivo via targeting miR-203. *Oncol Res.* 2018;26(8):1143-54.
32. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk S, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of intracranial gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;30:1-11.
33. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, McHugh K, Lee C, Kim KP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: A retrospective cohort study. *Lancet.* 2012;380(9840):499-505.
34. Esquenazi Y, Lo VP, Lee K. Critical care management of cerebral edema in brain tumors. *J Intensive Care Med.* 2017;32(1):15-24.
35. Mesfin FB, Al-Dhahir MA. Cancer, brain gliomas. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2019.
36. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2014;16(1):113-22.
37. Noorbakhsh A, Tang JA, Marcus LP, McCutcheon B, Gonda DD, Schallhorn CS, et al. Gross-total resection outcomes in an elderly population with glioblastoma: A SEER-based analysis. *J Neurosurg.* 2014;120(1):31-9.
38. van den Bent MJ, Smits M, Kros JM, Chang SM. Diffuse infiltrating oligodendroglioma and astrocytoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(21):2394-401.
39. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee Sh U. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(1):3-9.
40. Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, Matsuo K, Kataoka K, Shimamura T, et al. Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2018;20(1):66-77.
41. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Hansen H, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: Additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol.* 2017;133(6):1001-16.
42. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):867-73.
43. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116(6):597-602.
44. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):341-7.
45. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):931-7.
46. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-72.

47. Park SH, Won J, Kim SI, Lee Y, Park CK, Kim SK, et al. Molecular testing of brain tumor. *J Pathol Transl Med.* 2017;51(3):205-23.
48. LaPorte DC, Koshland DE, Jr. Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase as a demonstration of enhanced sensitivity in covalent regulation. *Nature.* 1983;305(5932):286-90.
49. Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H, Luo Y. Isocitrate dehydrogenase mutations in glioma: From basic discovery to therapeutics development. *Front Oncol.* 2019;9:506.
50. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: Alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(13):932-41.
51. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016;18(1):16-26.
52. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2010;29(49):6409-17.
53. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1058-66.
54. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-12.
55. Jin G, Reitman ZJ, Duncan CG, Spasojevic I, Gooden DM, Rasheed BA, et al. Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res.* 2013;73(2):496-501.
56. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462(7274):739-44.
57. Grassian AR, Parker SJ, Davidson SM, Divakaruni AS, Green CR, Zhang X, et al. IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res.* 2014;74(12):3317-31.
58. Leonardi R, Subramanian C, Jackowski S, Rock CO. Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations inactivate NADPH-dependent reductive carboxylation. *J Biol Chem.* 2012;287(18):14615-20.
59. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* 2010;17(3):225-34.
60. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell.* 2011;19(1):17-30.
61. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009;41(12):1350-3.
62. Zhao H, Yang L, Baddour J, Achreja A, Bernard V, Moss T, et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife.* 2016;5:e10250.
63. Yalaza C, Ak H, Cagli MS, Ozgiray E, Atay S, Aydin HH. R132H mutation in IDH1 gene is associated with increased tumor HIF1-alpha and serum VEGF levels in primary glioblastoma multiforme. *Ann Clin Lab Sci.* 2017;47(3):362-4.
64. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science.* 2009;324(5924):261-5.
65. Appin CL, Brat DJ. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2015;22(1):50-8.
66. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(10):988-94.
67. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66(20):9852-61.
68. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: State of the art. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-84.
69. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science.* 2011;333(6048):1453-5.

70. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012;3(7):709-22.
71. Sahm F, Koelsche C, Meyer J, Pusch S, Lindenberg K, Mueller W, et al. CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2012;123(6):853-60.
72. Chittaranjan S, Chan S, Yang C, Yang KC, Chen V, Moradian A, et al. Mutations in CIC and IDH1 cooperatively regulate 2-hydroxyglutarate levels and cell clonogenicity. *Oncotarget*. 2014;5(17):7960-79.
73. Xu L, Li S, Stohr BA. The role of telomere biology in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2013;8:49-78.
74. Lee J, Solomon DA, Tihan T. The role of histone modifications and telomere alterations in the pathogenesis of diffuse gliomas in adults and children. *J Neurooncol*. 2017;132(1):1-11.
75. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
76. Koelsche C, Sahm F, Capper D, Reuss D, Sturm D, Jones DT, et al. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol*. 2013;126(6):907-15.
77. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4:2185.
78. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. 2015;348(6238):1036-9.
79. Heidenreich B, Kumar R. TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res*. 2017;771:15-31.
80. Huang DS, Wang Z, He XJ, Diplas BH, Yang R, Killela PJ, et al. Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer*. 2015;51(8):969-76.
81. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339(6122):957-9.
82. Yang P, Cai J, Yan W, Zhang W, Wang Y, Chen B, et al. Classification based on mutations of TERT promoter and IDH characterizes subtypes in grade II/III gliomas. *Neuro Oncol*. 2016;18(8):1099-108.
83. Abedalthagafi M, Phillips JJ, Kim GE, Mueller S, Haas-Kogen DA, Marshall RE, et al. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: A multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Mod Pathol*. 2013;26(11):1425-32.
84. Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: A practical update on predictive markers. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(1):1-15.
85. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(21):8602-6.
86. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gomez G, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science*. 2014;343(6166):72-6.
87. Gupta K, Salunke P. Molecular markers of glioma: An update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(12):1971-81.
88. Karsy M, Neil JA, Guan J, Mahan MA, Colman H, Jensen RL. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2015;38(3):E4.
89. Patel M, Vogelbaum MA, Barnett GH, Jalali R, Ahluwalia MS. Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: Current challenges and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(9):1247-66.
90. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context. *Cell*. 2017;170(6):1062-78.
91. Zhang Y, Dube C, Gibert M, Jr., Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2018;10(9).
92. Cancer Genome Atlas Research N, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2481-98.

93. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, et al. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry - A comparative study in 157 diffuse gliomas. *Brain Pathol.* 2015;25(3):256-65.
94. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature.* 2008;455(7216):1129-33.
95. Huang WC, Hung MC. Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J Formos Med Assoc.* 2009;108(3):180-94.
96. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol.* 2014;4:64.
97. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):21-35.
98. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013;155(2):462-77.
99. Reis GF, Pekmezci M, Hansen HM, Rice T, Marshall RE, Molinaro AM, et al. CDKN2A loss is associated with shortened overall survival in lower-grade (World Health Organization Grades II-III) astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(5):442-52.
100. Korshunov A, Casalini B, Chavez L, Hielscher T, Sill M, Ryzhova M, et al. Integrated molecular characterization of IDH-mutant glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2019;45(2):108-18.
101. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* 2018;136(1):153-66.
102. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(7):319-24.
103. Kuhlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 2015;13:89.
104. Viscomi C ZM. Mitochondria in health and disease. In: Chinnery PF KM, editors., editor. *Clinical Mitochondrial Medicine.* Cambridge: Cambridge University Press; 2018. p. 1-9.
105. Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:1015-69.
106. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
107. Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:781-821.
108. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191:144-8.
109. Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol.* 1963;19:593-611.
110. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23(2):147.
111. van der Wijst MG, van Tilburg AY, Ruiters MH, Rots MG. Experimental mitochondria-targeted DNA methylation identifies GpC methylation, not CpG methylation, as potential regulator of mitochondrial gene expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):177.
112. MITOMAP [Internet]. 2020 [cited Feb 5, 2020]. Available from: <https://mitomap.org/MITOMAP>.
113. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:25-44.
114. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(2):113-28.
115. Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a012641.
116. Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25791-802.
117. Stoneking M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am J Hum Genet.* 2000;67(4):1029-32.
118. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum Genet.* 1997;101(3):384.

119. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*. 2019;7:e7314.
120. Mitchell SL, Goodloe R, Brown-Gentry K, Pendergrass SA, Murdock DG, Crawford DC. Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Hum Genet*. 2014;133(7):861-8.
121. Eupedia: European travel, trivia, statistics, history & population genetics 2019 [updated 2019. Available from: <https://www.eupedia.com/>.
122. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: Implications for population susceptibility to diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(2):208-19.
123. El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial cytopathies. *Cell Calcium*. 2016;60(3):199-206.
124. Ryzhkova AI, Sazonova MA, Sinyov VV, Galitsyna EV, Chicheva MM, Melnichenko AA, et al. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: A mini-review. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:1933-42.
125. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017;241(2):236-50.
126. Chinnery PF. Mitochondrial disease in adults: What's old and what's new? *EMBO Mol Med*. 2015;7(12):1503-12.
127. DiMauro S. Mitochondrial encephalomyopathies - Fifty years on: The Robert Wartenberg lecture. *Neurology*. 2013;81(3):281-91.
128. Larman TC, DePalma SR, Hadjipanayis AG, Cancer Genome Atlas Research N, Protopopov A, Zhang J, et al. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):14087-91.
129. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
130. Hertweck KL, Dasgupta S. The landscape of mtDNA modifications in cancer: A tale of two cities. *Front Oncol*. 2017;7:262.
131. Kloss-Brandstatter A, Weissensteiner H, Erhart G, Schafer G, Forer L, Schonherr S, et al. Validation of next-generation sequencing of entire mitochondrial genomes and the diversity of mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135643.
132. Kurelac I, MacKay A, Lambros MB, Di Cesare E, Cenacchi G, Ceccarelli C, et al. Somatic complex I disruptive mitochondrial DNA mutations are modifiers of tumorigenesis that correlate with low genomic instability in pituitary adenomas. *Hum Mol Genet*. 2013;22(2):226-38.
133. Dasgupta S, Shao C, Keane TE, Duberow DP, Mathies RA, Fisher PB, et al. Detection of mitochondrial deoxyribonucleic acid alterations in urine from urothelial cell carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2012;131(1):158-64.
134. Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics - The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017;1858(8):602-14.
135. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878-90.
136. Stewart JB, Alaei-Mahabadi B, Sabarinathan R, Samuelsson T, Gorodkin J, Gustafsson CM, et al. Simultaneous DNA and RNA mapping of somatic mitochondrial mutations across diverse human cancers. *PLoS Genet*. 2015;11(6):e1005333.
137. McMahon S, LaFramboise T. Mutational patterns in the breast cancer mitochondrial genome, with clinical correlates. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):1046-54.
138. Nicholls TJ, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol*. 2014;56:175-81.
139. Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1042:109-22.
140. Kuo SJ, Chen M, Ma GC, Chen ST, Chang SP, Lin WY, et al. Number of somatic mutations in the mitochondrial D-loop region indicates poor prognosis in breast cancer, independent of TP53 mutation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;201(2):94-101.
141. Dasgupta S, Hoque MO, Upadhyay S, Sidransky D. Mitochondrial cytochrome B gene mutation promotes tumor growth in bladder cancer. *Cancer Res*. 2008;68(3):700-6.
142. Fliiss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*. 2000;287(5460):2017-9.

143. Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, et al. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1271(1):141-51.
144. Guo J, Zheng L, Liu W, Wang X, Wang Z, Wang Z, et al. Frequent truncating mutation of TFAM induces mitochondrial DNA depletion and apoptotic resistance in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(8):2978-87.
145. Linkowska K, Jawien A, Marszalek A, Malyarchuk BA, Tonska K, Bartnik E, et al. Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations and their implications in mtDNA alterations in colorectal cancer. *Ann Hum Genet*. 2015;79(5):320-8.
146. Primer3web [Internet]. 2019 [cited Feb 16, 2014]. Available from: <http://primer3.ut.ee/>.
147. Meyer J, Pusch S, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. PCR- and restriction endonuclease-based detection of IDH1 mutations. *Brain Pathol*. 2010;20(2):298-300.
148. Dnastar. Lasergene Seqman II. version 5.08 ed. Madison, ABD2005.
149. Biosystems A. GeneMapper Software. version 5 ed. USA2012.
150. Stawski H. Preparing Whole Genome Human Mitochondrial DNA Libraries for Next Generation Sequencing Using Illumina Nextera XT. North Carolina, USA: WCU, Department of Chemistry and Physics; 2013.
151. Illumina. Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide: Illumina; 2019 [Document # 15031942 v05]; [Available from: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf].
152. Illumina. MiSeq Reporter Software v2.6. Illumina; USA2016.
153. mtDNA Server v1.0.7 [Internet]. 2017 [cited Sep 17, 2019]. Available from: <https://mtdna-server.uibk.ac.at/index.html>.
154. HmtVar [Internet]. 2019 [cited Jan 20, 2020]. Available from: <https://www.hmtvar.uniba.it/>.
155. PASW Statistics. SPSS. SPSS for Windows. Release 18.0.0 ed. USA2009.
156. Levin BC, Cheng H, Reeder DJ. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. *Genomics*. 1999;55(2):135-46.
157. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):870-9.
158. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife*. 2014;3.
159. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet*. 2017;49(3):349-57.
160. Liu T, Yuan X, Xu D. Cancer-specific telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutations: Biological and clinical implications. *Genes (Basel)*. 2016;7(7).
161. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, et al. cIMPACT-NOW update 5: Recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2020;139(3):603-8.
162. Hopkins JF, Sabelnykova VY, Weischenfeldt J, Simon R, Aguiar JA, Alkallas R, et al. Mitochondrial mutations drive prostate cancer aggression. *Nat Commun*. 2017;8(1):656.
163. Yuan Y, Ju YS, Kim Y, Li J, Wang Y, Yoon CJ, et al. Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nat Genet*. 2020.
164. Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, et al. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*. 1997;277(5322):60-6.
165. Errichiello E, Venesio T. Mitochondrial DNA variations in tumors: Drivers or passengers? In: Seligmann H, editor. *Mitochondrial DNA - New Insights*. London, UK: IntechOpen; 2018.
166. Niedzwiecka K, Tisi R, Penna S, Lichocka M, Plochocka D, Kucharczyk R. Two mutations in mitochondrial ATP6 gene of ATP synthase, related to human cancer, affect ROS, calcium homeostasis and mitochondrial permeability transition in yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(1):117-31.
167. Ghaffarpour M, Mahdian R, Fereidooni F, Kamalidehghan B, Moazami N, Houshmand M. The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):21.

168. Guney AI, Ergec DS, Tavukcu HH, Koc G, Kirac D, Ulucan K, et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in nonmuscle invasive bladder cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(7):672-8.
169. Mehrabi S, Akwe JA, Adams G, Jr., Grizzle W, Yao X, Aikhionbare FO. Analysis of mtDNA sequence variants in colorectal adenomatous polyps. *Diagn Pathol*. 2010;5:66.
170. Chen JZ, Gokden N, Greene GF, Mukunyadzi P, Kadlubar FF. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res*. 2002;62(22):6470-4.
171. Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44(1):19-28.
172. Bragoszewski P, Kupryjanczyk J, Bartnik E, Rachinger A, Ostrowski J. Limited clinical relevance of mitochondrial DNA mutation and gene expression analyses in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:292.
173. Kloss-Brandstatter A, Pacher D, Schonherr S, Weissensteiner H, Binna R, Specht G, et al. HaploGrep: A fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutat*. 2011;32(1):25-32.
174. Ebner S, Lang R, Mueller EE, Eder W, Oeller M, Moser A, et al. Mitochondrial haplogroups, control region polymorphisms and malignant melanoma: a study in middle European Caucasians. *PLoS One*. 2011;6(12):e27192.
175. Mohamed Yusoff AA, Mohd Nasir KN, Haris K, Mohd Khair SZN, Abdul Ghani ARI, Idris Z, et al. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region D-loop in brain tumors: The first report in Malaysian patients. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5179-88.
176. Yeung KY, Dickinson A, Donoghue JF, Polekhina G, White SJ, Grammatopoulos DK, et al. The identification of mitochondrial DNA variants in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:1.
177. Soon BH, Abdul Murad NA, Then SM, Abu Bakar A, Fadzil F, Thanabalan J, et al. Mitochondrial DNA mutations in grade II and III glioma cell lines are associated with significant mitochondrial dysfunction and higher oxidative stress. *Front Physiol*. 2017;8:231.
178. Akyerli CB, Yuksel S, Can O, Erson-Omay EZ, Oktay Y, Cosgun E, et al. Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas. *J Neurosurg*. 2018;128(4):1102-14.

7. EKLER

EKLER LİSTESİ

Ek 1: Aydınlatılmış onam formları.....	116
Ek 2: Etik Kurul kararları.....	120
Ek 3: Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları.....	123
Ek 4: Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.....	132
Ek 5: Sözlü bildiri.....	142
Ek 6: Makale (gönderilmiş).....	143
Ek 7: Makale.....	144

Ek 1: Hasta aydınlatılmış onam formu

Bilimsel Çalışma:

Glial tümörlerde mitokondriyal genomik çeşitliliğin ve mutasyonların hastalık biyolojisine etkisi.

HASTA AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Sayın Hasta / Sayın Hasta Yakını,

Bu belge, Acıbadem Üniversitesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi, Tıbbi Patoloji, Tıbbi Biyoloji, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalları, Tıp Mühendisliği, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora Programı, Acıbadem Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı ve Acıbadem Labmed Ar-ge Laboratuvarı ortaklığında yürütülmekte olan bilimsel bir çalışma ile ilgilidir.

Çalışmanın ismi “Glial tümörlerde mitokondriyal genomik çeşitliliğin ve mutasyonların hastalık biyolojisine etkisi”dir. Etik ilkelere hassasiyetle uyularak yürütülen bilimsel bir çalışmadır.

Bu projenin amacı, insan beyninde görülen kanser türü olan, glial tümörlerde mitokondriyal genomdaki değişiklikleri değerlendirmek ve bu profilin hastalık biyolojisine etkisini ve hastalık riskinde payını araştırmaktır. Tümör parçaları üzerinde çalışarak, glioma isimli beyin tümörlerinin yapısını, insan üzerindeki etkisini daha iyi anlayarak bilimsel bilgileri geliştirmeyi amaçlıyoruz.

Bunun için ameliyat öncesinde sizden alınan kan örneklerinin ve ameliyat sırasında çıkartılması gereken tümör dokusu örneklerinin incelenmesine ihtiyaç duyuyoruz. Çalışma için sizden başka herhangi bir ek tetkik ya da benzeri inceleme istenmeyecektir.

Alınan doku ve kan örneklerinde mitokondriyal genom dizilimi belirlenecektir ve sonuçlar sadece bilimsel amaçlı olarak kullanılacaktır. Bu araştırma esnasında elde edilen bilgi ve veriler sadece araştırmacıların ulaşabileceği veri tabanında saklı tutularak, isimler, kimlik bilgileri başkalarıyla paylaşılmayacak, mesleki gizliliğe uyulacaktır. Araştırmamızın bilimsel toplantılarda sunulması, makale olarak yayımlanması aşamalarında kimlik bilgileri saklı tutularak kişi mahremiyeti korunacaktır.

Bu araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayanmaktadır ve araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahiptir. Onam vermiş olsanız bile araştırmanın herhangi bir safhasında araştırmadan çekilebilme hakkına sahiptir. Hiçbir durumda tedaviniz olumsuz etkilenmeyecektir.

Araştırmaya katılımınız size bir mali külfet getirmeyecektir. Aynı şekilde araştırmacılar da bu çalışmayı yürütürken herhangi bir kurum ya da kişi ile ticari çıkar ilişkisi içinde değillerdir. Hastalar çalışmanın sonuçlarına her zaman ulaşım hakkına sahiptir.

Katkılarınız için teşekkür ederiz.

Ek 1 (devam): Hasta aydınlatılmış onam formu

HASTA ONAMI

Hasta bilgilendirme formunda çalışma hakkında anlatılanları okudum ya da bizzat ilgili doktor tarafından bilgilendirildim. Tedavi kayıtlarımın ve patolojik örneklerin bu çalışmada kullanılmasını, çıkacak olan sonuçların değerlendirilmesini ve bilimsel amaçlı milletlerarası ya da ulusal toplantılarda sunulmasını ve akademik yayın olarak bilimsel biçimde değerlendirilmesini kabul ediyorum. Çalışma sonucunda elde edilen tüm bilgilere ulaşma hakkımın ve istediğim takdirde ve istediğim zamanda çalışmadan ayrılma hakkımın saklı kaldığını biliyorum.

Tarih:

Hastanın Adı Soyadı:

İmza

Hastanın Vekilinin Adı Soyadı:

İmza

Bilgilendiren Doktorun Adı Soyadı:

İmza

Ek 1 (devam): Sağlıklı ve gönüllü bireyler için aydınlatılmış onam formu

Bilimsel Çalışma:

Glial tümörlerde mitokondriyal genomik çeşitliliğin ve mutasyonların hastalık biyolojisine etkisi.

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Sayın Katılımcı,

Bu belge, Acıbadem Üniversitesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi, Tıbbi Patoloji, Tıbbi Biyoloji, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalları, Tıp Mühendisliği, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora Programı, Acıbadem Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı ve Acıbadem Labmed Ar-ge Laboratuvarı ortaklığında yürütülmekte olan bilimsel bir çalışma ile ilgilidir.

Çalışmanın ismi “Glial tümörlerde mitokondriyal genomik çeşitliliğin ve mutasyonların hastalık biyolojisine etkisi”dir. Etik ilkelere hassasiyetle uyularak yürütülen bilimsel bir çalışmadır.

Bu projenin amacı, insan beyninde görülen kanser türü olan, glial tümörlerde mitokondriyal genomdaki değişiklikleri değerlendirmek ve bu profilin hastalık biyolojisine etkisini ve hastalık riskinde payını araştırmaktır. Tümör parçaları üzerinde çalışarak, glioma isimli beyin tümörlerinin yapısını, insan üzerindeki etkisini daha iyi anlayarak bilimsel bilgileri geliştirmeyi amaçlıyoruz.

Bunun için hastalardan ameliyat öncesi alınan kan örnekleri ve ameliyat sırasında çıkartılması gereken tümör dokusu örnekleri incelenecektir. Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılması için, sizden sadece kan alınacak ve herhangi başka bir tetkik istenmeyecektir.

Alınan kan örneklerinde mitokondriyal genom dizilimi belirlenecektir ve sonuçlar sadece bilimsel amaçlı olarak kullanılacaktır. Bu araştırma esnasında elde edilen bilgi ve veriler sadece araştırmacıların ulaşabileceği veri tabanında saklı tutularak, isimler, kimlik bilgileri başkalarıyla paylaşılmayacak, mesleki gizliliğe uyulacaktır. Araştırmamızın bilimsel toplantılarda sunulması, makale olarak yayımlanması aşamalarında kimlik bilgileri saklı tutularak kişi mahremiyeti korunacaktır.

Bu araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayanmaktadır ve araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Onam vermiş olsanız bile araştırmanın herhangi bir safhasında araştırmadan çekilebilme hakkına sahipsiniz.

Araştırmaya katılımınız size bir mali külfet getirmeyecektir. Aynı şekilde araştırmacılar da bu çalışmayı yürütürken herhangi bir kurum ya da kişi ile ticari çıkar ilişkisi içinde değillerdir. Çalışmanın sonuçlarına her zaman ulaşım hakkına sahipsiniz.

Katkılarınız için teşekkür ederiz.

Ek 1 (devam): Sağlıklı ve gönüllü bireyler için aydınlatılmış onam formu

KATILIMCI ONAMI

Bilgilendirme formunda çalışma hakkında anlatılanları okudum ya da bizzat ilgili doktor tarafından bilgilendirildim. Kan örneğimin bu çalışmada kullanılmasını, çıkacak olan sonuçların değerlendirilmesini ve bilimsel amaçlı milletlerarası ya da ulusal toplantılarda sunulmasını ve akademik yayın olarak bilimsel biçimde değerlendirilmesini kabul ediyorum. Çalışma sonucunda elde edilen tüm bilgilere ulaşma hakkımın ve istediğim takdirde ve istediğim zamanda çalışmadan ayrılma hakkımın saklı kaldığını biliyorum.

Tarih:

Katılımcı Adı Soyadı:

İmza

Katılımcı Vekilinin Adı Soyadı:

İmza

Bilgilendiren Doktorun Adı Soyadı:

İmza

Ek 2: Etik Kurul kararı



T.C.
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

SAYI:B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/-1528
KONU: ATADEK 2012/357

20 Haziran 2012

Yrd.Doç.Dr. Yavuz OKTAY
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ATADEK 2012-357 kodlu, Yrd. Doç. Dr. Yavuz Oktay, Yrd. Doç. Dr. Cemaliye Akyerli Boylu, Öğr. Gör. Sinan Fındık, Prof. Dr. M. Necmettin Pamir, Prof. Dr. Aydın Sav ve Doç. Dr. Koray Özduman tarafından yürütülecek olan **"Gliomalarda Görülen Metabolik Yolak Değişikliklerinin, İzositrat Dehidrogenaz Enzim Mutasyonları ile İlişkilendirilmesi"** başlıklı proje Komisyonumuzun 19 Haziran 2012 tarihli 58. toplantısında incelenmiş; etik açıdan uygun bulunmuştur.

Saygılarımızla,

Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus
Başkan

Doç. Dr. Yeşim Işıl Ülman
Başkan Yardımcısı

Ek 2 (devam): Etik Kurul kararı



SAYI: ATADEK-2015/3/16
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Yrd. Doç. Dr. Yavuz Oktay

Sorumluluğunu yürüttüğünüz “Gliomlara Yatkınlık Sağlayan 8q24.21 Bölgesindeki SNP rs55705857’nin Moleküler Etki Mekanizmalarının Ortaya Çıkarılması” başlıklı proje 03.03.2015 tarih 2015/3 Sayılı Atadek Kurul Toplantısında görüşülmüş olup 2015-3/16 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "I. H. ULUS".

Prof.Dr. İsmail Hakkı ULUS
ATADEK Kurul Başkanı

Ek 2 (devam): Etik Kurul kararı



SAYI: ATADEK-2016/20
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Yrd. Doç. Dr. Cemaliye Akyerli Boylu

Sorumluğunu yürüttüğünüz **“Glial tümörlerde mitokondrial genomik çeşitliliğin ve mutasyonların hastalık biyolojisine etkisi”** başlıklı proje 22.12.2016 tarih 2016/20 Sayılı Atadek Kurul Toplantısında görüşülmüş olup, 2016-20/16 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "I. H. ULUS".

Prof.Dr. İsmail Hakkı ULUS
ATADEK Kurul Başkanı

Ek 3: Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
5-3	Parafin kesit	K	63	Astrositom	2	R132H		WT	WT
6-1	Parafin kesit	K	36	Astrositom	2	R132H		WT	WT
7-1	Parafin kesit	E	43	Astrositom	3	WT	N/A	C228T	WT
7-2	Doku	E	58	GBM	4	WT		C228T	WT
7-3	Parafin kesit	E	43	GBM	4	WT		C228T	N/A
7-4	Parafin kesit	K	62	GBM	4	WT		C228T	N/A
8-1	Parafin kesit	E	37	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
8-2	Doku	K	70	GBM	4	WT		C228T	WT
8-3	Doku	E	62	GBM	4	WT		C250T	WT
8-4	Parafin kesit	E	60	GBM	4	WT		WT	N/A
8-5	Parafin kesit	E	41	GBM	4	WT		C228T	N/A
8-6	Parafin kesit	E	62	GBM	4	WT		C228T	N/A
8-7	Parafin kesit	E	49	GBM	4	WT		C228T	N/A
8-8	Parafin kesit	E	60	GBM	4	WT		C228T	N/A
8-9	Parafin kesit	K	58	GBM	4	WT		C228T	N/A
9-3	Doku	E	61	GBM	4	WT		C250T	WT
9-4	Doku	K	67	GBM	4	WT		C228T	WT
9-5	Parafin kesit	K	68	GBM	4	WT		WT	N/A
9-6	Parafin kesit	K	85	GBM	4	WT		C228T	N/A
9-7	Parafin kesit	E	50	GBM	4	WT		WT	N/A
9-8	Parafin kesit	E	30	GBM	4	WT		C228T	N/A
9-9	Parafin kesit	K	59	GBM	4	WT		C228T	N/A
10-1	Doku	E	18	Astrositom	3	WT	N/A	WT	WT
10-2	Doku	E	36	GBM	4	WT		WT	WT
10-3	Doku	E	78	GBM	4	WT		C228T	A/G
10-4	Doku	E	23	GBM	4	WT		WT	A/G
10-5	Doku	E	70	GBM	4	R132C		WT	WT
10-6	Doku	K	48	GBM	4	WT		WT	WT
10-7	Parafin kesit	E	49	GBM	4	WT		C250T	N/A
10-8	Parafin kesit	E	51	GBM	4	WT		C228T	N/A
10-9	Parafin kesit	E	51	GBM	4	WT		C228T	N/A
10-10	Parafin kesit	E	82	GBM	4	WT		C228T	N/A
11-1	Doku	E	53	Astrositom	3	WT	N/A	C228T	WT
11-2	Doku	K	50	Astrositom	2	R132H		WT	WT

N/A: Analiz edilmemiş.

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
11-5	Doku	K	56	GBM	4	WT		C250T	WT
11-6	Doku	E	80	GBM	4	WT		C228T	WT
11-8	Doku	K	51	GBM	4	WT		C228T	WT
11-9	Doku	E	60	GBM	4	WT		WT	WT
11-10	Doku	E	48	GBM	4	WT		WT	WT
11-11	Doku	E	34	GBM	4	R132H		WT	WT
11-12	Doku	E	34	Astrositom	3	R132H		WT	WT
11-13	Doku	K	51	GBM	4	WT		C250T	WT
11-14	Doku	E	58	GBM	4	WT		C228T	A/G
11-15	Doku	E	63	GBM	4	WT		C228T	WT
11-16	Doku	K	44	GBM	4	R132C		WT	WT
11-17	Doku	E	40	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
11-18	Doku	K	69	GBM	4	WT		C228T	WT
11-19	Parafin kesit	E	61	GBM	4	WT		C228T	N/A
12-18	Doku	E	30	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
12-21	Doku	E	37	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
12-25	Doku	E	26	Astrositom	2	R132H		WT	WT
12-28	Doku	E	26	Astrositom	2	WT	WT	WT	WT
12-29	Doku	E	32	GBM	4	WT		WT	WT
12-30	Doku	E	59	GBM	4	WT		WT	WT
12-32	Doku	E	62	GBM	4	WT		WT	WT
12-37	Doku	E	34	Astrositom	2	R132H		WT	WT
12-38	Doku	K	66	GBM	4	WT		C228T	WT
12-39	Doku	E	57	GBM	4	WT		WT	WT
12-41	Doku	E	57	GBM	4	WT	WT	C228T	WT
12-42	Doku	E	37	GBM	4	WT	WT	WT	WT
12-43	Doku	E	46	Astrositom	2	R132H		WT	WT
12-45	Doku	E	40	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	A/G
12-46	Doku	E	31	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
12-51	Doku	E	55	GBM	4	WT	WT	C228T	WT
12-52	Doku	E	44	Astrositom	3	R132H		WT	WT
12-53	Doku	K	27	Astrositom	3	R132H		WT	WT
12-54	Doku	E	54	GBM	4	WT		C228T	WT
12-57	Doku	K	55	GBM	4	R132H		WT	WT

N/A: Analiz edilmemiş.

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
12-58	Doku	E	46	GBM	4	WT	WT	C228T	WT
12-67	Doku	E	40	GBM	4	WT	WT	WT	N/A
12-68	Doku	E	20	Astrositom	2	R132S		WT	G/G
12-69	Doku	K	62	Astrositom	2	R132H		WT	WT
12-70	Doku	E	33	GBM	4	R132H		WT	WT
12-71	Doku	E	71	GBM	4	WT		C228T	WT
12-75	Doku	K	56	GBM	4	WT		C228T	WT
12-81	Doku	K	57	GBM	4	WT		C250T	WT
12-83	Doku	E	49	GBM	4	WT		C228T	WT
12-84	Doku	K	40	GBM	4	R132H		WT	WT
12-89	Doku	E	39	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT
12-91	Doku	K	40	Oligodendrogliom	2	WT	WT	WT	WT
12-93	Parafin kesit	E	47	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	A/G
12-94	Doku	E	74	GBM	4	WT		C228T	WT
12-95	Doku	E	29	Astrositom	2	R132H		WT	WT
12-96	Parafin kesit	E	54	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
12-100	Doku	E	26	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
12-101	Doku	E	50	GBM	4	R132H		C228T	WT
12-102	Doku	E	57	GBM	4	WT		C250T	WT
12-103	Doku	E	44	GBM	4	WT		WT	WT
12-104	Doku	K	82	GBM	4	WT		C228T	WT
12-105	Doku	E	45	GBM	4	WT		C228T	WT
12-114	Doku	E	55	Astrositom	3	R132H		WT	WT
12-116	Doku	E	49	GBM	4	WT		C250T	WT
12-117	Doku	K	60	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	A/G
12-161	Doku	E	48	GBM	4	WT		C228T	WT
12-162	Doku	E	40	Oligodendrogliom	3	R132S		WT	WT
12-168	Doku	E	50	GBM	4	WT		C228T	WT
12-171	Doku	E	59	GBM	4	WT		C250T	WT
12-172	Doku	K	31	Astrositom	3	R132H		WT	WT
12-173	Doku	E	30	GBM	4	R132H		WT	WT
12-174	Doku	E	59	GBM	4	WT		C250T	WT
12-175	Doku	K	57	GBM	4	WT		C250T	WT
12-176	Doku	E	39	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT

N/A: Analiz edilmemiş.

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
13-1	Doku	K	28	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT
13-2	Doku	E	49	GBM	4	WT		WT	WT
13-3	Doku	E	40	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-4	Doku	K	34	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
13-5	Doku	K	31	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-6	Doku	E	31	Astrositom	3	R132H		WT	WT
13-9	Doku	K	27	Astrositom	2	R132S		WT	WT
13-12	Doku	K	31	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-14	Doku	K	40	GBM	4	WT		WT	WT
13-16	Doku	E	46	GBM	4	WT		C228T	WT
13-17	Doku	K	54	Astrositom	2	WT	WT	WT	WT
13-18	Parafin kesit	K	30	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-23	Doku	K	40	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-25	Doku	K	39	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
13-26	Doku	E	25	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-27	Doku	E	39	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
13-28	Doku	E	48	GBM	4	WT		C250T	WT
13-29	Doku	E	39	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
13-30	Doku	E	41	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-32	Parafin kesit	E	27	GBM	4	R132H		WT	A/G
13-35	Doku	K	56	Astrositom	3	WT	WT	C250T	WT
13-91	Doku	E	67	GBM	4	WT		WT	WT
13-92	Doku	E	31	Astrositom	3	R132S		WT	WT
13-93	Doku	E	46	GBM	4	WT		C228T	A/G
13-94	Doku	E	32	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
13-95	Doku	K	48	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
13-96	Parafin kesit	E	65	Astrositom	3	WT	WT	C250T	WT
13-97	Doku	E	37	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-98	Doku	E	37	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT
13-233	Doku	K	56	GBM	4	WT		C228T	WT
13-234	Doku	K	47	GBM	4	WT		C250T	WT
13-238	Doku	K	38	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
13-252	Doku	E	31	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	A/G
13-265	Doku	E	49	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
13-266	Doku	K	48	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT
13-601	Doku	E	48	GBM	4	WT		WT	WT

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
13-602	Doku	E	21	Astrositom	2	WT	WT	WT	WT
13-606	Doku	E	68	GBM	4	WT		C228T	WT
13-618	Doku	K	41	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-627	Doku	K	28	GBM	4	WT		WT	WT
13-645	Doku	K	57	Oligodendrogliom	3	R132H		C250T	WT
13-646	Parafin kesit	K	35	Oligodendrogliom	2	WT	WT	WT	WT
13-649	Doku	E	35	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
13-652	Parafin kesit	E	62	Astrositom	2	WT	WT	C228T	WT
13-653	Doku	K	35	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-654	Doku	K	66	Astrositom	3	WT	WT	C228T	WT
13-655	Parafin kesit	E	45	Astrositom	3	WT	WT	C250T	WT
13-656	Parafin kesit	K	24	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-657	Parafin kesit	E	37	Oligodendrogliom	3	R132G		WT	WT
13-658	Doku	E	49	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-659	Parafin kesit	E	37	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-660	Parafin kesit	K	32	Oligodendrogliom	2	WT	WT	WT	WT
13-661	Parafin kesit	K	32	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-662	Doku	K	34	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-663	Doku	E	47	Astrositom	3	WT	WT	C228T	N/A
13-664	Parafin kesit	E	43	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-665	Parafin kesit	K	63	Oligodendrogliom	3	R132H		C250T	WT
13-666	Parafin kesit	E	50	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
13-667	Parafin kesit	E	40	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-668	Parafin kesit	E	45	Oligodendrogliom	3	R132H		C250T	WT
13-669	Parafin kesit	K	24	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
13-670	Parafin kesit	E	57	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-672	Doku	E	61	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
13-673	Doku	E	35	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-674	Doku	K	41	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-675	Parafin kesit	E	18	Astrositom	2	R132C		WT	WT
13-676	Parafin kesit	E	26	Astrositom	3	R132H		WT	WT
13-677	Parafin kesit	K	36	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-678	Parafin kesit	E	36	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-679	Doku	K	49	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT

N/A: Analiz edilmemiş.

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
13-680	Parafin kesit	K	34	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-681	Parafin kesit	K	44	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-682	Parafin kesit	E	41	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
13-683	Parafin kesit	E	46	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
13-684	Doku	E	34	Astrositom	3	R132S		WT	WT
13-685	Doku	K	N/A	Oligodendrogliom	2	WT	WT	C228T	N/A
13-686	Parafin kesit	E	45	Astrositom	3	WT	WT	C250T	WT
13-687	Doku	K	26	Astrositom	3	WT	WT	WT	WT
13-688	Doku	K	40	Astrositom	3	R132H		WT	WT
13-698	Doku	E	38	Astrositom	2	R132H		C250T	WT
13-700	Doku	K	26	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
13-705	Doku	E	24	Astrositom	3	R132H		WT	A/G
13-708	Doku	K	28	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	A/G
13-713	Doku	K	79	GBM	4	WT		C250T	WT
13-714	Doku	E	67	GBM	4	WT		C228T	WT
13-716	Doku	K	64	GBM	4	WT		C228T	WT
13-720	Doku	E	57	GBM	4	WT		C250T	WT
13-722	Doku	E	59	GBM	4	WT		C228T	WT
13-728	Doku	E	20	GBM	4	WT		WT	WT
13-729	Doku	K	52	GBM	4	WT		WT	WT
13-730	Doku	E	35	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	A/G
13-731	Doku	E	19	GBM	4	WT	WT	WT	WT
13-732	Doku	E	30	Astrositom	3	R132H		WT	WT
13-733	Doku	E	44	GBM	4	WT		C228T	WT
13-734	Doku	E	64	Astrositom	3	WT	WT	C250T	WT
13-735	Doku	K	65	Astrositom	3	WT	WT	C250T	WT
13-736	Doku	E	58	GBM	4	WT		C250T	WT
13-737	Doku	E	68	GBM	4	R132H		C250T	WT
13-738	Doku	K	52	Oligodendrogliom	3	WT	WT	C250T	WT
13-739	Doku	K	32	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT
13-740	Doku	K	40	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-741	Doku	K	61	GBM	4	WT		C228T	WT
13-742	Doku	E	38	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-743	Doku	K	37	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT

N/A: Analiz edilmemiş.

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
13-744	Doku	E	66	GBM	4	WT		C228T	WT
13-745	Doku	K	41	GBM	4	R132H		WT	WT
13-746	Doku	K	32	Astrositom	2	R132C		WT	WT
13-747	Doku	E	27	Astrositom	2	R132C		WT	A/G
13-748	Doku	E	43	Astrositom	3	R132H		WT	WT
13-767	Doku	E	75	GBM	4	WT		C228T	A/G
13-768	Doku	E	34	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-786	Doku	E	58	GBM	4	WT		WT	WT
13-799	Doku	K	58	GBM	4	WT		WT	WT
13-804	Doku	K	22	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-820	Doku	E	34	Astrositom	2	R132C		WT	WT
13-821	Doku	K	44	GBM	4	WT		C228T	WT
13-824	Doku	K	58	GBM	4	WT		C228T	WT
13-829	Doku	K	31	GBM	4	R132H		WT	WT
13-830	Doku	K	57	GBM	4	WT		C250T	WT
13-832	Doku	K	55	GBM	4	WT		C250T	WT
13-835	Doku	E	72	GBM	4	WT		C250T	WT
13-857	Doku	E	40	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-865	Doku	E	38	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
13-869	Doku	E	63	GBM	4	WT		WT	WT
13-897	Doku	K	33	Astrositom	3	R132H		WT	G/G
13-905	Doku	E	24	GBM	4	R132H		WT	WT
13-1008	Doku	E	48	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
13-1013	Doku	E	28	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-1017	Doku	E	55	GBM	4	WT		C228T	WT
13-1022	Doku	K	21	Astrositom	2	R132H		WT	WT
13-1023	Doku	E	38	Oligodendrogliom	3	R132H		C250T	WT
14-1	Doku	K	29	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
14-6	Doku	E	46	GBM	4	R132H		C250T	WT
14-8	Doku	E	25	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
14-14	Doku	K	60	GBM	4	WT		C228T	WT
14-15	Doku	E	54	GBM	4	WT		WT	WT
14-16	Doku	E	57	Astrositom	3	WT	WT	C228T	WT
14-17	Doku	E	69	GBM	4	WT		C228T	WT
14-22	Doku	K	72	GBM	4	WT		C228T	WT
14-23	Doku	K	45	Oligodendrogliom	3	R132H		WT	WT

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
14-29	Doku	E	17	Astrositom	3	R132C		WT	WT
14-30	Doku	K	44	GBM	4	WT		C250T	WT
14-34	Doku	E	48	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	A/G
14-56	Doku	E	64	GBM	4	WT		C228T	WT
14-57	Doku	E	35	Astrositom	3	R132C		WT	A/G
14-58	Doku	E	59	Astrositom	2	R132H		WT	WT
14-61	Doku	K	23	GBM	4	WT		WT	WT
14-78	Doku	K	26	Astrositom	2	R132H		WT	WT
14-79	Doku	E	27	Astrositom	2	R132H		WT	WT
14-83	Doku	E	37	Astrositom	2	R132G		WT	WT
14-84	Doku	K	58	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
14-86	Doku	K	52	GBM	4	WT		C228T	WT
14-87	Doku	E	26	GBM	4	WT		WT	WT
14-90	Doku	E	68	GBM	4	WT		WT	WT
14-94	Doku	K	71	GBM	4	WT		C250T	WT
14-96	Doku	E	20	Astrositom	3	R132H		WT	WT
14-109	Doku	K	30	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	A/G
14-111	Doku	E	38	Astrositom	3	R132H		WT	WT
14-115	Doku	K	31	Astrositom	2	WT	WT	WT	WT
14-118	Doku	E	51	GBM	4	WT		C228T	WT
14-119	Doku	E	71	GBM	4	WT		WT	WT
14-120	Doku	K	52	GBM	4	WT		C250T	WT
14-121	Doku	E	33	Astrositom	3	R132H		WT	WT
14-122	Doku	K	65	GBM	4	WT		WT	A/G
14-126	Doku	E	31	Astrositom	3	R132H		WT	WT
14-131	Doku	E	50	GBM	4	WT	WT	WT	WT
14-134	Doku	E	24	Oligodendrogliom	2	WT	R172K	C250T	WT
14-137	Doku	E	50	GBM	4	WT		WT	WT
14-146	Parafin kesit	K	29	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
14-147	Parafin kesit	E	34	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
14-154	Parafin kesit	E	31	Oligodendrogliom	2	R132H		WT	WT
14-155	Doku	K	39	GBM	4	WT	WT	C250T	WT
14-157	Parafin kesit	K	29	Astrositom	2	WT	WT	WT	WT
14-161	Doku	K	33	Astrositom	2	R132H		WT	WT
14-163	Parafin kesit	K	36	Oligodendrogliom	3	R132H		C228T	WT

Ek 3 (devam): Dizileme analizi yapılan hastaların bilgileri ve analiz sonuçları

Hasta kodu	Örnek türü	Cinsiyet	Ameliyat yaşı	Patoloji	Derece	IDH1 (R132)	IDH2 (R140 / R172)	hTERT (C228 / C250)	rs55705857
14-172	Doku	E	40	GBM	4	WT	WT	WT	WT
14-175	Doku	E	60	GBM	4	WT	WT	C228T	WT
14-176	Doku	K	34	Astrositom	3	R132H		WT	G/G
14-177	Parafin kesit	E	33	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
14-180	Parafin kesit	K	43	Astrositom	2	R132H		WT	WT
14-181	Doku	E	41	GBM	4	R132H		WT	A/G
14-182	Doku	E	67	GBM	4	WT	WT	C228T	WT
14-186	Parafin kesit	K	38	Astrositom	3	R132H		WT	WT
14-189	Parafin kesit	E	41	Oligodendrogliom	2	WT	WT	C228T	WT
14-192	Doku	K	39	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
14-204	Parafin kesit	E	43	Astrositom	2	R132C		C228T	WT
14-209	Parafin kesit	E	23	Astrositom	3	R132H		WT	WT
14-215	Doku	E	40	Oligodendrogliom	2	R132H		C250T	WT
14-216	Doku	E	64	Oligodendrogliom	3	R132H		C250T	A/G
14-218	Doku	K	32	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	A/G
14-224	Parafin kesit	E	44	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
14-225	Parafin kesit	K	26	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
15-1	Doku	K	53	GBM	4	WT	WT	C228T	WT
15-7	Doku	K	45	GBM	4	WT	WT	WT	A/G
15-8	Doku	K	36	Oligodendrogliom	2	R132H		C228T	WT
15-10	Doku	K	28	Astrositom	2	R132H		WT	WT
15-12	Doku	E	21	Astrositom	2	R132H		WT	A/G
15-16	Doku	E	63	Astrositom	2	WT	WT	C228T	A/G

Ek 4: Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

12-21	12-25	12-37	12-38	12-46	12-100
G185A	A73G	A73G	A93G	T55C	A73G
A263G	T195C	T152C	A263G	T57C	A263G
A750G	A263G	T199C	A750G	A263G	C285T
A1438G	G499A	T204C	A1438G	A750G	A385G
A4769G	A750G	G207A	A4769G	A1438G	A750G
T6392C	A1438G	T250C	A6212G	G3016A (0,33A)	G1074A (0,29A)
A8860G	A1811G	A263G	A6323G	T3847C	A1438G
A15326G	A2706G	A750G	A8860G	T4703C	C2218T
	T4646C	A1438G	A15326G	A4769G	A2706G
	A4769G	G1719A	A16254G	T6253C	C2836T
	A4811G	A2706G	C16291T	A8860G	G3591A
	T5999C	T3732C	G16390A	G13102A	A4769G
	A6047G	A4529T	T16519C	T13254C	G4991A
	A6146G	A4769G		A15326G	G6026A
	C7028T	C7028T			C7028T
	G7762A	G8251A			T7581C
	A8860G	A8860G			A8860G
	T9070G	T10034C			G9575A
	T10907C	T10238C			A11467G
	T11009C	A10398G			G11719A
	C11332T	G11719A			A12308G
	A11467G	A12033G			G12372A
	G11719A	G12501A			T12879C
	A12308G	C12705T			A13104G
	G12372A	A13780G			A13422G
	C14620T	C14766T			A14070G
	C14766T	G15043A			G14323A
	C14866T	A15326G			G14364A
	A15326G	A15758G			C14766T
	T15693C	A15924G			G15148A
	A15758G	G16129A			A15326G
	T16356C	T16209C			A15954C
	C16179T	C16223T			T16086C
		A16299G			A16183C
		G16391A			T16189C
		T16519C			T16249C
					C16287T

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

13-01	13-03	13-05	13-06	13-23	13-25
A73G	A73G	A73G	A263G	A73G	A263G
T195C	A263G	A153G	A750G	A263G	C456T
A263G	C295T	T195C	T1193C	C295T	G513A
C497T	C462T	A263G	A1438G	C497T	A750G
A750G	T489C	T489G	T3027C	A750G	A1438G
T1040C	A750G	A750G	A4769G	T1189C	T4336C
T1189C	A1438G	A1438G	A8860G	A1438G	A4769G
A1438G	A2706G	G1719A	A15326G	A1811G	A8860G
A1811G	G3010A	A2706G	T16519C	A2706G	T10915C
A2706G	A4077G	G3438A		A3480G	T12384C
A3480G	T4216C	A4757G		A4769G	A15326G
A4769G	A4769G	A4769G		C7028T	G15884A
C7028T	C7028T	T6221C		T7624C	T16304C
A8860G	A8860G	C6371T		A8860G	
G9055A	A10398G	T6956C		G9055A	
T9698C	A11251G	C7028T		T9698C	
A10398G	G11719A	A8860G		C10293T	
A10550G	T12015C	G11719A		A10398G	
T11299C	T12477C	C12705T		A10550G	
G11719A	A12612G	A13966G		T11299C	
G12372A	G13708A	T14470C		A11467G	
A11467G	C13934T	C14766T		G11719A	
A12308G	C14766T	A14790G (0,12G)		A11818G	
C14167T	T14798C	A15326G		A12308G	
C14766T	C15298A	T16189C		G12372A	
T14798C	A15326G	C16223T		C14167T	
G14869A	C15452A	C16278T		C14766T	
A15326G	T16063C	A16309G		T14798C	
T16224C	C16069T	T16362C		A15326G	
T16311C	T16126C	T16519C		T16224C	
T16519C				T16311C	
				A16497G	
				T16519C	

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

13-27	13-30	13-266	13-601	13-708	13-743
A263G	A263G	A73G	T204C	A263G	T146C
A750G	G709A	A189G	A263G	A8817G	T195C
A1438G	A750G	A200G	A750G	A9218G	A263G
C2259T	C2259T	T204C	A1438G		A750G
A3144G	A4769G	G207A	G2916A (0,12A)		G902A (0,11A)
A3156G	T5196C	A263G	G3010A		T961G
A4745G	A8266G	G709A	A4769G		A1438G
A4769G	A8860G	A750G	T5465C		A4769G
G7337A	G9548A	T1243C	G7852A (0,17A)		T8448C
A8860G	C14872T	A1438G	A8860G		A8860G
T13326C	G15217A	A2706G	G9966A		A9150G
C13680T	G15234A (0,25A)	A3505G	A14524G		G12651A
C14872T	A15326G	A4093G	A15326G		G13759A
A15326G	A15662G	T4646C	C16278T (0,40C)		G14476C
C16261T		A4769G			A14587G
T16519C		G5046A			A15326G
		G5460A			T16092C
		T6297C			A16293G
		C7028T			T16311C
		G8251A			
		T8614C			
		T8705C			
		A8860G			
		G8994A			
		C11674T			
		G11719A			
		A11947G			
		T12414C			
		C12705T			
		C14766T			
		A15326G			
		G15884C			
		C16192T			
		C16223T			
		C16292T			
		T16325C			
		T16519C			

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

13-1013	13-1022	14-01	14-16	14-58	14-126
A73G	A73G	A263G	A73G	A73G	A263G
A189G	A93G	A750G	T152C	A263G	C456T
T204C	T246C	A1438G	A263G	A750G	A750G
G207A	A263G	A4769G	A750G	A1438G	A1438G
A263G	T489C	A8860G	A1438G	A1811G	T4452C
G709A	A750G	C11563G	A2706G	G2652A	A4769G
A750G	T1344C (0,11C)	C13374T	A2757G	A2706G	G5471A
T1243C	A1438G	T14218C	T3197C	A4188G	G5585A
A1438G	A2706G	A15326G	A4769G	C4640A	G6129A (0,17A)
A2706G	T3335C	T16519C	A5656G	A4769G	A8860G
A3505G	A4769G		C7028T	C7028T	A15326G
A4769G	T5196C (0,10C)		A7768G	A8860G	T16304C
G5046A	C7028T		A8860G	T9656C	
G5460A	A8701G		G9477A	A11467G	
C7028T	A8860G		A10283G	G11719A	
T7268C	T9540C		A11467G	A12308G	
G8251A	A10398G		G11719A	G12372A	
A8860G	C10400T		A12308G	T13743C	
G8994A	T10873C		G12372A	A14139G	
C11674T	G11719A		T12616C	C14766T	
G11719A	G12007A		T13617C	G14846A (0,48G)	
A11947G	C12498T		T14182C	A15326G	
T12414C	C12705T		C14766T	T15454C	
C12705T	G13135A		A15326G	A16343G	
C14766T	C14766T		T16093C (0,40T)		
A15326G	T14783C		T16189C		
G15884C	G15043A		C16270T		
C16223T	G15301A		C16465T		
C16292T	A15326G				
T16519C	G16145A				
	C16223T				
	C16234T				
	A16318T				
	T16519C				

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

14-176	14-218	15-01	15-08	15-16	NOT-47
T204C	T55C	A73G	A73G	A263G	T152C
A263G	T57C	T146C	G143A	A750G	A263G
T690C (0,4T0)	A263G	A189G	T146C	A1438G	A750G
A750G	A750G	T195C	A189G	A4769G	A1438G
A1438G	A1438G	T204C	C194T	A8589G	T2387C
G3380A (0,36G)	C1725T	G207A	T195C	A8860G	A4769G
G3413C (0,38G)	T3847C	A263G	T204C	T9686C (0,17C)	A8860G
A4769G	A4385G	G709A	G207A	C10394T	G14258A (0,24A)
G8519A (0,21A)	A4769G	A750G	A263G	A13866G	A15326G (0,16A)
A8860G	T6253C	T1243C	G709A	G15257A (0,14A)	T16189C
G10646A	A8860G	A1438G	A750G	A15326G	T16209C
A12172G	A11708G	A2706G	T1243C	T16189C	C16261T
A15326G	A15326G	A3505G	A1438G	T16519C	
G15497A	A15715G	A4093G	A2706G		
T16189C		A4769G	A3505G		
T16519C		G5046A	A4769G		
		G5460A	G5046A		
		C6356T	G5460A		
		C7028T	A6977G		
		G8251A	C7028T		
		T8614C	G8251A		
		A8860G	A8860G		
		G8994A	G8994A		
		C11674T	G9655A (0,27A)		
		G11719A	C11674T		
		A11947G	G11719A		
		T12414C	A11947G		
		C12705T	T12414C		
		C14766T	C12705T		
		A15326G	G13145A		
		G15884C	C14766T		
		C16192T	A15326G		
		C16223T	G15884C		
		C16292T	T15916C		
		T16519C	C16082T		
			C16223T		
			C16292T		
			T16519C		

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

NOT-48	NOT-49	NOT-50	NOT-51	NOT-52	NOT-53
A73G	A73G	A73G	A73G	A73G	A263G
T146C	C150T	A263G	C150T	A263G	G316A
A263G	A200G	G709A	A263G	G709A	A750G
C271T	A263G	A750G	A750G	A750G	A1438G
C295T	T334C	A1438G	A1438G	G930A	G3563A (0,39A)
C462T	A750G	G1888A	A2706G	A1438G	A4769G
T489C	A1438G	A2706G	T3197C	G1888A	A8860G
A547G	A1811G	T4216C	A4769G	A2706G	A15244G
A750G	A2706G	A4769G	A5656G	T4216C	A15326G
A1438G	A2707G	A4917G	C7028T	A4769G	C16218T
A2706G	A4188G	C7028T	A7385G	A4917G	
G3010A	C4640A	G8697A	A7768G	G5147A	
T4216C	A4769G	A8860G	A8860G	T6109C (0,14C)	
A4769G	A8860G	T10463C	G9477A	C7028T	
G5460A	G8950A	A11251G	T10927C	G7642A (0,38A)	
C7028T	T9656C	G11719A	A11467G	G8697A	
G8269A	T9770C	C12633A	G11719A	A8860G	
A8860G	A11467G	G13368A	A12308G	G9932A (0,30A)	
G9055A	G11719A	C14766T	G12372A	T10463C	
T10410A	A12308G	G14905A	G12618A	A11251G	
A10398G	G12372A	A15326G	T13617C	G11711A (0,14A)	
A11251G	T13743C	C15452A	T14182C	G11719A	
G11719A	A14139G	A15607G	C14766T	A11812G	
A12612G	C14766T	C15853T	A15326G	G13368A	
G13708A	A15326G	G15928A	A15746G (0,25G)	A14233G	
T13879C	T15454C	T16126C	T16144C	C14766T	
C14766T	G16153A	A16163G	C16270T	G14905A	
A15098G	A16343G	T16189C	A16289G	A15326G	
A15326G		T16243C		C15452A	
C15452A		C16294T		A15607G	
C15913T		T16519C		G15928A	
C16069T				T16126C	
T16126C				C16294T	
G16145A				C16296T	
C16261T				T16304C	
T16519C				T16519C	

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

NOT-54	NOT-55	NOT-56	NOT-58	NOT-59
A73G	T146C (0,43T)	A263G	A73G	A73G
T152C	C186A	T477C	A263G	A263G
A263G	A263G	T742C	G709A	A750G
C497T	A750G	A750G	A750G	A1438G
A750G	A1438G	A1438G	T1420C (0,24C)	A2706G
T1189C	A4122G	G3010A	A1438G	T3197C
A1438G	A4769G	A4769G	G1888A	A4769G
A1811G	G5226A (0,30G)	G6305A	T2351C	C7028T
A2706G	A8860G	A8860G	A2706G	A8860G
A3480G	G11330A (0,10A)	A10679G	T4216C	G9477A
G3666A	C14668T	A15326G	A4769G	A9667G
A4769G	A15326G	G15734A	A4917G	A11467G
G5460A	C16192T	C16185T (0,31T)	T5492C	G11719A
T9698C	T16519C	T16519C	C7028T	A12308G
C7028T			G8697A	G12372A
A8860G			A8860G	T13617C
G9055A			T10463C	C14766T
A10398G			A11251G	A14793G
A10550G			G11719A	A15218G
T11299C			T11961C (0,36C)	A15326G
A11467G			C12633A	G15761C (0,24C)
G11719A			G13368A	T15893C
A11923G			C14766T	C16256T
A12308G			G14905A	C16270T
G12372A			A15326G	C16291T
C14167T			C15452A	A16399G
C14766T			A15607G	
T14798C			C15853T	
A15326G			G15928A	
T16224C			C16104T (0,19T)	
C16292T			T16126C	
T16311C			A16163G	
T16519C			T16243C	
			C16294T	
			T16519C	

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

NOT-60	NOT-61	NOT-62	NOT-63	NOT-65	NOT-66
A73G	A73G	A73G	A73G	A263G	A73G
T152C	A263G	T146C	A153G	A750G	T152C
A263G	G709A	T152C	G185A	A1438G	T195C (0,10C)
C285T	A750G	A263G	T195C	A2706G	T246C
A750G	G930A	A384G	G228A	A4769G	A263G
A1438G	A1438G	G709A	A263G	C7028T	A750G
C2218T	A2706G	A750G	C295T	A8860G	A1438G
A2706G	T4216C	A1438G	C462T	A15326G	A2706G
A4769G	A4769G	G1888A	T489C	C15535T	A4769G
G4991A	T4823C	A2706G	A750G	T16311C	G5147A
G6026A	A4917G	T4216C	A1438G		C6491T
C7028T	G5147A	G4408A (0,40A)	G1782A (0,25G)		C7028T
T7581C	C6935T	A4769G	G2673A (0,36G)		T7193C
A8730G	C7028T	A4917G	A2706G		G8790A
A8860G	G8697A	G4959A	G3010A		A8860G
G9948A	A8860G	A5558G	A3558G		A9336G
G10290A (0,43G)	T10463C	C7028T	T4216C		T10457G
A11467G	A11251G	G7853A	A4769G		C11881T
G11719A	G11719A	G8078A	C5024T		T11935C
A12308G	A11812G	G8697A	C7028T		C12061T
G12372A	G13368A	A8860G	A8860G		A12939G
G12651A	A14233G	G9300A	G9548A		T13064C (0,17C)
T12879C	C14766T	T10463C	A10398G		A13651G
A13104G	G14905A	A11251G	A11251G		T14208C
T13886C	A15326G	G11719A	G11719A		A15326G
A14070G	C15452A	C12633A	G12501A		C16214T
G14364A	A15607G	G13368A	A12612G		T16217C
C14766T	G15928A	C14766T	G13708A		A16335G
G15148A	T16126C	G14905A	C14766T		G16398A
A15326G	T16198C	A15326G	T14798C		T16519C
A15954C	C16294T	C15452A	T14924C		
T16178C	C16296T	A15607G	A15326G		
A16183C	T16304C	G15928A	G15355A		
T16189C	T16519C	T16126C	C15452A		
T16249C		A16163G	C16069T		
C16256T		C16186T	T16357C		
T16311C		C16260T	T16519C		
T16519C		C16261T			
		C16294T			
		C16296T			
		T16519C			

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

NOT-67	NOT-68	NOT-69	NOT-70	NOT-71	NOT-72
A73G	T152C	T10C	A73G	A73G	A73G
T146C	A263G	A73G	A263G	G203A	G143A
T152C	A750G	T152C	G709A	T204C	T146C
T195C	A1438G	A153G	A750G	A263G	A189G
A263G	A4769G	A263G	A1438G	T482C	C194T (0,26T)
A750G	G8572A	A750G	G1888A	T489C	T195C (0,26T)
T1189C	A8860G	T980C	T1977C	A750G	T196C (0,36T)
A1438G	C14962T	A1438G	A2706G	A1438G	T204C
A1811G	G15106A	A1736G	C3684T	A2706G	G207A
A2706G	A15326G	A1811G	G3834A	G3705A (0,21G)	A263G
A3480G	C15430T	A2706G	T4216C	G4580A	G709A
A4769G	T16093C (0,28T)	C3741T	A4769G	T4703C	A750G
G4794A (0,19A)	T16311C	A4769G	A4917G	A4769G	T1243C
G5913A	T16519C	C5360T	G5913A	C7028T	A1438G
C7028T		C7028T	C7028T	A8701G	A2706G
G7521A		C8137T	C8622G	G8790A	A3505G
A8860G		C8684T	G8697A	A8860G	A4769G
G9055A		A8860G	A8860G	T9540C	G5046A
T9698C		C9841T	T10463C	C10107T	G5460A
A10398G		T10084C	A11251G	A10398G	C5601T
A10550G		C10142T	G11719A	C10400T	A6977G
T11299C		A11467G	A11812G	T10873C	C7028T
A11467G		G11719A	G13368A	G11719A	G8251A
G11719A		A12308G	A14233G	C12705T	A8860G
A12308G		G12372A	C14766T	C14766T	G8994A
A12358G		T13500C	T14798C	T14783C	C11674T
G12372A		G14569A	A14839G	G15043A	G11719A
T12738G		C14766T	G14905A	G15301A	A11947G
G12771A		A15326G	G15317A	A15326G	T12414C
C14167T		C16261T	A15326G	T16126C	C12705T
C14766T		A16309G	C15452A	C16223T	G13145A
T14798C		A16318T	A15607G	T16519C	C14766T
A15326G		T16519C	G15928A		T16519C
A15631G			C16111T		A15326G
T16224C			T16126C		G15884C
C16256T			T16224C		C16082T
T16311C			C16294T		C16223T
T16519C			C16296T		C16292T
			C16488T		
			T16519C		

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Ek 4 (devam): Tümör örneklerinde saptanan mitokondriyal varyasyonlar.*

NOT-73	NOT-74	NOT-75	NOT-76	NOT-77	NOT-78
A73G	A73G	A73G	A73G	A263G	A73G
C150T	A263G	T146C	C150T	A750G	T195C
T195C	C295A	T195C	T195C	A1438G	T204C
A263G	C497T	A263G	G207A	A4769G	G207A
G709A	A750G	G709A	A263G	G5177A	A263G
A750G	T1189C	A750G	C295T	T7645C	G709A
A1438G	G1211A	A1438G	T489C	A8860G	A750G
G1664A	A1438G	A1811G	A750G	G9612A	A1438G
G1888A	A1811G	A2706G	A1438G	A10217G	G1719A
A2706G	A2706G	A3480G	G2464A (0,17A)	A15326G	A2706G
T3906C	A3480G	A4769G	A2706G	C16256T	A4164G
T4216C	A4769G	A5582G	T4216C	T16352C	A4769G
A4769G	C7028T	C6546T	A4769G		A5186G
A4917G	A8860G	A6599G	G5147A		T6221C
G6261A	G9055A	C7028T	T5493C		C6371T
C7028T	T9698C	G7762A	A5804G		A6791G
C8455T	C10293T	A8860G	T6671C		C7028T
G8697A	A10398G	G9055A	C7028T		G7805A
A8860G	A10550G	T9698C	A7308G		T8400C
G9192C	T11299C	G11176A	C7476T		T8503C
T10463C	A11467G	A11467G	A8860G		A8860G
C10822T	G11719A	G11719A	C8958T		G11719A
A11251G	A11818G	A12308G	C10160T		T11878C
G11719A	A12308G	G12372A	A10398G		C12705T
A11812G	G12372A	G12771A	A10499G		G13708A
G12561A	C14167T	C14167T	A11002G		G13928A
G13368A	C14766T	G14364A	A11251G		A13966G
A13973T	T14798C	C14766T	G11377A		T14470C
A14233G	A15326G	G14831A	G11719A		C14766T
C14766T	G15591A	A15326G	C12346T		A15326G
G14905A	T16224C	T16189C	A12570G		A16183C
A15326G	C16234T	C16234T	A12612G		T16189C
C15452A	T16311C	C16257T	G13708A		C16223T
T15565C	A16497G	C16259T	G13759A		C16278T
A15607G	T16519C	T16304C	C14766T		T16519C
G15731A (0,16A)			G15148A		
G15928A			G15257A		
T15968C			A15326G		
T16126C			C15452A		
C16292T			A15679G		
C16294T			C16069T		
C16296T			T16126C		
T16519C			A16299G		
			T16519C (0,29C)		

(*) Koyu yeşil: tek tümörde; açık yeşil: birden fazla tümörde, sarı: normal doku örneğinde de saptanan varyasyonlar. Turuncu: heteroplazmik olarak saptanan varyasyonlarda minör komponent yüzdesi parantez içinde belirtilmiştir.

Oral Presentations
2020 AANS Annual Scientific Meeting
Boston, MA • April 25–29, 2020

IDH-Mutant Gliomas Differ in Distribution of Mitochondrial Genomic Alterations

Sirin K Yuksel, Cemaliye B Akyerli, Kaya Bilguvar, Ayça Ersen Danyeli, Engin Yilmaz, M Necmettin Pamir, Koray Ozduman.

Introduction: IDH1/2-mutations, which are the main driver events in astrocytomas and oligodendrogliomas, are associated with marked alterations in cellular metabolism. We hypothesized that such alterations would exert a purifying selection or evolutionary advantage to certain mitochondrial encoded genes.

Methods: 59 adult hemispheric diffuse gliomas were analyzed. 29 were IDH-mutant (97% lower grade) and 30 were IDH-wt (17% lower grade). Total DNA was isolated from fresh frozen samples and mitochondrial DNA was sequenced using Illumina platform, aligned and analyzed using mitochondrial databases (mtDNA server, MITOMAP). A 10% cutoff was applied for heteroplasmy. Mutation densities (mutations per Mb) in each of the mitochondrial encoded genes were calculated and compared against IDH-mutation status, WHO-grade (Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis, bonferoni correction applied). Distribution of mitochondrial haplogroups was comparable (IDH mutant: 76%R, 21%N, 3%L3, IDH-wt: 90%R, 7%N, 3%L3).

Results: Total of 1531 variations (469 unique) were identified. Mutation-density was significantly different between IDH-mut and IDH-wt tumors (25.95mut/Mb, 1.57mut/Mb, $p=0.024$). Significantly higher mutation densities were observed in *mt-ATP6*, *mt-TR*, *mt-ND6* genes and DLOOP ($p=0.041$, 0.014, 0.025 and 0.030, respectively). *mt-TQ*, *mt-ATP6*, *mt-TR* mutational densities were significantly different between WHO-grade II and WHO gradeIII/IV tumors ($p=0.046$, 0.048 and 0.021). *mt-TR* mutational density was also significantly different between lower-grade and WHO-grade IV ($p=0.036$).

Conclusion: Mutational densities in several mitochondrial encoded genes differ between IDH-mutant and IDH-wt tumors as well as different WHO grades.

Ek 6: Makale (gönderilmiş)



Author Center

Manuscript Information	
Manuscript ID:	JTN-29805
Title:	Analysis of mitochondrial DNA control region D-Loop in gliomas: Result of 52 patients
Turkish Title:	No information entered
Authors:	Şirin Kılıçturgay Yüksel ¹ , Koray Özdoğan ² , Engin Yılmaz ³ , Necmettin Pamir ² , Cemaliye Boylu Akyeri ³
Institutions:	¹ Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Istanbul, Turkey ² Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Istanbul, Turkey ³ Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Department of Medical Biology, School of Medicine, Istanbul, Turkey
Keywords:	D-loop, glioma, mitochondrial DNA, mtDNA variations, mutations
Turkish Keywords:	No information entered
Manuscript Type:	Research
Processing Status:	Awaiting Admin Processing

Abstract
<p>Aim: Role of extrachromosomal DNA in cancer and the consequences of mutations are unclear. However, mitochondrial DNA (mtDNA) variants in the D-loop region have been suggested to be associated with different clinical parameters and proposed as controversial prognostic markers. Impaired function of mitochondria cannot be tolerated by highly energy requiring brain cells. Therefore, we have focused on the regulatory region D-loop which is thought to cause no growth disadvantage for cells. Our aim is to investigate the effect of mtDNA variants mainly in D-loop on glioma biology.</p> <p>Material and Methods: Sanger sequencing of D-loop (15971 - 16451 bp) for 52 glioma patients was performed and the variations were statistically analyzed for gender, WHO classification, morphological grade, IDH / TERT status.</p> <p>Results: Total of 122 variations (51 unique) was identified in 52 patients. C16223T, T16189C, T16311C and T16126C variants were frequently detected. Total variation number was statistically non-significant among the analyzed categories. When individual variants were considered, T16311C and T16224C were statistically significant for WHO classification (p=0.033), morphological grade (p=0.036) and gender (p=0.039), respectively.</p> <p>Conclusion: Total variation number in D-loop was not found to be related with clinical variables. Our data suggests that individual variants may play critical role in glioma biology.</p>

Manuscript Files					
	File Name	File Size	Date Created	Category	Description
	JTN-dloop-09032020-title-page.docx	22 KB	Mar 09, 2020	Title Page	Title page
	JTN-dloop-09032020-manuscript.docx	53 KB	Mar 09, 2020	Main Document	Manuscript
	JTN-dloop-09032020-figure-1.docx	325 KB	Mar 09, 2020	Color Figure	Figure 1
	JTN-dloop-09032020-table-1.docx	14 KB	Mar 09, 2020	Table	Table 1

[Return to Main Page](#) | [New Manuscript](#) | [Edit User Profile](#) | [Logout](#)

Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas

Cemaliye B. Akyerli, PhD,¹ Şirin Yüksel, MSc,¹ Özge Can, PhD,² E. Zeynep Erson-Omay, PhD,³ Yavuz Oktay, PhD,¹ Erdal Coşgun, PhD,⁴ Ege Ülgen, MD,⁵ Yiğit Erdemgil, MSc,⁶ Aydın Sav, MD,⁹ Andreas von Deimling, MD,^{7,8} Murat Günel, MD,³ M. Cengiz Yakıcıer, MD, PhD,¹⁰ M. Necmettin Pamir, MD,⁵ and Koray Özduman, MD⁵

Departments of ¹Medical Biology, ²Medical Statistics and Bioinformatics, ³Neurosurgery, ⁴Medical Biochemistry, and ⁵Pathology, School of Medicine; ⁶Department of Medical Engineering, Faculty of Engineering; and ¹⁰Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Acıbadem University, Istanbul, Turkey; ⁷Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut; ⁸Department of Neuropathology, Heidelberg University; and ⁹German Cancer Research Center (DKFZ) and German Cancer Consortium (DKTK), Clinical Cooperation Unit (CCU) Neuropathology, Heidelberg, Germany

OBJECTIVE Recent studies have established that hemispheric diffuse gliomas may be grouped into subsets on the basis of molecular markers; these subsets are loosely correlated with the histopathological diagnosis but are strong predictors of clinical tumor behavior. Based on an analysis of molecular and clinical parameters, the authors hypothesized that mutations of the telomerase promoter (TERTp-mut) mark separate oncogenic programs among isocitrate dehydrogenase 1 and/or 2 (IDH) mutant (IDH-mut) and IDH wild-type (IDH-wt) diffuse gliomas independent of histopathology or WHO grade.

METHODS Four molecular subsets of the combined statuses of IDH and TERT-promoter mutations (double mutant, IDH only, TERT only, and double negative) were defined. Differences in age, anatomical location, molecular genetics, and survival rates in a surgical cohort of 299 patients with a total of 356 hemispheric diffuse gliomas (WHO Grade II, III, or IV) were analyzed.

RESULTS TERTp-mut were present in 38.8% of IDH-mut and 70.2% of IDH-wt gliomas. The mutational status was stable in each patient at 57 recurrence events over a 2645-month cumulative follow-up period. Among patients with IDH-mut gliomas, those in the double-mutant subset had better survival and a lower incidence of malignant degeneration than those in the IDH-only subset. Of patients in the double-mutant subset, 96.3% were also positive for 1p/19q codeletions. All patients with 1p/19q codeletions had TERTp-mut. In patients with IDH-mut glioma, epidermal growth factor receptor or phosphatase and tensin homolog mutations were not observed, and copy-number variations were uncommon. Among IDH-wt gliomas, the TERT-only subset was associated with significantly higher age, higher Ki-67 labeling index, primary glioblastoma-specific oncogenic changes, and poor survival. The double-negative subset was genetically and biologically heterogeneous. Survival analyses (Kaplan-Meier, multivariate, and regression-tree analyses) confirmed that patients in the 4 molecular subsets had distinct prognoses.

CONCLUSIONS Molecular subsets result in different tumor biology and clinical behaviors in hemispheric diffuse gliomas.

<https://thejns.org/doi/abs/10.3171/2016.11.JNS16973>

KEY WORDS glioma; isocitrate dehydrogenase; telomerase; mutation; prognosis; oncology

ABBREVIATIONS ATRX-mut = ATRX mutations; CART = classification and regression tree; EGFR = epidermal growth factor receptor; GBM = glioblastoma; H3F3A-mut = H3 histone family member 3A mutations; HDG = hemispheric diffuse glioma; IDH = isocitrate dehydrogenase 1 and/or 2; IDH-mut = IDH mutations; IHC = immunohistochemistry; MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification; PDGFR = platelet-derived growth factor receptor; pGBM = primary GBM; PTEN = phosphatase and tensin homolog; TERTp-mut = telomerase promoter mutations; wt = wild type.

SUBMITTED April 15, 2016. **ACCEPTED** November 21, 2016.

INCLUDE WHEN CITING Published online June 16, 2017; DOI: 10.3171/2016.11.JNS16973.

RECENT large integrated analyses have clearly established that oncogenic molecular changes closely correlate with clinical behavior in diffuse gliomas.^{3-6,19} Most of these oncogenic changes are stochastic, but some recur enough to be used as molecular markers to define clinical subsets.⁷ Today, there is compelling evidence that isocitrate dehydrogenase 1 and/or 2 (IDH) mutations (IDH-mut) are indicative of a specific disease group.^{3-6,19} Similarly, 1p/19q codeletions have become synonymous with oligodendrogliomas. Other authors have demonstrated that a combination of 3 molecular markers (IDH-mut, telomerase promoter mutations [TERTp-mut], and 1p/19q codeletions) can be used to categorize lower-grade gliomas and glioblastomas (GBMs) into clinically relevant molecular subsets.

With a cohort of 299 unique patients with hemispheric diffuse gliomas (HDGs), this study supports recent efforts on molecular classification of HDGs and also provides novel clinically relevant observations. Molecular tests were performed on 356 sample sets, which were acquired at initial surgeries and surgeries for recurrence in these 299 patients. This article is organized into 3 sections. The initial section focuses on activating TERTp-mut and presents our findings that support TERTp-mut as a reliable biomarker in gliomas. The second section is aimed at demonstrating that molecular markers have only a weak correlation with histopathology in HDGs. The third section focuses on molecular classification of all HDGs based on only 2 molecular markers, namely IDH-mut and TERTp-mut. When we stay blinded to the histopathological diagnosis, these 2 markers can provide strong clues on tumor biology. The 4 resultant molecular subsets differed in various aspects of tumor biology, including anatomical localization, multifocality, degree of anaplasia, Ki-67 index, and additional molecular changes harbored, and also differed in age and survival rates of affected patients.

Methods

Definition of the Molecular Subsets

The following molecular subsets were defined to enhance understandability and fluency of this work. Based on IDH-mut, TERTp-mut, and 1p/19q codeletion, Eckel-Passow et al.⁷ reported 5 molecular subsets among lower-grade gliomas (WHO Grades II and III) and 4 molecular subsets among GBMs (WHO Grade IV). Although our groups were similar to and our findings parallel with those of that benchmark study, for the sake of consistency we chose to categorize HDGs of all grades into 4 subsets. Here, “double mutant” defines hemispheric diffuse gliomas with IDH-mut and TERTp-mut. This group corresponds to the combination of “triple-positive” and “TERT and IDH mutation” subsets defined by Eckel-Passow et al.⁷ The “IDH-only” subset is defined as the presence of IDH-mut and absence of TERTp-mut and corresponds to the “IDH mutation only” subset of Eckel-Passow et al.⁷ The “TERT-only” group is defined by the absence of IDH-mut and presence of TERTp-mut and corresponds to the “TERT mutation only” subset of Eckel-Passow et al.⁷ The “double-negative” subset is defined by the absence of both IDH-mut and TERTp-mut and corresponds to the “triple-negative” subset of Eckel-Passow et al.⁷

Patients and Tumor Samples

A total of 356 HDG samples from 299 unique patients who underwent surgery at Acibadem University School of Medicine, Department of Neurosurgery, were included. Thalamic, brainstem, cerebellar, and spinal gliomas were excluded. Only patients with HDGs were included; those with gliomatosis cerebri and specific expansile pathologies such as pilocytic astrocytomas, pleomorphic xanthoastrocytomas, glioneuronal tumors (ganglioglioma, gangliocytoma), or dysembryoplastic neuroepithelial tumors were excluded. Clinical details are presented in Table 1. Fifty-seven of the tumor samples were from recurrence events in 46 patients. In 10 WHO Grade II oligodendrogliomas (all TERTp-mut), biopsy samples were obtained from brain parenchyma 1.5 cm away from tumor T2-weighted hyperintensity (as determined by intraoperative MRI) to test for the presence of TERTp-mut in the surrounding brain parenchyma. Patients with WHO Grade II oligodendroglioma were selected for this purpose, because that is the least likely histopathological group to contain a large number of infiltrating tumor cells in the surrounding normal-appearing brain parenchyma. Clinical information and tissues were used with written informed consent from the patients. This study was approved by the Acibadem University Ethics Committee.

Statistical Analysis

The chi-square test, t-test, and ANOVA were used for standard statistical analyses. Multivariate analysis was performed for 13 variables (age [dichotomized at 50 years], sex, Ki-67 [dichotomized at 0.15], anatomical localization, multifocality, histopathology, WHO group, WHO grade, molecular group, IDH-mut status, TERTp-mut status, 1p/19q codeletion status, and H3 histone family member 3A mutation [H3F3A-mut] status) using the Mann-Whitney U-test (2 variables) or Kruskal-Wallis test (> 2 variables). Dunn's test was used for multiple comparisons. Fisher's exact chi-square test was used for categorical data. Kaplan-Meier analyses were performed using logarithmic transformation and log-rank test and plotted using XLSTAT 2014.6.03 software (Addinsoft).

A decision-tree analysis (end point, overall survival) was used for predicting the effect of dependent and independent variables. Classification and regression-tree (CART) analysis was used to calculate the predictive power of independent variables on overall survival time (with 10-fold cross-validation). Variables were IDH-mut status, TERTp-mut status, 1p/19q codeletion status, H3F3A-mut status, phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss on immunohistochemistry (IHC), p16 loss on IHC, nuclear TP53 accumulation on IHC, Phospho-BRAF on IDH, and epidermal growth factor receptor (EGFR) on IHC. Calculations were performed in SPSS 20 (IBM Corp.) using custom R codes.

Histopathology and IHC

A diagnosis was determined for each sample by a single neuropathologist according to the 2007 WHO Central Nervous System Tumor Classification Scheme.¹⁵ IHC was performed for IDH1 (Diovana, H09), Ki-67 (Dako, MIB-1), Phospho-BRAF (GeneTex), PTEN (Neomarkers, 17A), p16^{Ink4a} (Cintec, INK4a), TP53 (Scytek, DO/7), and vascu-

TABLE 1. Patient characteristics

Characteristic	WHO Grade at Initial Presentation			Total
	II	III	IV	
No. of patients	136	47	116	299
Age (median [range]) (yrs)	36.5 (20–77)	37 (18–66)	45 (24–82)	44 (18–82)
Male/female ratio	1.52	1.61	2.05	1.72
IDH-mut cases (%)	91.2	66	8.6	55.2
TERTp-mut cases (%)	39	55.3	68.1	52.8
Histology (no. [%])				
Oligodendroglioma	63 (46.3)	16 (34)	0 (0)	95 (31.8)
Astrocytoma	49 (36)	17 (36.2)	0 (0)	78 (26.1)
Oligoastrocytoma	24 (17.7)	14 (29.8)	0 (0)	45 (15.1)
GBM	0 (0)	0 (0)	138	138
Localization tumor center (no. [%])				
Frontal	70 (51.5)	30 (63.8)	45 (38.8)	145 (48.5)
Insular	33 (24.3)	4 (8.5)	1 (0.8)	38 (12.7)
Temporal	21 (15.4)	9 (19.2)	39 (33.6)	69 (23.1)
Parietal	10 (7.4)	4 (8.5)	14 (12.1)	28 (9.4)
Occipital	2 (1.5)	0 (0)	17 (14.7)	19 (6.4)
Multifocality or gliomatosis-like multilobar involvement (no. [%])	2 (1.5)	5 (10.6)	5 (4.3)	12 (4)
Follow-up (median [range]) (mos)	49.5 (1–267)	26 (1–189)	21 (4–69)	23 (1–267)
Deaths during follow-up (no. [%])	12 (8.8)	16 (34.0)	61 (52.6)	89 (30)

lar endothelial growth factor (VEGF) (Neomarkers, VG1) (molecular subsets are in parentheses).

Sanger Sequencing and Minisequencing

IDH-mut and TERTp-mut were tested using sequencing and/or minisequencing. Minisequencing was performed for IDH1-R132G/S/C, IDH1-R132L/H/P, IDH2-R140Q/L, IDH2-R140W, IDH2-R172K/M, IDH2-R172W, hTERT-C228T, and hTERT-C250T. If no mutations were detected in any of these hotspots, IDH and TERTp were also determined by Sanger sequencing of IDH1-R132, IDH2-R140, IDH2-R172, TERTp-C228T, and TERTp-C250T. EGFR mutations were also Sanger sequenced.

Microsatellite Marker Analysis for 1p/19q Codeletions

Microsatellite marker analysis (fluorescent polymerase chain reaction [PCR] and capillary electrophoresis for D1S162, D1S199, D1S226, D1S186, D1S312, D1S112, D1S918, and D1S206) was the standard test for determining 1p/19q codeletion. Fluorescence in situ hybridization was not used for 1p/19q testing.

OncoScan Analysis

Formalin-fixed paraffin-embedded samples of 20 oligodendrogliomas (WHO Grades II and III) were tested using OncoScan 3.0 (Affymetrix) and analyzed using Nexus Express software (BioDiscovery, Inc.).

Multiplex Ligation-Dependent Probe-Amplification Analysis

A SALSA multiplex ligation-dependent probe-amplification (MLPA) probe mix P105-D1 Glioma-2 (MRC-

Holland) kit was used to analyze EGFR copy-number alterations in 20 oligodendrogliomas¹⁵ according to manufacturer recommendations.

Exome Sequencing and Copy-Number Calculation

Whole-exome capture and next-generation sequencing were performed for 35 patients as described in detail previously.⁸ Mutants were confirmed by Sanger sequencing. Copy-number determination was performed using the ExomeCNV tool.

Results

Incidence of TERTp-mut in HDGs

TERTp-mut (at C228T or C250T) were detected in 157 (52.5%) of 299 cases. The incidences of TERTp-mut in different histopathologies, tumor grades, and patient ages are presented in Fig. 1A–D. The TERTp-mut incidence was highest in oligodendrogliomas (71% [67 of 95 WHO Grade II and III oligodendrogliomas]) and in GBMs (63% [78 of 117]). The mutation was not detected in the normal-appearing white matter surrounding the tumor (1.5 cm away from T2-weighted hyperintensity) in any of the 10 patients with oligodendrogliomas, according to Sanger sequencing (Fig. 1C). The mutational status did not change in 57 recurrence events (no-gain events and no-loss events) in 46 patients over a cumulative period of 2645 patient-months (220.4 patient-years) between subsequent surgeries (Fig. 1E). Seventeen (37%) of the recurrent tumors had TERTp-mut. Twenty-eight, 7, and 11 patients had WHO Grade II, III, or IV tumors, respectively, at initial diagnosis; 58.2% had received radiation and/or chemotherapy between subsequent tumor resections, and in 52.6% of them,

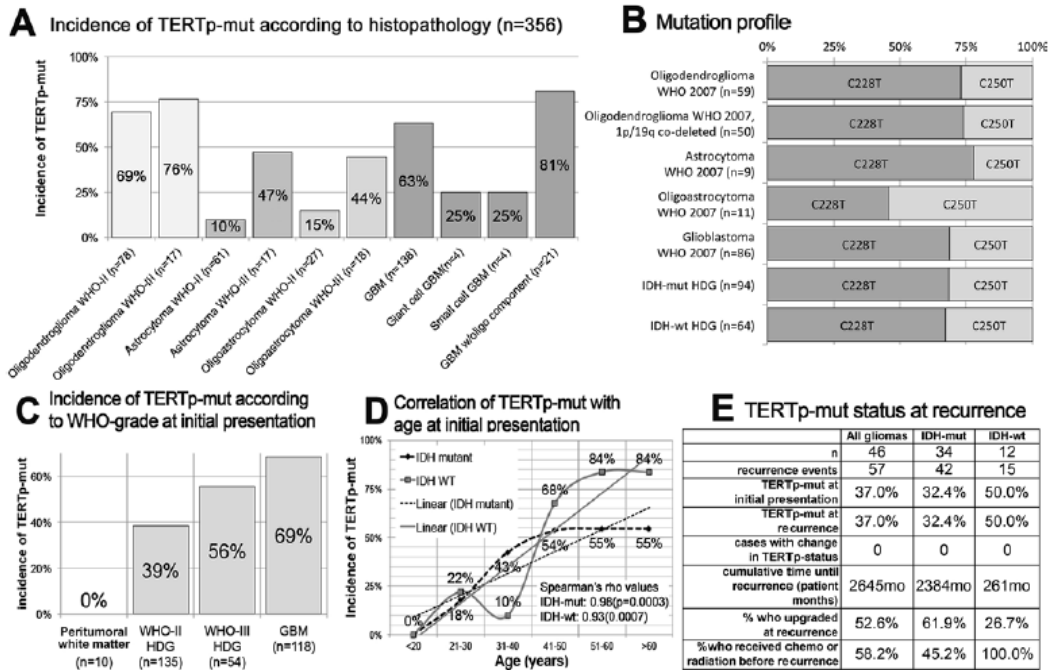


FIG. 1. A: In 356 tumors, no exclusive association between the histopathological diagnosis and TERTp-mut status was noted. B: The C228T hotspot was approximately twice as common as C250T. C: No TERTp-mut were detected in the peritumoral brain parenchyma. C and D: TERTp-mut tumors tended to be more anaplastic, and the patients tended to be older. E: These findings do not indicate an accumulation of TERT mutations over time, because the initial mutational status remained stable at all recurrences over long follow-up periods despite malignant degeneration and administration of mutagenic adjuvant therapies such as temozolomide and radiation. chemo = chemotherapy.

the tumor recurred at a WHO grade higher than that of the original tumor.

The C228T mutation was more common than the C250T mutation, and this pattern was consistent in all histopathologies and also in IDH-mut and IDH wild-type (IDH-wt) tumors, except for oligoastrocytomas, in which the C250T mutation was more common (55%) (Fig. 1B). The incidences of the C228T mutation were 41 (67.2%) of 61 in double-mutant HDGs and 63 (68.5%) of 92 among TERT-only tumors.

Correlation of Oncogenic Changes With Histopathology in HDGs

There was only a weak correlation between oncogenic changes and histopathological diagnosis, and there was much overlap in the sets of oncogenic changes observed in different histopathologies (Fig. 2A). Of all oligodendrogliomas,¹⁵ 8.9% were IDH-wt and 25% were not 1p/19q codeleted. Similarly, 5.6% of all nonoligodendroglial WHO Grade II and III gliomas harbored the 1p/19q codeletion. TERTp-mut consistently appeared in 2 separate populations, each with different oncogenic profiles (Fig. 2B). A similar dichotomization persisted when tumors

of the same histological group but of different grades were considered (Fig. 2C). The oncogenic profile pattern in IDH-wt gliomas resembled that in primary GBMs (GBMs), even when they were WHO Grade II or III (Fig. 2D).

Four Molecular Subsets Based on 2 Recurrent Mutations (IDH-mut and TERTp-mut)

In contrast to the weak correlation with histopathology, TERTp-mut were much better correlated to the oncogenic profiles that were the most common in oligodendrogliomas (IDH-mut, 1p/19q codeL, ATRX intact) and hemispheric diffuse astrocytomas (IDH-mut, 1p/19q-nondeL, nuclear ATRX expression loss).¹⁶ In 1p/19q-codeleted cases (n = 51 [48 oligodendrogliomas and 3 oligoastrocytomas]), the incidence of TERTp-mut was 100%. All of these tumors (n = 51) were also IDH-mut. Based on the very strong concordance between 1p/19q codeletions and TERTp-mut in IDH-mut HDGs and the significantly older patient age, higher Ki-67 labeling index, and poorer patient survival, regardless of WHO grade or group, in IDH-wt HDGs, we hypothesized that all HDGs (Grades II, III, and IV) could be categorized on the basis of IDH-mut and TERTp-mut

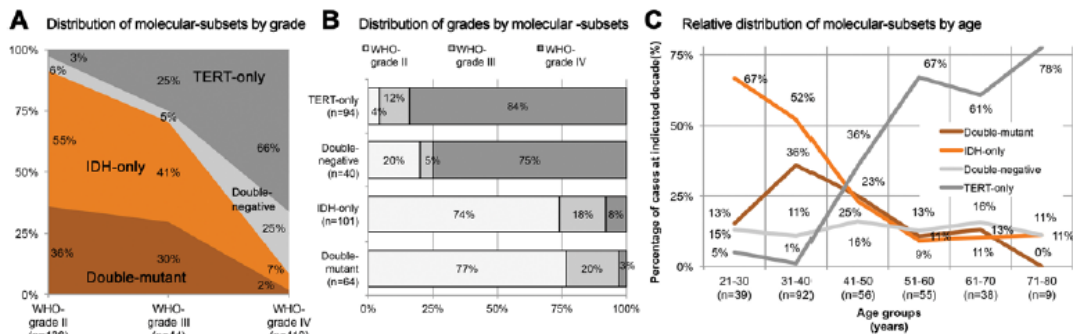


FIG. 3. When we remain blinded to histopathology results, the combination of IDH-mut and TERTp-mut status defines 4 molecular subsets. **A:** Relative incidences of these molecular subsets vary according to tumor grade. **B:** IDH-wt gliomas display mostly anaplastic features, whereas IDH-mut gliomas are predominantly lower grade at presentation. The incidence of IDH-mut peaks at younger patient ages. **C:** The incidence of TERT-only cases increases with age, whereas that of double-negative cases remains relatively constant over time.

presentation, and the histopathological diagnoses were GBM in 84.0%, oligoastrocytoma in 6.4%, astrocytoma in 5.3%, and 4 oligodendroglioma in 4.3%.

Demographic, Clinical, and Molecular Characteristics of the 4 Molecular Subsets

Patient Age at Presentation

The incidence of TERTp-mut increased significantly with patient age regardless of the IDH-mut status (Fig. 1D). Each of the 4 molecular subsets had a unique age profile (Fig. 3C). The IDH-only and double-mutant subsets were most common in the 3rd and 4th decades, respectively. The median age for the IDH-only subset was 34 years (range 17–77 years). For the double-mutant subset, it was 38 years (range 24–68 years). The relative incidence of TERT-only tumors increased persistently from 5% in the 3rd decade to 87% in the 8th decade of life. The incidence of double-negative tumors remained fairly constant at 13% (SD ± 2) from the 3rd through the 8th decade of life. The median age for patients in the TERT-only subset was 57 years (range 24–85 years) and for those in the double-negative subset was 46.5 years (range 21–71 years). We observed a significant correlation between the degree of anaplasia (WHO grade) and patient age; in the double-mutant, IDH-only, and double-negative subsets, older patients had higher WHO grades. This finding reached significance in the IDH-only and double-negative subsets ($p = 0.03665$ and 0.07113 , respectively, ANOVA) but not in the double-mutant subset ($p = 0.050354$, ANOVA). In contrast, in the TERT-only subset, we found neither a significant difference nor a trend in age between WHO grades ($p = 0.261827$, ANOVA).

Anatomical Localization

The anatomical distributions of the 4 subsets followed different patterns (Fig. 4A and B). The frontal lobe was the most common site for all the molecular subsets. The double-mutant subset had a very strong predilection for the frontal lobe; 74% of the tumors were localized. IDH-only tumors made up 70% of those located at the insula.

Parietal and occipital localizations were far less common for IDH-mut tumors (Fig. 4A and B). Only 2% of the double-mutant and 1% of the IDH-only tumors were located in the occipital lobe. Multifocality was not observed in the double-mutant or double-negative subsets. It was observed most commonly in the TERT-only (4%) and IDH-only (1%) subsets.

Survival

Overall survival rates were significantly different for each molecular subset when all 299 patients (WHO Grade II, III, and IV) were analyzed as a single cohort (Fig. 5A–F). The IDH-mut was uniformly associated with better prognosis. In contrast, TERTp-mut were associated with reciprocal clinical behavior in IDH-mut and IDH-wt gliomas. In the IDH-mut subset, TERTp-mut were associated with significantly better survival (patients of all grades analyzed together, $p = 0.043$, log rank) despite the short median follow-up period (42 months [range 1–267 months]). Only in the double-mutant subset was there no correlation between WHO grade and overall survival ($p = 1$, log rank). Also, the proliferative (Ki-67) indexes were comparable despite increasing WHO grades ($p = 0.77194$, ANOVA). In the IDH-only subset, however, overall survival was significantly worse in patients with tumors with a higher WHO grade ($p = 0.002$, log rank), and we noted a trend toward higher proliferative indexes in IDH-only gliomas of increasing WHO grades ($p = 0.067257$, ANOVA).

In patients with IDH-wt tumors, TERTp-mut were associated with poorer survival ($n = 134$, $p = 0.004$, log rank). When individual WHO grades were analyzed, TERTp-mut were associated with significantly poorer survival in patients with WHO Grade II ($n = 12$, $p = 0.046$, log rank) or WHO Grade IV ($n = 104$, $p = 0.03$, log rank) tumors. We found no survival difference for patients with WHO Grade III tumors based on TERTp-mut status. For patients in the TERT-only subset with tumors at different WHO grades, survival rates were comparable ($p = 0.56$, log rank), and the Ki-67 proliferative indexes at different WHO grades were also comparable ($p = 0.075570$, ANOVA). A multi-

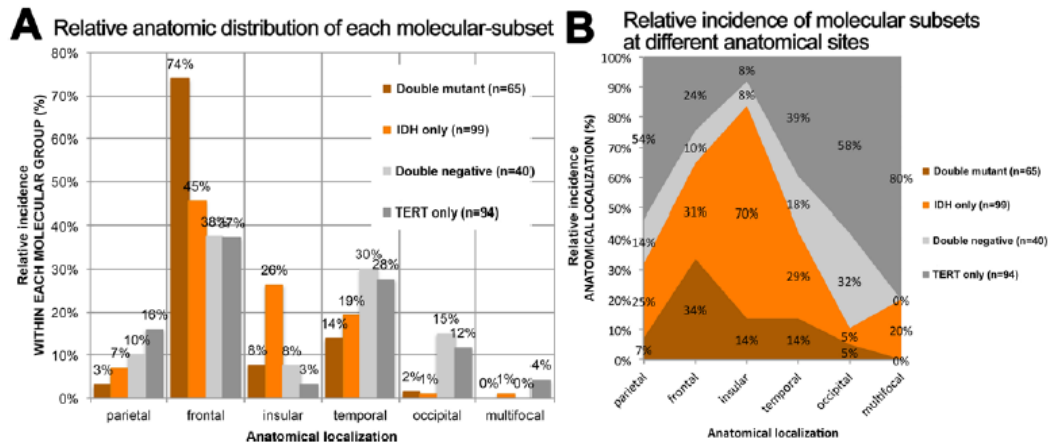


FIG. 4. The anatomical distribution of each molecular subset followed a unique pattern. The frontal lobe was the most common site for all molecular groups. The double-mutant subset had a very strong predilection for the frontal lobe. At the insula, a strong predilection for IDH-only tumors was found. IDH-mut tumors were encountered infrequently in the parietal and occipital lobes. Multifocality was observed only in the TERT-only and IDH-only subsets.

variate analysis for overall survival identified age (older than 50 years), Ki-67 labeling index (greater than 0.15), pathological diagnosis, WHO group, WHO grade, IDH-mut status, TERTp-mut status, and 1p/19q codeletion status as independent significant variables (Table 2). Sex, laterality, multifocality, and H3F3A-mut status were not significant variables. In addition to Kaplan-Meier and multivariate analyses, a third method was also used. An unsupervised CART analysis of molecular markers with an end point of overall survival in 299 patients confirmed IDH-mut status, 1p/19q codeletion status, TERTp-mut status, nuclear TP53 expression on IHC, and numeric Ki-67 index as significant independent variables. When the same analysis was performed with WHO grade and age as co-variables, the same independent variables were identified. These decision trees are presented in Figs. 6 and 7.

Oncogenic Molecular Changes Across HDGs

We observed different patterns of molecular oncogenic changes in the 4 molecular subsets defined according to the IDH-mut and TERTp-mut statuses. Among IDH-mut cases, the double-mutant and IDH-only subsets had slightly different oncogenic molecular changes. Non-R132H IDH-mut were significantly more common in the IDH-only subset than in the double-mutant subset (12.8% vs 3.2%, respectively; $p = 0.041$, chi-square). Nuclear TP53 expression was significantly more common in the IDH-only subset (79.2%) than in the double-mutant subset (21.9%) ($p < 0.001$, chi-square test).

EGFR and PTEN alterations are considered a hallmark of primary GBMs (pGBMs). We did not observe any EGFR mutations in IDH-mut tumors ($n = 30$, Sanger sequencing). In the double-mutant subset, no EGFR copy-number alterations were detected ($n = 19$). In IDH-only cases, EGFR amplifications were observed in 3 (27%) of 11 cases. It is interesting to note that a semiquantitative immu-

nohistochemical comparison for EGFR protein expression in 18 double-mutant versus 5 IDH-only cases was insignificant ($p = 0.3081$, t-test). PTEN mutations, which are also characteristic of pGBMs, were not observed in any of the IDH-mut cases (tested by Sanger sequencing in 19 double-mutant and 11 IDH-only cases). Copy-number alterations were also rare, and heterozygous losses were observed in 1 of 19 double-mutant cases (as tested by OncoScan) and 1 of 11 IDH-only cases (as tested by MLPA). In contrast, the loss of PTEN protein expression, as demonstrated by IHC, was very common in all 4 molecular subtypes (72.7% in double-mutant, 77.1% in IDH-only, 82.6% in TERT-only, and 78.4% in double-negative subsets).

Glioma-associated oncogenic changes (PTEN, EGFR, PDGFRA, CDKN2A, CDK4, RB1, p53, and H3.3) were analyzed according to the molecular subsets in 68 HDGs using a combination of techniques (Fig. 8). This study was performed as a proof-of-principle analysis to support the idea that the 4 molecular subsets had different oncogenic molecular changes suggestive of each of them having a different tumor biology, but a comprehensive characterization of all molecular changes in HDGs was not intended. However, the results of this analysis provide support for the notion that the double-negative subset was the most heterogeneous group. In addition to oncogenic changes, this group was also heterogeneous in terms of age, Ki-67 index, and overall survival. When double-negative tumors of different WHO grades were analyzed, they also each exhibited different tumor biology. WHO Grade II tumors made up 20% of the double-negative subset, were from young patients, had very low Ki-67 indexes, and resulted in very good survival. In contrast, the majority (80%) of the double-negative tumors were WHO Grade III or IV and resulted in a dismal prognosis. These cases included those with histone H3.3 (*H3F3A*) mutations (a mutation originally identified in diffuse intrinsic pons gliomas of the pediatric popula-

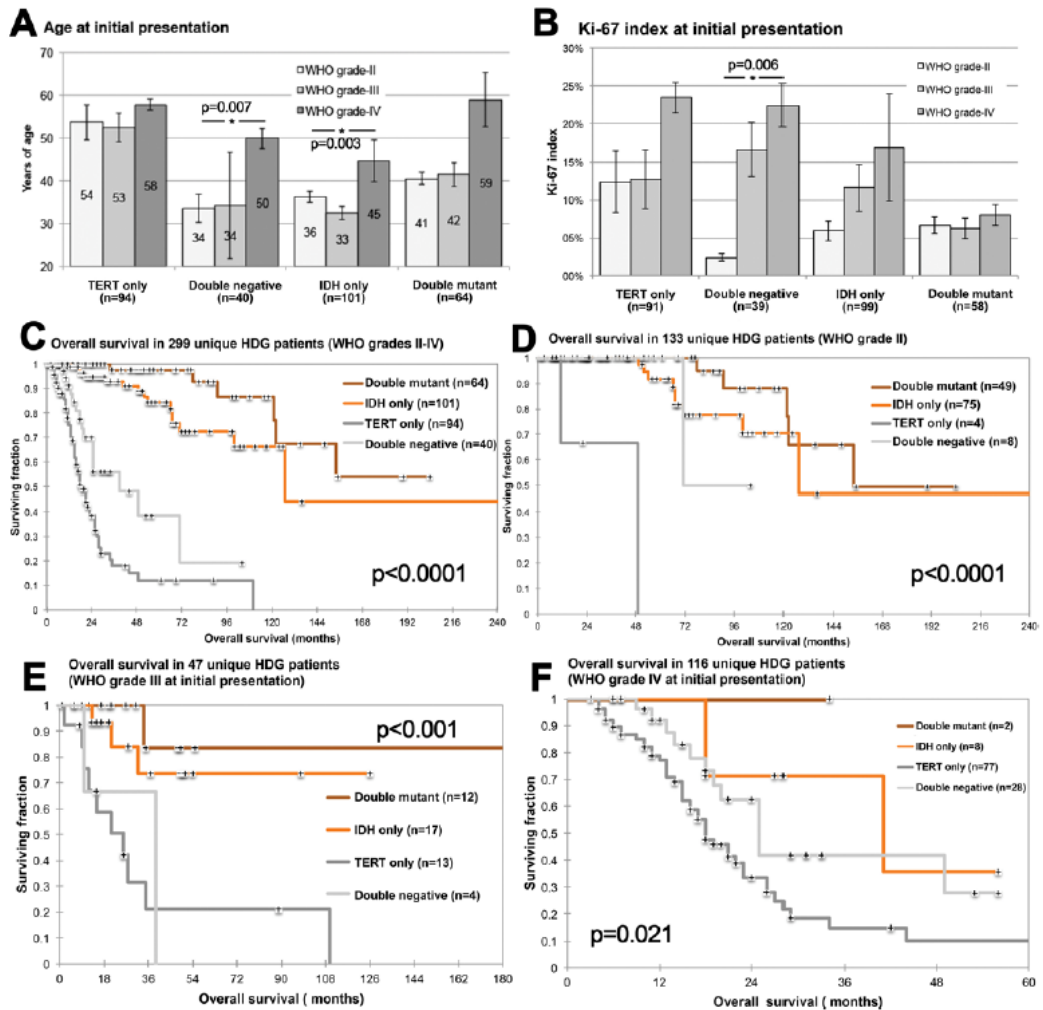


FIG. 5. Each of the 4 molecular subsets has distinct clinical characteristics. **A:** Regardless of the molecular subset, patients with a WHO Grade IV tumor at initial presentation were significantly older than those with a lower-grade tumor. Patients of the TERT-only subset were also significantly older at lower tumor grades than patients with tumors of the same grade of different subsets. **B:** These patients with a WHO Grade II or III tumor also exhibited higher proliferative indexes compared to those of other subsets. **C-F:** The TERT-only subset was associated with poorer prognosis than all subgroups at all WHO grades. The double-negative subset contained young patients with a low proliferative index and good survival at WHO Grade II and older patients with a high proliferative index and poor survival at higher tumor grades (A, B, D, E, and F). These results hint at further subgroups in this molecular subset. IDH-mut gliomas were associated with a much better prognosis than IDH-wt HDGs (C, D, E, and F). Mean values are presented at the center of the columns. Error bars indicate the standard error. Significant results are marked with stars, and the p values are indicated.

tion) and had a very poor prognosis (median survival 11 months, maximum survival 16 months). For WHO Grade IV tumors, however, the double-negative subset was associated with a significantly better prognosis than the TERT-only subset ($p = 0.044$, log rank).

Discussion

TERTp-mut Are Tumor Specific and Stable Over Time

Telomere lengthening is a fundamental hallmark of cancer, and “activating telomerase promoter mutations

TABLE 2. Multivariate analysis of 13 variables for overall survival

Variable	p Value
Age (yrs)	<0.001*
>50	
<50	
Sex	0.597
Female	
Male	
Ki-67 labeling index	0.042*
>0.15	
<0.15	
Laterality	0.750
Left	
Right	
Bilateral	
Anatomical localization	0.006*
Frontal	
Temporal	
Parietal	
Occipital	
Insular	
Multifocality	0.250
Unifocal	
Multifocal	
Pathological diagnosis (WHO grade)	<0.001*
Oligodendroglioma (II)	
Oligodendroglioma (III)	
Astrocytoma (II)	
Astrocytoma (III)	
Oligoastrocytoma (II)	
Oligoastrocytoma (III)	
GBM	
WHO group	<0.001*
Oligodendroglial	
Astrocytic	
Oligoastrocytic	
GBM	
WHO grade	<0.001*
II	
III	
IV	
IDH-mut status	<0.001*
Mutated	
Wild type	
TERTp-mut status	0.026*
Mutated	
Wild type	
1p/19q codeletion status	0.005*
Codeleted	
Non-codeleted	

CONTINUED IN NEXT COLUMN »

» CONTINUED FROM PREVIOUS COLUMN

TABLE 2. Multivariate analysis of 13 variables for overall survival

Variable	p Value
H3F3A-mut status	0.283
Mutated	
Wild type	

* Significant result.

(TERTp-mut)¹⁷ rank first among regulatory mutations in cancer.²⁰ The telomere-lengthening process in most gliomas depends on either TERTp-mut or ATRX mutations (ATRX-mut), and these oncogenic changes are, in most cases, mutually exclusive.¹¹ Analyzing our surgical cohort, we identified several clinical correlations of TERTp-mut. The mutations were present in more than half (52.7%) of the patients. When TERTp-mut were present, they were present homogeneously within the tumor but not present in the surrounding normal-appearing brain parenchyma. The TERTp-mut status of a tumor did not change over time, or in recurrences, despite adjuvant therapies. These observations led us to the hypothesis that TERTp-mut are an early clonal event and hence part of an oncogenic program that is indispensable for the formation and maintenance of the glioma.

In analyzing our cohort, we also noted that the clinical behavior that could be attributed to the presence of a TERTp-mut was context dependent and relied on the IDH-mut status. In IDH-mut gliomas, TERTp-mut correlated very well with the 1p/19q codeletion, which is considered synonymous with oligodendrogliomas. In IDH-wt gliomas, however, TERTp-mut tumors were associated universally with demographic, molecular, and clinical characteristics long associated with pGBMs. As the TERTp-mut-associated clinical behavior was reciprocal, in IDH-mut and IDH-wt gliomas we classified all HDGs (WHO Grades II–IV) into 4 molecular subsets based on IDH-mut and TERTp-mut statuses (Fig. 3). These molecular subsets differed in various aspects, including age of onset, anatomical localization, degree of anaplasia, oncogenic molecular changes, and clinical behavior. Although these molecular groups differed in the degree of observed anaplasia (WHO grade), there was a significant discrepancy between the histopathological group and the molecular subsets. Therefore, we decided to stay blinded to the histopathologic group (WHO groups, astrocytic and oligodendroglial tumors, GBMs).

Most of the Double-Mutant HDGs Are Oligodendrogliomas With 1p/19q Codeletions

The association between TERTp-mut and oligodendrogliomas was almost exclusive when oligodendrogliomas were defined with the presence of IDH-mut and 1p/19q codeletions.¹⁶ All of the 52 IDH-mut 1p/19q-codeleted HDGs and 0 of the 57 IDH-mut, ATRX-mut, and TERTp-wt HDGs carried TERTp-mut at initial presentation. However, there was a minority in the double-mutant subset that were not 1p/19q codeleted and made up 1.8% of all IDH-

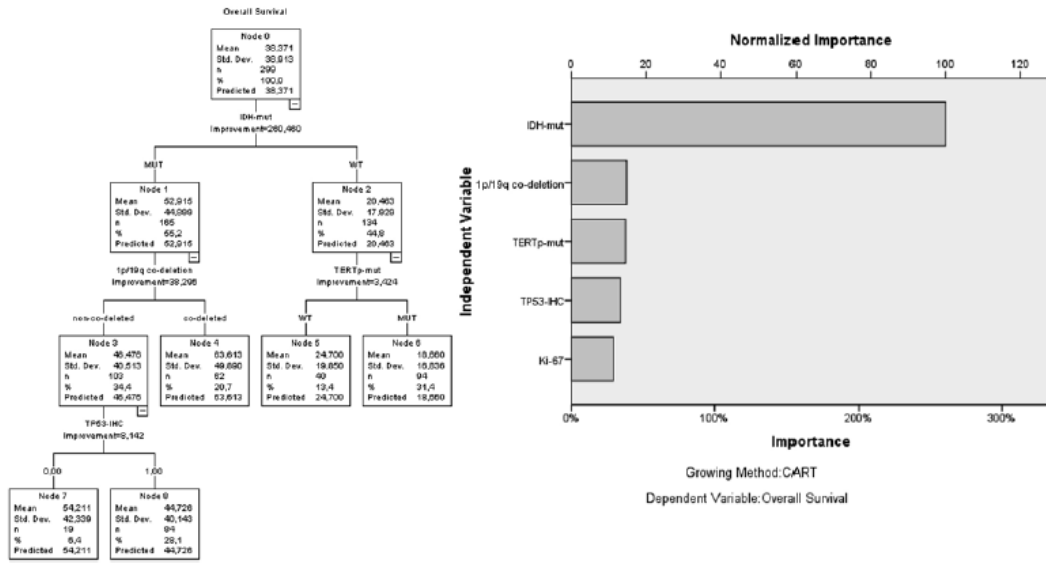


FIG. 6. Unsupervised CART analysis based on overall survival was performed with data from 299 unique patients. 1p/19q co-deletion and p53 statuses were identified as significant indicators in IDH-mut tumors. One should consider that in this cohort, all 1p/19q-co-deleted tumors also included TERTp-mut and that 96.3% of patients in the double-mutant subset carried the 1p/19q co-deletion. Compared with IDH-mut status, the predictive power of each of the significant variables is small but significant, as indicated by the "normalized importance."

mut HDGs and 3.9% of the double-mutant tumors. In a large series reported by Eckel-Passow et al.,⁷ such double-mutant but not 1p/19q-noncodeleted tumors made up 7.9% of all IDH-mut HDGs and 18.8% of the double-mutant tumors. The same authors reported that the TERT-mut and

IDH-mut tumors were not prognostically different from the triple-positive tumors.⁹ This group of tumors needs further clinical analysis and evaluation to conclude whether double-mutant tumors are different from IDH-mutant and TERTp-mut tumors.

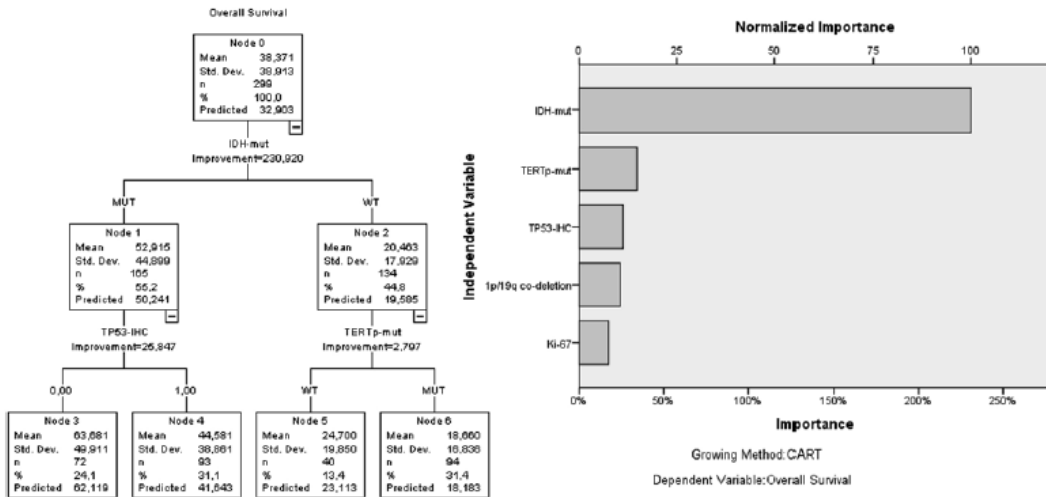


FIG. 7. The same unsupervised CART analysis based on overall survival analysis, as shown in Fig. 6, was performed with patient age and WHO grade as covariates and yielded very similar findings.

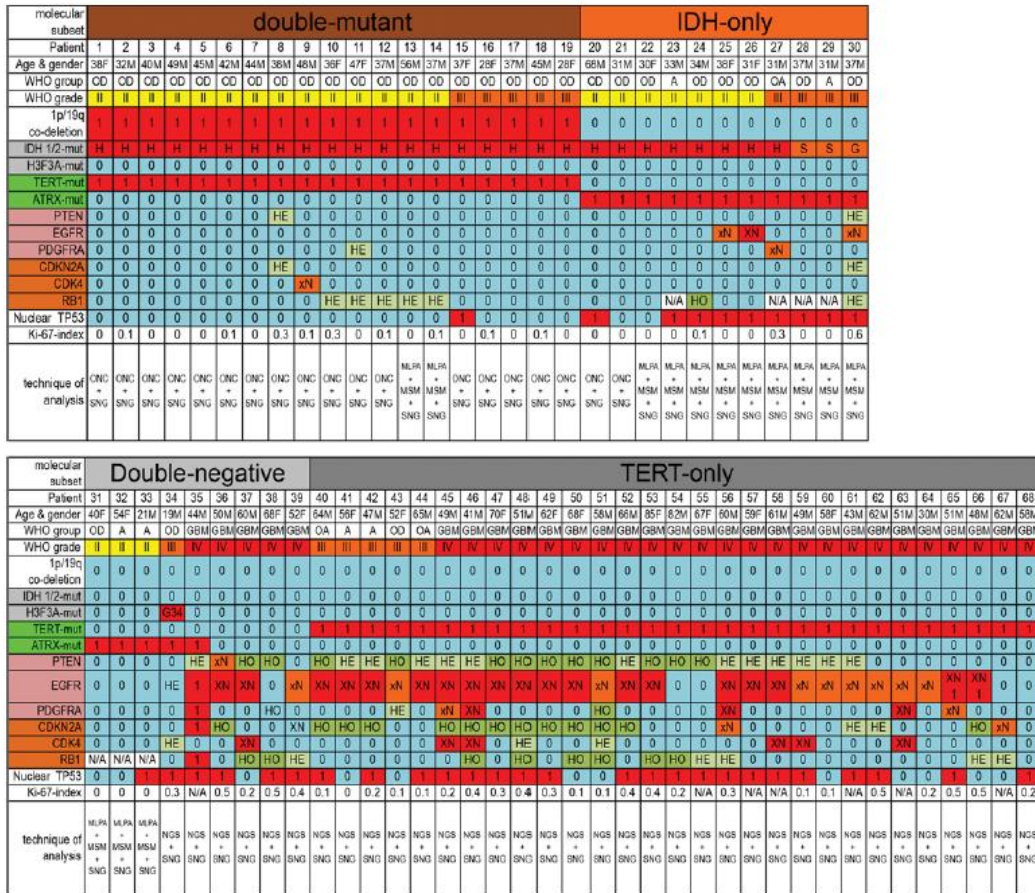


FIG. 8. This heatmap plots the IDH, TERT, H3.3, and ATRX mutational statuses against most common tyrosine-kinase receptor pathway changes (PTEN, EGFR, and PDGFRA) and key cell-cycle regulators (CDKN2A, CDK4, and RB1) in 68 patients with HDGs. WHO group, WHO grade, TP53 and Ki-67 index statuses, age, and survival data were also included to create a more comprehensive picture. IDH-mut tumors had few tyrosine-kinase or cell-cycle regulator changes. No EGFR, PDGFRA, or PTEN mutations were observed in IDH-mut tumors. Only EGFR amplification events were observed in IDH-mut tumors, and they were in the IDH-only subset. The TERT-only subset had the highest incidences of EGFR, PTEN, and cell-cycle regulator changes. At least 4 oncogenic profiles were noted in the double-negative group, which consisted of an ATRX-mut profile that resulted in good overall survival, an ATRX-mut and H3.3 mutant profile that resulted in extremely poor survival, an ATRX-mut profile with receptor tyrosine kinase and PTEN changes that resulted in poor survival, and an ATRX wild-type profile that again resulted in poor survival. This heatmap is meant to be seen as a proof of principle for the fact that the 4 molecular subsets carry different oncogenic profiles, but it does not show a comprehensive analysis. A = astrocytoma; G = IDH1-R132G mutation present; G34 = H3.3-G34V mutation present; H = IDH1-R132H mutation present; HE = heterozygous deletion; HO = homozygous deletion; N/A = not available; OA = oligoastrocytoma; OD = oligodendroglioma; ONC = Affymetrix-OncoScan analysis; MSM = microsatellite marker analysis; NGS = next-generation sequencing; S = IDH1-R132S mutation present; SNG = Sanger sequencing; xN = low-level amplification; XN = high-level amplification.

The Double-Mutant and IDH-Only Groups Differ in Many Respects

In our cohort, we found demographic, anatomical, clinical, and molecular differences between the double-mutant and IDH-only subsets. Both IDH-mut glioma subsets presented most commonly for clinical attention in

the 4th decade of life, but the double-mutant tumors were diagnosed approximately 5 years later than those in the IDH-only subset. Double-mutant tumors had a very strong predilection for the frontal lobe, whereas IDH-only tumors were located most commonly around the sylvian fissure in the frontal, insular, or temporal lobes (in decreasing

order of frequency) (Fig. 4). More than two-thirds of the insular gliomas were in the IDH-only subset. This finding is supported by the previously reported rarity of 1p/19q codeletions in insular gliomas.⁹ Among all 4 subsets, the double-mutant tumors resulted in the best prognoses, and only within this group was there no correlation between WHO grade and overall survival or between WHO grade and the proliferative index. Overall survival was longer in the double-mutant subset than in the IDH-only subset, despite the short median follow-up time of 42 months. In this cohort, non-R132H IDH-mut were observed more commonly in the IDH-only subset. The higher percentage of nuclear TP53 expression we observed in the IDH-only subset compared with that of the double-mutant subset is in parallel with results in the published literature.^{2,3,19} EGFR, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), and PTEN changes (mutations and/or copy-number changes), which are characteristic of pGBMs, were uncommon in IDH-mut gliomas in our cohort, which is consistent with results in previous literature.^{11,14,15} We found no EGFR mutations in IDH-mut tumors, but EGFR amplifications were seen in approximately one-fourth of the IDH-only subset tumors. No PTEN mutations were noted in any of the 2 IDH-mut subsets, and copy-number losses were also uncommon. These results might be explained by previous reports of epigenetic deregulation of the PTEN tumor suppressor gene.²¹

The TERT-Only Subset Was Correlated With the Worst Prognosis Among HDGs Independent of WHO Grade

This and other studies have indicated a high incidence of TERTp-mut in pGBMs.^{4,10-12} Our findings also established TERT-only HDGs as a subset with molecular and clinical characteristics of pGBMs regardless of the histopathology or WHO grade. Only a minority (14%) of the TERT-only HDGs were WHO Grade II or III, and these tumors were similar to their WHO Grade IV counterparts in age at presentation, Ki-67 index, overall survival, and oncogenic changes. This finding is consistent with the well-established fact that a significant proportion of WHO Grade II and III gliomas have genetic alterations and clinical courses similar to those of GBMs.^{3,16} Age is a bad prognosticator for gliomas of all histopathologies and WHO grades.¹⁷ Patients in the TERT-only subset were a median of 2 decades older than those with IDH-mut gliomas and 1 decade older than those in the double-negative subset (Figs. 3 and 4). In the TERT-only subset, the age at presentation, the Ki-67 proliferative index, and overall survival were not significantly different at different WHO grades. Among patients with a WHO Grade IV tumor, those in the TERT-only molecular subset fared worst, with a median overall survival of 21 months; a shorter survival rate was found only in patients with H3.3 mutant adult gliomas, which made up a small fraction of the double-negative tumor subset.¹⁸ Previous studies reported poor prognosis for those with GBMs that have TERTp-mut.^{10,13} Our findings indicate that this is not limited to GBMs; carriers of IDH-wt and TERTp-mut are present among diffuse gliomas of all WHO grades, and these tumors persistently result in the worst survival among patients with gliomas of the same WHO grade (Fig. 5). The molecular findings in this

TERT-only subset are consistent with the well-established molecular characteristics of pGBMs (with EGFR changes in 86.2%, PTEN changes in 75.9%, and at least 1 change in 1 of the key cell-cycle regulators [CDKN2A, CDK4, or RB1] in 75.9% of tumors). These findings support the notion that regardless of the histopathology and WHO grade, the IDH-wt TERTp-mut signature is correlated with high risk.

The remainder of the IDH-wt gliomas were wild type for both IDH and TERTp and, hence, double negative. These tumors were heterogeneous in their clinical and molecular biological characteristics, which is a hint that this group was composed of a mixture of tumors with various oncogenic programs (Fig. 8). Although most double-negative tumors resulted in a poor prognosis, there were also subsets that resulted in a very favorable prognosis among patients with double-negative HDGs; therefore, we believe that all IDH-wt gliomas should not be lumped together.

Clinical Significance of the Molecular Subsets

The combination of IDH-mut and TERTp-mut statuses turns out to be a good predictor of individual tumor biology. The resulting 4 molecular subsets differed from each other in many respects, as described above. Most important is that these 4 molecular subsets were statistically different in their prognoses, which makes these clinical subsets clinically significant (Fig. 5). Our findings are in parallel with those of other reports previously published by independent groups.^{7,10,14} Similarly, multivariate analysis confirmed TERTp-mut as an independent and significant variable (Table 2), despite the fact that TERTp-mut are associated with reciprocal clinical behavior in relation to IDH-mut status (i.e., better survival for patients with IDH-mut and worse survival in those with IDH-wt tumors). Furthermore, unsupervised CART analyses (with overall survival the end point) revealed that TERTp-mut is a significant variable among IDH-wt gliomas (Fig. 6), which held true when age and the degree of anaplasia (WHO grade) were calculated as confounding variables (Fig. 7). It was also reassuring to find that most of the nodes confirmed as significant in these unsupervised decision-tree analyses are well-known biomarkers of gliomas that are associated with specific clinical pictures (Fig. 7).

It is not the intent of this molecular grouping to test or replace the current histopathological classification scheme or to devalue the need for sophisticated molecular profiling of gliomas; rather, we sought only to provide a simple, fast, inexpensive, and reliable means to guide daily practice. Because both TERTp-mut and IDH-mut are gain-of-function mutations (at a few hotspots), they can be demonstrated more reliably and easily than copy-number variations such as the 1p/19q codeletions. Both IDH-mut and TERTp-mut are stable mutations (and hence not lost or gained over the course of the disease), and because both mutations are found diffusely within tumors, they are easy to test using molecular biological means in daily practice and yield reliable and reproducible results. As an example, TERTp-mut reconfirm the presence of 1p/19q codeletions, because all 1p/19q-codeleted tumors also have TERTp-mut.

Conclusions

Four molecular subsets can be defined among HDGs by testing for IDH-mut and TERTp-mut. These subsets have distinct demographic, anatomical, clinical, and prognostic correlations, which makes such classification clinically useful.

Acknowledgments

We are grateful to our patients for contributing to this study. This work has been supported by grant number 112-S-149 from TUBITAK (Scientific and Technological Research Council of Turkey) to Dr. Özduman.

References

- Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, et al: Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol* 126:267–276, 2013
- Bai H, Harmançı AS, Erson-Omay EZ, Li J, Coşkun S, Simon M, et al: Integrated genomic characterization of IDH1-mutant glioma malignant progression. *Nat Genet* 48:59–66, 2016
- Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, et al: Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med* 372:2481–2498, 2015
- Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounsh-mehr H, Salama SR, et al: The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477, 2013
- Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068, 2008
- Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al: Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* 164:550–563, 2016
- Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al: Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *N Engl J Med* 372:2499–2508, 2015
- Erson-Omay EZ, Çağlayan AO, Schultz N, Weinhold N, Omay SB, Özduman K, et al: Somatic POLE mutations cause an ultramutated giant cell high-grade glioma subtype with better prognosis. *Neuro Oncol* 17:1356–1364, 2015
- Gozé C, Rigau V, Gibert L, Maudelonde T, Duffau H: Lack of complete 1p19q deletion in a consecutive series of 12 WHO grade II gliomas involving the insula: a marker of worse prognosis? *J Neurooncol* 91:1–5, 2009
- Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA, et al: Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* 5:1515–1525, 2014
- Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettgowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, et al: TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6021–6026, 2013
- Koelsche C, Sahn F, Capper D, Reuss D, Sturm D, Jones DT, et al: Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 126:907–915, 2013
- Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano AL, Rahimian A, Rossetto M, et al: Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology* 83:1200–1206, 2014
- Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, et al: TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer* 111:2024–2032, 2014
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109, 2007
- Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al: International Society Of Neuropathology–Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 24:429–435, 2014
- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al: The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol* 16:896–913, 2014
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al: Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22:425–437, 2012
- Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, et al: Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* 47:458–468, 2015
- Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W: Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet* 46:1160–1165, 2014
- Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, Tihan T, Vandenberg S, Tamgüney T, et al: Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro Oncol* 9:271–279, 2007

Disclosures

Dr. von Deimling is a patent holder in Ventana/Roche and DIANOVA.

Author Contributions

Conception and design: Özduman. Acquisition of data: Özduman, Akyerli, Yüksel, Can, Erson-Omay, Oktay, Ülgen, Erdemgil, Sav, Günel, Yakıcıer, Pamir. Analysis and interpretation of data: Özduman, Akyerli, Yüksel, Can, Oktay, Coşgun, Ülgen, von Deimling, Günel, Yakıcıer. Drafting the article: Özduman, Akyerli. Critically revising the article: Özduman, Akyerli, Yüksel, Can, Oktay, Coşgun, von Deimling, Günel. Reviewed submitted version of manuscript: all authors. Approved the final version of the manuscript on behalf of all authors: Özduman. Statistical analysis: Özduman, Coşgun. Administrative/technical/material support: Özduman, Erson-Omay, Erdemgil, Sav, Yakıcıer, Pamir. Study supervision: Özduman, Akyerli, Oktay, Yakıcıer, Pamir.

Correspondence

Koray Özduman, Acibadem University School of Medicine, Department of Neurosurgery, İnönü Cad. Okur Sok. No. 20 Kozyatagi, İstanbul 34742, Turkey. email: koray.ozduman@icloud.com.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şirin	Soyadı	Yüksel Kılıçturgay
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	13. 03. 1980
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	
E-mail	sirinyuksel@gmail.com	Tel	05324433564

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans	2013
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2003
Lise	Özel Üsküdar Amerikan Lisesi	1998

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Öğretim Görevlisi	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2015 -
2. Moleküler Biyolog	Acıbadem Sağlık Grubu Genetik Tanı Merkezi	2003 - 2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	YDS*	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	78,750 (2013)							

* YDS: ÖSYM - Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı.

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (Mayıs 2013)	73,87846	73,95580	64,47710
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint)	İyi
DNASTAR	Çok iyi
EndNote	İyi
SPSS	İyi

ULUSLARARASI YAYINLAR

Peker-Eyüboğlu İ, Yenmiş G, Bingöl EN, **Yüksel S**, Tokat F, Özbek P, Güllü Amuran G, Yakıcıer C, Akkiprik M. Next-Generation Sequencing Identifies *BRCA1* and/or *BRCA2* Mutations in Women at High Hereditary Risk for Breast Cancer with Shorter Telomere Length. *OMICS* 2020; 24(1):5-15.

Dalva-Aydemir, S, Akyerli, CB, **Yüksel, SK**, Keskin, H, Yakıcıer, MC. Towards In Vitro Epigenetic Drug Design for Thyroid Cancer: The Promise of PF-03814735, an Aurora Kinase Inhibitor. *OMICS* 2019; 23(10):486-495.

Yüksel S, Boylu Akyerli C, Cengiz Yakıcıer M. Angiogenesis, Invasion, and Metastasis Characteristics of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointest Cancer* 2017; 48(3):256-259.

Akyerli CB, **Yüksel S**, Can Ö, Erson-Omay EZ, Oktay Y, Coşgun E, Ülgen E, Erdemgil Y, Sav A, von Deimling A, Günel M, Yakıcıer MC, Pamir MN, Özduvan K. Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas. *J Neurosurg* 2017; 16:1-13.

Çöllü M, **Yüksel S**, Şirin BK, Abbasoğlu L, Alanay Y. Is 1p36 deletion associated with anterior body wall defects? *Am J Med Genet A* 2016; 170(7):1889-94.

Oktay Y, Ülgen E, Can Ö, Akyerli CB, **Yüksel S**, Erdemgil Y, Durası IM, Henegariu OI, Nanni EP, Selevsek N, Grossmann J, Erson-Omay EZ, Bai H, Gupta M, Lee W, Turcan Ş, Özpınar A, Huse JT, Sav MA, Flanagan A, Günel M, Sezerman OU, Yakıcıer MC, Pamir MN, Özduvan K. IDH-mutant glioma specific association of rs55705857 located at 8q24.21 involves MYC deregulation. *Sci Rep* 2016; 6:27569.

Bayraklı F, Poyrazoğlu HG, **Yüksel S**, Yakıcıer C, Erguner B, Sagirolu MS, Yuceturk B, Ozer B, Doganay S, Tanrikulu B, Seker A, Akbulut F, Ozen A, Per H, Kumandas S, Altuner Torun Y, Bayri Y, Sakar M, Dagcinar A, Ziyal I. Hereditary spastic paraplegia with recessive trait caused by mutation in *KLC4* gene. *J Hum Genet* 2015; 60(12):763-8.

Bayri Y, Soylemez B, Seker A, **Yüksel S**, Tanrikulu B, Unver O, Canbolat C, Sakar M, Kardag O, Yakıcıer C, Dagcinar A, Ziyal I, Bayraklı F. Neural tube defect family with recessive trait linked to chromosome 9q21.12-21.31. *Childs Nerv Syst* 2015; 31(8):1367-70.

Bayraklı F, Guclu B, Yakıcıer C, Balaban H, Kartal U, Erguner B, Sagirolu MS, **Yüksel S**, Oztürk AR, Kazancı B, Ozum U, Kars HZ. Mutation in *MEOX1* gene causes a recessive Klippel-Feil syndrome subtype. *BMC Genet* 2013; 14:95.

Unalp A, Altıok E, Uran N, Oztürk A, **Yüksel S**. Novel mutation of aspartoacylase gene in a Turkish patient with Canavan disease. *J Trop Pediatr* 2008; 54(3):208-210.

Altıok E, Taylan F, Yenen OS, Demirköser G, Bozacı M, Onel D, Akcadag B, Iyisan AS, Ciblak M, Bozkaya E, **Yüksel S**, Badur S. Mutations in influenza A virus (H5N1) and possible limited spread, Turkey, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(3):491-2.

ULUSLARARASI ve ULUSAL BİLDİRİLER

Ozduman K, Yüksel SK; Akyerli CB, Bilguvar K, Ersen-Danyeli A, Yılmaz E, Pamir MN (2020) *Sözlü sunum* - IDH-Mutant Gliomas Differ in Distribution of Mitochondrial Genomic Alterations. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 88th Annual Scientific Meeting, Boston, ABD.*

Ozduman K, Akyerli CB, Yapıcıer O, Cosgun E, Yakıcıer MC, **Yüksel S**, Dincer A, Can O, Pamir MN (2017) *Sözlü sunum* - Surgical Outcome of Adult Hemispheric Glioblastoma is Determined by the Molecular-Subset: An Analysis of 142 Patients. *J Neurosurg* 126(4): A1419-A1419. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 85th Annual Scientific Meeting, Los Angeles, ABD.*

Özduman K, Oktay Y, **Yüksel S**, Akyerli C, Can Ö, Ülgen E, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Flanagan A, Yakıcıer MC, Pamir MN (2015) *Poster sunumu* – Increased risk of gliomas in rs55705857 risk-allele carriers may be explained by immune mechanisms. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 83rd Annual Scientific Meeting, Washington DC, ABD.*

Akyerli C, **Yüksel S**, Can O, Oktay Y, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav A, Yakıcıer C, Pamir MN, Ozduman K (2014) *Poster sunumu* - Proteomic correlation of telomerase mutations in gliomas. *65th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery, Dresden, ALMANYA.*

Can O, Mutlu A, **Yüksel S**, Oktay Y, Akyerli C, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav A, Yakıcıer C, Pamir MN, Ozduman K (2014) *Poster sunumu* - Analysis of the effect of 1p/19q co-deletions in WHO grade-II oligodendrogliomas. *65th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery, Dresden, ALMANYA.*

Yüksel S, Akyerli C, Oktay Y, Can Ö, Özpınar A, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN, Özduman K (2014) *Poster sunumu* - Copy number analysis of low-grade gliomas reveals highly prevalent haploinsufficiency for p53. *7. Multidisipliner Nöroonkoloji Sempozyumu, İstanbul, TÜRKİYE.*

Akyerli C, **Yüksel S**, Can Ö, Oktay Y, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN, Özduman K (2014) *Poster sunumu* - Oncogenic changes beyond the intraoperative-MRI determined T2-hyperintense tumor border in gliomas. *7. Multidisipliner Nöroonkoloji Sempozyumu, İstanbul, TÜRKİYE.*

Akyerli C, Can Ö, **Yüksel S**, Oktay Y, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN, Özduman K (2014) *Poster sunumu* - Analysis of hTERT promoter

mutations in gliomas and its relation to oncogenic mutations and copy number changes. 7. *Multidisipliner Nöroonkoloji Sempozyumu, İstanbul, TÜRKİYE.*

Can Ö, Oktay Y, Akyerli C, **Yüksel S**, Albayrak N, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN, Özduman K (2014) *Poster sunumu* – Do oncogenic changes differ according to anatomic localization in low-grade gliomas? 7. *Multidisipliner Nöroonkoloji Sempozyumu, İstanbul, TÜRKİYE.*

Can Ö (Davetli konuşmacı), Akyerli C, **Yüksel S**, Oktay Y, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav A, Yakıcıer C, Pamir MN, Özduman K (2014) *Sözlü sunum* - Tumor biomarker research in neuroscience: Application to brain tumors. *International Workshop on MS-Based Proteomics Bioinformatics and Health Informatics, İzmir, TÜRKİYE.*

Özduman K, Akyerli C, **Yüksel S**, Can Ö, Oktay Y, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN (2014) *Sözlü sunum* – An analysis for the role of telomerase (hTERT) promoter mutations in gliomagenesis. *J Neurosurg* 122(6): A1563-A1564. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 82nd Annual Scientific Meeting, San Fransisco, ABD.*

Özduman K, Akyerli C, **Yüksel S**, Can Ö, Oktay Y, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN (2014) *Poster sunumu* – Correlation of hTERT promoter mutations in gliomas with other oncogenic changes. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 82nd Annual Scientific Meeting, San Fransisco, ABD.*

Özduman K, Oktay Y, **Yüksel S**, Akyerli C, Can Ö, Ülgen E, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN (2014) *Poster sunumu* – Analysis of molecular mechanisms attributable to glioma predisposition caused by rs55705857 at 8q24.21. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 82nd Annual Scientific Meeting, San Fransisco, ABD.*

Özduman K, Can Ö, Mutlu A, **Yüksel S**, Oktay Y, Akyerli C, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpınar A, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN (2014) *Poster sunumu* – Differential protein expression of 1p/19q co-deletions in oligodendrogliomas. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 82nd Annual Scientific Meeting, San Fransisco, ABD.*

Özduman K, Tezcanli E, Mutlu A, **Yüksel S**, Akyerli C, Şengöz M, Sav MA, Yakıcıer MC, Pamir MN (2014) *Poster sunumu* – Differential analysis of oncogenic molecular changes in insular gliomas and their impact on patient outcome. *American Association of Neurological Surgeons (AANS) 82nd Annual Scientific Meeting, San Fransisco, ABD.*

Oktay Y, Akyerli C, Fındık S, **Yüksel S**, Mutlu A, Ülgen E, Sun Hİ, Yakıcıer MC, Pamir MN, Sav MA, Özduman K (2013) *Poster sunumu* – Polymorphism at 8q24.21 is associated with increased risk for low-grade gliomas in the Turkish Population. *Gordon Research Conference “Cancer Genetics and Epigenetics”, Barga, İTALYA.*

Yüksel S. Oktay Y, Akyerli C, Mutlu A, Çiçek EA, Akın A, Ülgen E, Fındık S, Yakicier MC, Sav MA, Pamir MN, Özduvan K (2013) *Poster sunumu* – Polymorphism at 8q24.21 is associated with increased risk for low-grade gliomas but not for other systemic cancers in the Turkish Population. 6. *Multidisipliner Nöroonkoloji Sempozyumu, İstanbul, TÜRKİYE.*

Akyerli C, **Yüksel S.** Can Ö, Oktay Y, Nanni P, Selevsek N, Grossmann J, Özpinar A, Sav MA, Yakicier MC, Pamir MN, Özduvan K (2013) *Poster sunumu* – Analysis of hTERT promoter mutations in gliomas. 6. *Multidisipliner Nöroonkoloji Sempozyumu, İstanbul, TÜRKİYE.*

Yüksel S. Taylan F, Yenmiş G, Özciğer D, Çınar D, Altıok E (2009) *Sözlü sunum* - Osteogenesis İmperfekta hastalığından sorumlu yeni mutasyonların tanımlanması ve koruyucu genetik tanıları. 5. *Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu (Endokrin Hastalıklar ve Genetik), Abant, TÜRKİYE.*

Yüksel S. Taylan F, Yenmiş G, Özciğer D, Çınar D, Altıok E (2009) *Poster sunumu* - Importance of External Quality Control Management in Molecular Hematology. 35. *Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, TÜRKİYE.*

Yenmiş G, **Yüksel S.** Taylan F, Özciğer D, Çınar D, Altıok E (2009) *Poster sunumu* - Differences in prevalence of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. 35. *Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, TÜRKİYE.*

Yüksel S. Taylan F, Ünsal İ, Altıok E (2006) *Poster sunumu* - Rapid testing of embryo, CVS and amniotic fluid samples for beta thalassemia mutations by real time PCR and melting curve analysis. *European Human Genetics Conference (ESHG), Amsterdam, HOLLANDA.*

Taylan F, **Yüksel S.** Altıok E (2005) *Poster sunumu* - HLA match test by real time PCR in buccal cheek swabs increase the feasibility for reaching higher number of donors. *European Human Genetics Conference (ESHG), Prag, ÇEK CUMHURİYETİ.*

Yüksel S. Taylan F, Ünsal İ, Altıok E (2005) *Poster sunumu* - Rapid prenatal testing of beta thalassemia mutations by real time fluorescent PCR and melting curve analysis. 30. *Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, TÜRKİYE.*

Taylan F, **Yüksel S.** Ünsal İ, Altıok E (2005) *Poster sunumu* - Rapid HLA match testing by real time fluorescent PCR and melting curve analysis from buccal cheek swabs may increase the number of available donors. 30. *Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, TÜRKİYE.*

Altıok E, Taylan F, **Yüksel S.** Demirel C, Dönmez E, Bahçeci M, Tuncer M, Okur H, Ünsal İ, Demirkeser G (2005) *Poster sunumu* - Genetic selection of HLA compatible and disease free embryos for hematopoietic stem cell transplantations. 30. *Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, TÜRKİYE.*

MESLEKİ DENEYİM

	Verilen Bölüm	Verilen Ders	Verildiği Dönem
1.	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (3. sınıf)	MBG 305 - Research Techniques in Biochemistry and Genetics I	2019 – 2020 Güz 2018 – 2019 Güz 2017 – 2018 Güz
2.	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (3. sınıf)	MBG 306 - Research Techniques in Biochemistry and Genetics II	2018 – 2019 Bahar

