

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik
Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade
Örüntüsünün Araştırılması**

BURCU ÖZÇİMEN

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

DEU.HSI.MSc-2010970093

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik
Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade
Örüntüsünün Araştırılması**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

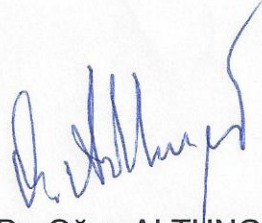
BURCU ÖZÇİMEN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

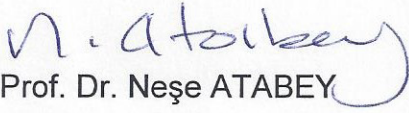
(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından KB.
SAG.2012.051sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970093

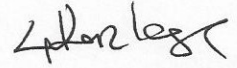
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Burcu ÖZÇİMEN 'Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade Örüntüsünün Araştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini 01.08.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ
BAŞKAN



Prof. Dr. Neşe ATABEY
ÜYE



Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA
ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Sefa KIZILDAĞ
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	iv
Tablolar.....	vi
Şekiller.....	vii
Kısaltmalar.....	vii
Teşekkür.....	ix
ÖZET.....	10
ABSTRACT.....	12
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER.....	16
2.1. Nöroblastom'un Tarihçesi.....	16
2.2. Nöroblastomun Epidemiyolojisi.....	17
2.2.1. Nöroblastom Yatkınlığı ve Genetiği.....	18
2.2.1.1. Ailesel Nöroblastom.....	18
2.2.1.2. Sporadik Nöroblastom.....	18
2.3. Nöroblastom'un Biyolojik ve Genetik Özellikleri.....	19
2.4. Epigenetik Faktörler.....	22
2.4.1. Kanser ve Epigenetik.....	23
2.4.1.1. DNA metilasyonu.....	23
2.4.1.2. Histon Metilasyonu.....	28
2.4.1.3. Histon Asetilasyonu.....	30
2.4.1.4. Histon Ubiquitinasyonu.....	32
2.4.1.5. Histon Fosforilasyonu.....	32
2.4.2. Nöroblastom ve Epigenetik.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Araştırmanın Tipi.....	35
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	35
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	35
3.4. Çalışma Materyali.....	35
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	36
3.6. Veri Toplama Araçları.....	37
3.6.1. Kullanılan Cihazlar.....	37
3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler.....	38

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	38
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	39
3.8.1. Hücre Hattı Seçimi	39
3.8.1.1. KELLY Hücre Hattı:	39
3.8.1.2. SIMA Hücre Hattı:	39
3.8.1.3. IMR-32 Hücre Hattı:	39
3.8.1.4. MHH-NB-11 Hücre Hattı:	40
3.8.1.5. CHP-126 Hücre Hattı:	40
3.8.1.6. SH-SY5Y Hücre Hattı:	41
3.8.1.7. SK-N-AS Hücre Hattı:	41
3.8.2. Hücre Kültürü	42
3.8.2.1. Hücre Çözme Protokolü	42
3.8.2.1.1. Yapışkan Hücre Hattı Pasaj Protokolü	44
3.8.2.1.2. Süspanse Hücre Hattı Pasaj Protokolü	44
3.8.3. RNeasy mini kit ile hayvan hücresinden RNA izolasyonu	46
3.8.4. RT First Strand Kit ile cDNA sentezi	48
3.8.5. RT ² Profiler PCR Dizin için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	49
3.8.6. Verilerin Değerlendirilmesi	50
3.8.6.1. $\Delta\Delta CT$ Yöntemi İle Verilerin Değerlendirilmesi	50
3.8.6.2. MYCN Transkripsiyon Faktörü ile İlgili Genler Arasındaki İlişkinin JASPAR Veritabanı Aracılığı ile Araştırılması	53
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	56
3.10. Etik Kurul Onayı	57
4. BULGULAR	58
4.1. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunda elde edilen bulgular	58
4.2. JASPAR Veritabanı ile MYCN Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Analizi ..	80
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
7. KAYNAKLAR	94
8. EKLER	121

TABLÖLER

Tablo 1: Projede kullanılan mevcut makine-teçhizat listesi	37
Tablo 2: Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler	38
Tablo 3: Araştırmanın öngörülen çalışma süresi	38
Tablo 4: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler ve miktarları	42
Tablo 5: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler ve miktarları	42
Tablo 6: Gerçek zamanlı PCR analizi için hazırlanan karışım	49
Tablo 7: Rotor-Gene Q cihazı için uygun döngü profili	50
Tablo 8: Genlerin delta(Ct) değerleri ve standart sapmaları	59
Tablo 9: SK-N-AS hücre hattına ait kat düzenlemesi değerleri.....	63
Tablo 10: Hücre Hatlarına ait delta(Ct) değerleri ve standart sapmaları.....	65
Tablo 11: KELLY hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri.....	70
Tablo 12: SIMA hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri	73
Tablo 13: MHH-NB-11 hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri	75
Tablo 14: IMR-32 hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri	77
Tablo 15: CHP-126 hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri	79
Tablo 16: AURKB genine ait birinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.	80
Tablo 17: AURKB genine ait ikinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.	80
Tablo 18: ESCO2 genine ait birinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.	81
Tablo 19: ESCO2 genine ait ikinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.	81
Tablo 20: HDAC2 genine ait promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.....	82
Tablo 21: RNF2 genine ait promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.....	83

ŞEKİLLER

Şekil 1: RT2 Profiler PCR dizin R Formatı.....	58
Şekil 2: <i>MYCN</i> amplifiye hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği.....	62
Şekil 3: KELLY hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği.	69
Şekil 4: SIMA hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği.	72
Şekil 5: MHH-NB-11 hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği.....	74
Şekil 6: IMR-32 hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği.	76
Şekil 7: CHP-126 hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği.....	78
Şekil 8: <i>AURKB</i> geninin insan genomundaki konumu	86
Şekil 9: <i>ESCO2</i> geninin insan genomundaki konumu	86
Şekil 10: <i>HDAC2</i> geninin insan genomundaki konumu	87
Şekil 11: <i>PRMT8</i> geninin insan genomundaki konumu	88
Şekil 12: <i>RNF2</i> geninin insan genomundaki konumu	90
Şekil 13: <i>HDAC9</i> geninin insan genomundaki konumu	91
Şekil 14: <i>NEK6</i> geninin insan genomundaki konumu	92

KISALTMALAR

ALK: Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

AURKB: Aurora kinase B

CIMP: CpG adacığı metilatör fenotipi

ESCO2: Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2

g: Yerçekimi ivmesi

HDAC2: Histone deacetylase 2

HDAC9: Histone deacetylase 9

LOH: Loss of heterozygosity

MYCN: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

NB: Nöroblastom

NEK6: NIMA-related kinase 6

PRMT8: Histone deacetylase 2

RB: Retinoblastom

RNF2: Ring finger protein 2

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki Lisansüstü eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Doç. Dr. Oğuz Altungöz'e;

Bilgi ve deneyimleri ile her konuda bana yardımcı olan, özellikle arkadaşlıklarıyla güzel bir çalışma ortamı sağlayan Elif Kutlu Özen, Özkan Bağcı ve Sait Tümer'e;

Eğitimim sırasında her zaman dayanağım olan, maddi manevi her anlamda hiçbir desteği esirgemeyen ve karşıma çıkan her türlü zorluğa göğüs germemi sağlayan babam Şerafet Özçimen'e, annem Nurdane Özçimen'e ve kardeşim Büşra Özçimen'e teşekkür ederim.

Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade Örüntüsünün Araştırılması

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
Balçova-İzmir
burcuozcimen@hotmail.com

ÖZET

Nöroblastom (NB) sempatik sinir sistemine farklılaşan nöral krest hücrelerinden köken alan embriyonik bir tümördür. Spontan remisyondan hızlı metastatik progresyona kadar varan farklı klinik davranışlar gösterir. NB, karyotipik açıdan segmental kromozom aberasyonları ile karakterizedir. Sık gözlenen reküran kromozom anomalileri 1 no'lu kromozomun kısa kolunda (1p) ve 11 no'lu kromozomun uzun kolunda (11q) gözlenen kayıplar; 17 no'lu kromozomun uzun kolundaki (17q) kazanımlardır. NB olgularının % 22'sinde *MYCN* geni amplifikasyonu ileri hastalık evresi, metastatik hastalık ve agresif klinik seyirle birliktelik göstermektedir. Ayrıca, 1p, 11q delesyonları ve 17q duplikasyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Buna karşın, söz konusu kromozom segmentlerinde, NB patogenezinde rol oynayan gen ya da genler bugüne kadar tanımlanamamıştır. Erişkin tümörlerinde gözlenen kanser genleri de NB tümörlerinde tutulum göstermemektedir.

Bu çalışmanın çıkış noktası NB'deki bu prognostik faktörlerin sitogenetik anomaliler haricinde başka etmenlere dayandırılabilmesi düşüncesidir. Günümüzde kanser üzerine yapılan araştırmalarda karsinogenez sürecinde epigenetik faktörlerin de rol oynadığının bulunması ve NB tümörlerinde bu tarz çalışmaların fazla olmaması, NB tümör fenotipindeki bu çeşitliliğe epigenetik faktörlerin neden olabileceği sorusunu doğurmuştur.

DNA metilasyonu normal gelişim sürecinde rol oynayan bir epigenetik faktördür ve metilasyon örüntüsünün bozulması karsinogenezde doğrudan rol oynamaktadır. Buna ek olarak histon modifikasyonlarının, protein komplekslerinin DNA'ya bağlanma sürecini olumlu ve olumsuz yönde etkiledikleri, bu sebeple genom üzerinde belirli bölgelerin gen ifadesinde artırıcı veya susturucu etkisi olduğu bilinmektedir.

Proje kapsamında epigenetik değişikliklere yol açan 84 tane genin ifade değişimleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri ile belirlenmiştir.

Analiz sırasında *MYCN* amplifikasyonu görülmeyen iki (2) adet NB hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifikasyonu gözlenen beş (5) adet NB hücre hattı üzerinde ilgili genlerin ifade değişimleri saptanmıştır.

$\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda, hedef grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 6.45 kat, *ESCO2* geninin ifadesinde 6.75 kat, *HDAC2* geninin ifadesinde 5.41 kat, *PRMT8* geninin ifadesinde 5.80 kat ve *RNF2* geninin ifadesinde 4.12 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *HDAC9* geninin ifadesinde 4.51 ve *NEK6* geninin ifadesinde ise 4.66 kat azalış gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Nöroblastom, epigenetik, gen ifadesi

Expression Profiles of the Genes that are Regulating Epigenetic Mechanisms in Neuroblastoma Cell Lines

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Medical Biology and Genetics,
Balcova-IZMIR,
burcuozcimen@hotmail.com

ABSTRACT

Neuroblastoma(NB) is an embryonic tumor originated from neural crest cells which are originated to sympathetic nervous system. The clinic feature of this tumor has a wide spectrum changing from spontaneous remission to metastatic progression. NB is characterized by segmental chromosome abnormalities. The most common recurrent chromosome abnormalities in NB tumors are the deletion of the short arm of the chromosome 1(1p), deletion of the long arm of the chromosome 11(11q) and addition of the long arm of the chromosome 17(17q). In the 22% of the NB cases, *MYCN* amplification is associated with advanced disease stage, metastasis and aggressive clinical behavior. Moreover, the deletions of 1p and 11q and the duplication of 17q are associated with poor prognosis. Nevertheless, there has not been any genes are detected in these chromosome segments that might play a role in NB pathogenesis. Also the cancer genes characterized in adult tumors are not involved in NB tumors.

The origin of this study is that, the prognostic factors of NB may arise from different factors rather than cytogenetic abnormalities. Nowadays, it is known that the epigenetic factors play role in cancer progression and there has been a limited study for the effect of the epigenetic mechanisms on NB development. This information led to the question that the diversity of NB tumor phenotypes can be caused by epigenetic factors.

DNA methylation is an epigenetic factor that plays a role in normal development process and the corruption of methylation patterns plays a direct role in carcinogenesis. In addition to this, it is known that the histone modifications regulate the binding of the protein complexes to DNA in a positive or negative manner, so that specific sites on the genome is said to have enhancing or silencing effects the gene expression.

In this project, the expression profiles of 84 genes involved in the epigenetic mechanism are detected by real time polymerase chain reaction analysis. Two (2)

MYCN-non-amplified cell lines were selected as control group and five (5) *MYCN*-amplified cell lines were analyzed in order to determine the gene expression profiles.

The relative gene expressions were calculated by $\Delta\Delta C_t$ formula and the results gained from the comparison of *MYCN*-non-amplified and *MYCN*-amplified cell lines demonstrated that there has been a 6.45-fold increase in *AURKB*, 6.75-fold increase in *ESCO2*, 5.41-fold increase in *HDAC2*, 5.80-fold increase in *PRMT8*, 4.12-fold increase in *RNF2*, 4.51-fold decrease in *HDAC9* and 4.66-fold decrease *NEK6* respectively.

Keywords: Neuroblastoma, epigenetics, gene expression

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöroblastom (NB) sempatik sinir sistemine farklılaşan nöral krest hücrelerinden köken alan embriyonik bir tümördür. Spontan remisyondan hızlı metastatik progresyona kadar varan farklı klinik davranışlar gösterir [1]. NB karyotipik açıdan segmental kromozom aberasyonları ile karakterizedir. Sık gözlenen reküran kromozom anomalileri 1 no'lu kromozomun kısa kolunda (1p) ve 11 no'lu kromozomun uzun kolunda (11q) gözlenen delesyonlar; 17 no'lu kromozomun uzun kolundaki (17q) kazanımlardır. NB olgularının % 22'sinde *MYCN* geni amplifikasyonu ileri hastalık evresi, metastatik hastalık ve agresif klinik seyirle birliktelik göstermektedir. Ayrıca, 1p, 11q delesyonları ve 17q duplikasyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir [2-4]. Buna karşın, söz konusu kromozom segmentlerinde NB patogenezinde rol oynayan gen ya da genler bugüne kadar tanımlanamamıştır. Erişkin tümörlerinde gözlenen kanser genleri de NB tümörlerinde tutulum göstermemektedir. Bu çalışmanın çıkış noktası, NB'deki bu genetik ve prognostik faktörlerin sitogenetik anomaliler haricinde başka etmenlere dayandırılabilceği düşüncesidir. Günümüzde kanser üzerine yapılan araştırmalarda epigenetik faktörlerin de rol oynadığının bulunması ve NB tümörlerinde bu tarz çalışmaların fazla olmaması, NB tümör fenotipindeki bu çeşitliliğe epigenetik faktörlerin neden olabileceği sorusunu doğurmuştur [5].

DNA metilasyonu normal gelişim sürecinde rol oynayan bir epigenetik faktördür ve metilasyon örüntüsünün bozulması karsinogenezde doğrudan rol oynamaktadır [6]. Buna ek olarak, histon modifikasyonlarının protein komplekslerinin DNA'ya bağlanma sürecini olumlu ve olumsuz yönde etkiledikleri, bu sebeple genom üzerinde belirli bölgelerin gen ifadesinde arttırıcı veya susturucu etkisi olduğu bilinmektedir [7].

Proje kapsamında:

- epigenetik değişimlere yol açan 84 tane genin gen ifadelerindeki değişimleri KELLY, SIMA, SHSY-5Y, SK-N-AS, CHP-126, IMR-32 ve MHH-NB-11 nöroblastom hücre hatları üzerinde araştırılıp, *MYCN*-amplifiye olmayan hücre hatları ile *MYCN*-amplifiye olan hücre hatlarının karşılaştırılması
- olası ifade değişikliklerinin saptanıp, bu değişikliklerin karsinogenezdeki rolünün ve hastalık etiyopatogenezinin belirlenmesi

amaçlanmıştır. Araştırılan genler sınıflarına göre aşağıda belirtilmiştir:

DNA metiltransferazları: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B

Histon asetiltransferazları: ATF2, CDYL, CIITA, CSRP2BP, ESCO1, ESCO2, HAT1, KAT2A (GCN5L2), KAT2B (PCAF), KAT5 (HTATIP), MYST1, MYST2, MYST3, MYST4, NCOA1, NCOA3, NCOA6

Histon metiltransferazları: CARM1 (PRMT4), DOT1L, EHMT2, MLL1, MLL3, PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT5, PRMT6, PRMT7, PRMT8, SETDB2, SMYD3, SUV39H1.

SET domain proteinleri: ASH1L, MLL3, MLL5, NSD1, SETD1A, SETD1B, SETD2, SETD3, SETD4, SETD5, SETD6, SETD7, SETD8, SETDB1, SUV39H1, SUV420H1, WHSC1.

Histon fosforilazları: AURKA, AURKB, AURKC, NEK6, PAK1, RPS6KA3, RPS6KA5.

Histon ubikitinazları: DZIP3, MYSM1, RNF2, RNF20, UBE2A, UBE2B, USP16, USP21, USP22.

DNA/Histon demetilazları: AOF2, JARID1B, JARID1C, JMJD2A, JMJD2C, JMJD3, MBD2.

Histon deasetilazları: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroblastom'un Tarihçesi

Nöroblastom ile ilgili bilgi ve veriler 17. yüzyıla kadar dayanmaktadır. 1864 yılında Alman fizikçi Rudolf Virchow, bir çocukta karın boşluğunda oluşan tümörün 'gliom' olduğunu belirtmiştir. 1891 yılında Alman patolog Felix Marchand, sempatik sinir sisteminden ve adrenal medulladan elde edilen tümörün karakterisitk özelliklerini fark etmiştir [8,9]. 1901 yılında ise William Pepper, hastalığın 4S evresinde olan bebeklerde (karaciğer metastazı bulunup kemiğe yayılmayan türü), hastalığı belirgin bir şekilde açıklamıştır [10]. 1910 yılında James Homer Wright bu tümörün öncül nöral hücrelerden köken aldığını anlamış ve adına 'Nöroblastom' demiştir [10,11]. Wright daha önce sarkoma teşhisi koyulan vakaları toplamış ve sonraları fetal adrenal medullada olgunlaşmamış hücreler olarak nitelendirilecek olan nöral fibril ve demetlerini fark etmiştir [11].

Yakın zamanda yayınlanan ve NB vakaları ile ilgili tarihsel bir bakış açısı kazandıran bir çalışmada, birinci dünya savaşı sonrası hastalık üzerine yapılan ilk tedavi çalışmaları tanımlanmış ve ilk tedavi yönteminin pediatrik cerrahi müdahale olduğu belirtilmiştir [10]. Daha sonrasında yayınlanan bir çalışmada ise, 217 vakada cerrahi müdahale ile bölgesel tümörün tedavisinde başarı kazanıldığı açıklanmıştır [12]. Başka bir çalışmada, büyük tümöre sahip vakalarda veya cerrahi müdahalenin yetersiz kaldığı durumlarda hastalardan bir grubunun X-ray sağaltımı ile iyileştirildiği belirtilmiştir [13]. Kemoterapinin kullanılmasından yıllar önce hastalığın ağır seyrinden kurtulma şansının, yaşı büyük çocuklara nazaran bebeklerde daha çok olduğu gözlemlenmiştir. Sonrasında klinik tedavi uzmanları bebeklerde metastatik yayılımın deri ve karaciğerde tutulu kaldığını ayrıca hastalığın tedavi uygulanmaksızın kendiliğinden gerileyebildiğini fark etmişlerdir [14]. 1960'larda çocuk hastalarda kemoterapinin ardından sağ kalımın arttığını bildiren araştırmalar yayınlamış fakat hastalığın tekrardan nüksettiği gözlenmiştir [15,16].

2.2. Nöroblastomun Epidemiyolojisi

NB tümörünün embriyo ve fetüste sempatik sinir sistemini oluşturan nöral krestten köken alan hücrelerden oluştuğu ve bu hücrelerin farklılaşmanın erken döneminde tutuluma uğradığı düşünülmektedir [17]. NB, çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturmaktadır. Bu oran hastaların cinsiyetine ve yaşam süresine bağlı olarak, 5 yaş altı çocuklarda 7000'de bir vakaya denk gelmektedir. Tanı koyulan hastaların yaklaşık %40'ı bir yaş altı çocukları içermektedir [18]. Hastalığın gelişen dokularda oluşmasından kaynaklı, tanı yaşı yaklaşık 17 ay olarak hesaplanmıştır. Nöroblastik tümörler, primordial nöral krest hücrelerinden farklılaşıp sempatik sinir sisteminde özellikle adrenal medullada veya paraspinal gangliada, boyun bölgesinde, göğüste, karın boşluğunda ve pelviste orataya çıkmaktadır [19]. Bu tümör en çok adrenal medullada tutulum göstermektedir ve bu oran %34 olarak belirlenmiştir [20].

Nöroblastom olguları prognostik açıdan altı grup altında incelenmekte ve bu gruplandırma genel olarak Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi'ne (ISSN) uygun olarak yapılmaktadır. Gruplar belirlenirken, hastalığın yayılımı ve hasta yaşından ayrı olarak, tümör histolojisi, farklılaşma seviyesi ve tümörün stroma içeriği de prognostik değer olarak incelenmektedir [21]. Buna ek olarak kromozom sayısı, allelik kayıp, onkogen amplifikasyonu ve anormal gen ifadesi gibi genetik ve moleküler özellikler de klinik seyir ile ilişkilidir. Yakın bir dönemde bu biyolojik belirteçler prognostik değerlendirmeye dahil edilmiştir [22].

ISSN'nin yanı sıra, Uluslararası Nöroblastom Risk Grubu (INRG) ile hastanın yaşı, tümörün farklılaşma seviyesi, Shimada histopatolojisi, *MYCN* proto-onkogeni amplifikasyonu, 11q delesyonu ve DNA ploidisini göz önüne alarak sınıflandırma yapılmaktadır [23].

2.2.1. Nöroblastom Yatkınlığı ve Genetiği

2.2.1.1. Ailesel Nöroblastom

Hastaların yaklaşık %1'inde ailesel NB geçmişi görülmektedir. NB soyağacı genelde eksik penetransın görüldüğü otozomal dominant olarak kalıtılan bir örüntü olarak gösterilmektedir. En az iki nöral krest gelişim hastalığı NB oluşumuna yüksek risk içermektedir. Bu hastalıklar; distal kolonda bulunan ganglion hücrelerinin eksikliğinde ortaya çıkan ve işlevsel obstrüksiyona neden olan 'Hirschsprung hastalığı' ile uyku sırasında nefes almanın otonomik kontrolünün kaybedildiği, 'Ondine hastalığı' diye bilinen santral uyku apne sendromudur. Bu iki hastalık genelde birbiriyle bağıntılı olmasa da, vakaların çoğunluğunda sempatik sinir sisteminin farklılaşmasında ve katekolamin sentezinde görev alan *PHOX2B* geninde mutasyon görülür [24,25]. *PHOX2B* geninin etkisi ailesel NB vakalarında görülmesine karşın, sporadik NB olgularında bu genin mutasyonları nadirdir [26,27].

Yakın zamanda anaplastik lenfoma kinaz (*ALK*) geninde oluşan germ hattı mutasyonların NB'ye yatkınlığı arttırdığı bulunmuştur [28,29]. *ALK* geni, merkezi ve perifer sinir sisteminde tercihen ifade olan bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlamaktadır [30]. Bugüne değin NB tümörlerinde üç tip *ALK* germ hattı mutasyonu tanımlanmıştır ve bu mutasyonlardan en sık görüleni R1275Q olarak belirlenmiştir [31]. Hastaların aile geçmişi hakkında yeterli bilgi edinilememesine rağmen bu mutasyonların eksik penetrans gösterdiği ve *ALK* mutasyonu içeren NB tümörlerinin daha agresif davranış gösterdiği düşünülmektedir [32].

2.2.1.2. Sporadik Nöroblastom

NB, ailesel geçmişe dayandırılabilinse de çoğunlukla sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek çözünürlüklü CGH dizinlerinin geliştirilmesi ile, NB tümörlerinde genom ölçeğindeki genomik dengesizlikler ve bölgesel kromozom aberasyonları saptanabilmektedir [33-38]. İkinci kromozomun p24 bölgesinde bulunan *MYCN* proto-onkogeni, tümörlerin çoğunluğunda %22 oranında amplifiye durumdadır ve hasta yaşından bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilir [39-41]. Primer NB tümörlerinde *MYCN* amplifikasyonuna ek olarak, çoğunluğunu kromozom materyalinin alelik kaybının veya bütün kromozom kazancının oluşturduğu birçok sitogenetik değişiklik belirtilmiştir. Özellikle segmental kopya sayısı değişikliği sıkça görülmektedir. Bunlardan kromozom kayıpları (1p, 3p ve 11q) ve kromozom

kazanımları (1q, 2p ve 17q) çoğunlukla kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir [2,42-45].

1p36 bölgesi kaybı NB tümörlerinin %23-35'inde gözlenmektedir ve agresif hastalıkla anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir [3,46,47]. Bu sebeple 1p36 bölgesinin, bir ya da birden fazla NB tümör-baskılayıcı gen içerdiği düşünülmektedir [48-50]. 1p36 kaybı sonrası sağ kalım, çok değişkenli analizlerle incelenmiştir fakat bağımsız prognostik değerler halen tartışmalıdır. Buna rağmen bazı çalışmalarda, 1p36 kaybı olan düşük ve orta dereceli NB'nin içinde bulunduğu vakalarda, hastalığın yüksek derecede nüksetmesine rağmen bu hastaların yoğun tedavi yaklaşımları ile sağaltıldığı belirtilmiştir [23].

Yakın zamanda, 11q kaybının da NB hastaları üzerindeki etki ve sonuçları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, NB vakalarının %24-44'ünde 11q23 bölgesi kaybı tespit edilmiştir [51]. İlginç bir şekilde, 11q kaybı NB'de kötü prognoz ile ilişkilendirilirken, bu kayıp *MYCN* amplifikasyonu ile ters ilişkilidir. Bu sebeple 11q kaybı içeren agresif NB ve *MYCN* amplifikasyonu içeren agresif NB, moleküler açıdan iki farklı alt grupta incelenmektedir [52-54].

NB vakalarının %50'sinden fazlasında dengesiz kromozom 17q kazanımı ve hiperdiploid vakaların %40'ında bütün kromozom 17 kazanımı görülmektedir [55]. 17q kazanımının alt gruplar arasında prognostik değeri olmasına karşın, yeterince güçlü ve bağımsız olmamasından kaynaklı, klinik deneyler içine alınmamaktadır.

NB tümörleri genetik açıdan incelenecek olursa, %8 oranında rastlanan *ALK* mutasyonları hastalığı patogenezi anlama konusunda bir atılım teşkil etmektedir [28,29,31,56]. İlginç bir şekilde, somatik ve germ hattı *ALK* mutasyonları farklılık göstermektedir. Bu aberasyon ile tümör biyolojisi arasındaki bağlantı henüz belirlenememişse de yayınlanan bilgiler ışığında *ALK* geni mutasyonları ile agresif NB alt grupları arasında bir ilişki belirtilmemiştir [29].

Almanya ve Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan çalışmalarda ise, 'near-triploid' tümörlere nazaran 'near-diploid' NB tümörlerinde, *MYCN* amplifikasyonu olmamasına rağmen, 12-18 ay yaş aralığında metastatik hastalık belirlenmiştir [57-59]. Buna ek olarak yakın zamanda hiperdiploid yapıya sahip ve *MYCN* amplifikasyonu görülen tümörlerde prognozun iyi olduğu gözlenmiştir [60,61].

2.3. Nöroblastom'un Biyolojik ve Genetik Özellikleri

Nöroblastom (NB) sempatik sinir sistemine farklılaşmış nöral krest hücrelerinden köken alan embriyonik bir tümördür [62,63]. Sağ kalım oranı %50'den az olan [39] bu kanser türü, spontan remisyondan hızlı metastatik progresyona kadar varan farklı klinik davranışlar göstermektedir [64]. Klinik davranış farklılıkları; hastalığın evresi, hasta yaşı, tümörde bulunan kromozom seti sayısı [65] ve *MYCN* amplifikasyonu gibi genetik mekanizmalara [39]; 1 no'lu kromozomun kısa kolundaki (1p) delesyonları ve 17 no'lu kromozomun uzun kolundaki (17q) kazanımlara ve hatta *HOXA9* ve *RARB2* genlerinin 'CpG' adacıklarındaki hipermetilasyonlar gibi epigenetik mekanizmalara bağlıdır [66].

NB karyotipik açıdan segmental kromozom aberasyonları ile karakterizedir. Sık gözlenen reküran kromozom anomalileri, 1 no'lu kromozomun kısa kolunda (1p) ve 11 no'lu kromozomun uzun kolunda (11q) gözlenen kayıplar; 17 no'lu kromozomun uzun kolundaki (17q) kazanımlardır. NB olgularının % 22'sinde *MYCN* amplifikasyonu, ileri hastalık evresi, metastatik hastalık ve agresif klinik seyirle birliktelik göstermektedir. Ayrıca, 1p, 11q delesyonları ve 17q duplikasyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir [2-4,67]. NB ve Gliom'da ortak bulunan genetik aberasyonlardan biri 19q13 bölgesinin heterozigotluk kaybıdır [68-75]. 19q13 bölgesindeki bu kayıp, agresif NB'nin karakteristik özelliğidir [69]. Araştırmalar 19q13 bölgesinde, insan primer Gliom ve NB'de gelişim için önemli olan en az bir tane tümör baskılayıcı genin bulunduğu fikrini ortaya koymuştur. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, miyelin-ilişkili epitel membran proteini *EMP3*'ün 19q13 bölgesinde yerleşmiş olduğu, NB ve Gliomda *EMP3*'ün promotör bölgesinde susturulma gözlemlendiği ve bu durumun hücre büyümesini engellediği görülmüştür. Bununla beraber NB'de *EMP3* geninin 'CpG' adacıklarında oluşan hipermetilasyon, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [76].

NB tümör tiplerinde, 1p bölgesi üzerinde geniş araştırmalar yapılmıştır. NB tümörlerinde 1p bölgesinde, %20-40 arasında heterozigotluk kaybı (LOH) görülmektedir. Ayrıca 1p kaybı, *MYCN* amplifikasyonu ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [3]. Bu sebeple, agresif NB tümörlerinde, bu bölgede aktivitesi durdurulmuş bir tümör-baskılayıcı genin bulunduğu düşüncesi öne sürülmüştür.

Birinci kromozomun p kolundaki kayıplara sıkça rastlanılmasına karşın, bazı tümörlerde küçük oranlarda kayıplar görülebilmektedir. Caren ve arkadaşları [67] çalıştıkları tümör materyalinde D1S80 ve D1S244 belirteçleri arasında kalan bölgede

'shortest region of overlap' (SRO) sayılan kayıplar belirlemişlerdir [77,78]. Yapılan bu çalışmada SRO bölgesindeki yedi (7) genin mutasyon analizi yapılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir [79-81] . Ayrıca bu genlerin ifade düzeyleri ve metilasyon örüntüsü bilgilerine de sahip olunmuştur. Kötü prognoza sahip NB'de iyi prognoza sahip olana nazaran, gen ürünlerinin 'downregülasyon'a uğradığını ve bu durumun 'CpG' adacıklarındaki metillenme ile açıklanamayacağını göstermişlerdir [82].

Elde edilen tüm veriler incelendiğinde, söz konusu kromozom segmentlerinde NB patogenizinde rol oynayan gen ya da genler bugüne kadar tanımlanamamıştır. Erişkin tümörlerinde gözlenen kanser genleri de NB tümörlerinde tutulum göstermemektedir. Bu çalışmanın çıkış noktası NB'deki bu prognostik faktörlerin sitogenetik anomaliler haricinde başka etmenlere dayandırılabilceği düşüncesidir. Günümüzde kanser üzerine yapılan araştırmalarda, kanser gelişimi üzerinde epigenetik faktörlerin de rol oynadığının bulunması ve NB tümörlerinde bu tarz çalışmaların fazla olmaması, NB tümör fenotipindeki bu çeşitliliğe epigenetik faktörlerin neden olabileceği sorusunu doğurmuştur [5].

DNA metilasyonu, normal gelişim sürecinde rol oynayan bir epigenetik faktördür ve metilasyon örüntüsünün bozulması karsinogenezde doğrudan rol oynamaktadır [6]. Buna ek olarak, histon modifikasyonlarının, protein komplekslerinin DNA'ya bağlanma sürecini olumlu ve olumsuz yönde etkiledikleri, bu sebeple genom üzerinde belirli bölgelerin gen ifadesinde artırıcı veya susturucu etkisi olduğu bilinmektedir [7].

2.4. Epigenetik Faktörler

Epigenetiğin ilk tanımı 1942 yılında Weddington tarafından, programlanmış değişiklikler ile genotipten doğan fenotip olarak yapılmıştır [83]. 1983'te keşfinden beri, insan kanserinde epigenetik, insan kanser genetiğinin gölgesinde kalmıştır [84]. Epigenetik, DNA dizisinden bağımsız olarak hücre bölünmesiyle kalıtılabilen hücresel bilgi olarak tanımlanmıştır. Başka bir deyişle, genotip farklılığına dayanmadan fenotip üzerinde görülen, tersinir potansiyeli olan ve hücre bölünmesiyle aktarılabilen bilgidir. Kromatin yapısının değişebilen durumu, ifade aktivitesi, ve memelilerde 'CpG' ikili nükleotitlerinde görülen sitozin-5 DNA metilasyonu epigenetik değişimlere örnek gösterilebilir [85-88] .

Epigenetik kalıtım, sineklerde konum-etki çeşitliliğinde, mayalarda telomer ve eşey tipi susturulmasında, bitki ve hayvanlarda transgen ile indüklenen gen susturulmasında rol oynar. Gen ifadesini kontrol eden epigenetik örüntüler, DNA dizisinden bağımsız olarak yavru hücrelere aktarılırlar [84].

İmprintleme; gametogenez sırasında maternal ve paternal genomun koşullandırılması anlamına gelmektedir. Bu konuyla ilgili ilk veriler embriyolojik çalışmalar sonucunda ortaya konmuş ve 1980'lerin ortasına doğru yayınlamıştır [89,90].

İmprintlenen genlerin gelişimdeki etkisi, nörogelişim hastalıkları olan Prader-Willi (PWS) ve Angelman (AS) sendromları ile kanıtlanmıştır. 15. kromozomun uzun kolunun aynı ebeveyninden aktarılması durumu ile bu hastalıklar ortaya çıkmaktadır. 'Uniparental dizomi' diye adlandırılan bu olayda her iki kromozomun uzun kolu anneden geliyor ise PWS, babadan geliyor ise AS oluşmaktadır. 1980'lerin sonunda farklı gruplar tarafından yapılan bağımsız çalışmalarda, Wilms tümörlerinde, 11p15 allelinde maternal allelin kaybolduğu ve paternal allelin iki katına çıktığı, ebeveyn kökenli (parent-of-origin) LOH saptanmıştır [91-94]. NB'de yapılan çalışmalar sonucunda ise, 1p35-36 bölgesinde LOH bulunmuş ve kaybolan allelin tercihen maternal kökenli olduğu saptanmıştır. Fakat bu tümörde ebeveyn kökene bağlı kayıp tam olarak anlam ifade etmemektedir [43].

2.4.1. Kanser ve Epigenetik

DNA metilasyonu, izole edilen DNA yapısında korunduğundan yararlı bir belirteçtir ve PCR tabanlı tekniklerle kolaylıkla ölçülebilmektedir. Bu sebeple araştırmacılar, kanser hücrelerinde epigenetik durumun anlaşılması için iç içe geçmiş bir dizi teknik kullanmaya başlamışlardır [95,96]. Bu teknikler arasında DNA metilasyonu ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması [97], gen ifadesi ve DNA metilasyonu [98], DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları [97,99], epigenetik inhibitörler ile gen ifadesi ve DNA metilasyonu [100-102] ve hatta gen ifadesi, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun üçlü kombinasyonu [103] bulunmaktadır.

Uzun zamandır bilindiği gibi tümör hücreleri, tümör baskılayıcı genlerin 'CpG' adacıklarında bulunan 5-metilsitozinlerin hipometilasyonu ve hipermetilasyonu ile değişikliğe uğramaktadır [104-107]. 'CpG' adacıklarının hipermetilasyonu kromatin yapısının değişmesinde sadece bir boyut iken [108,109], bunun yanında histon H3H4 deasetilasyonu [110], histon H3 lizin9 metilasyonu [111], histon H4 sumolasyonu [112] ve histon H3 lizin4 metilasyonunun azaltılması [113,114] gen ifadesinin susturulması ile sonuçlanmaktadır.

2.4.1.1. DNA metilasyonu

Hipometilasyon, tümörlerde tanımlanan ilk epigenetik değişikliktir [115] ve *HRAS*, *siklin D2*, *MASPIN* gibi büyümeyi tetikleyici genler tümörlerde hipometilasyon ile aktif hale getirirler. Aynı şekilde serviks kanserinin prognozunda önemli bir rolü olan insan papilloma virüsü (*HPV16*) geni, hipometilasyon ile aktif hale getirilir [86,116].

'CpG' adacıklarındaki DNA metilasyonunun silinmesi, kanser hücrelerinde saptanan ilk genetik anomalidir. Bu durum, Andy Feinberg ve Bert Vogelstein'in, 1982 yılında Johns Hopkins Üniversitesinde yapılan 'Tümör Hücrelerinde Heterojenite' konulu sempozyuma katılmalarıyla şekillenmiştir. Sempozyum sonrası, yüksek sıklıkla görülen mutasyonlarda, tümörün mikroçevresine adaptasyonunda ve plastisitesinde hangi mekanizmaların işlediği sorusu akıllarına gelmiştir [84]. Feinberg ve Vogelstein, DNA metilasyonu ile dokuya özgül gen susturulması arasında bağlantı olabileceği düşüncesinden yola çıkarak, kanser dokusu ve normal doku arasındaki farklılıkları araştırmışlardır. Metilasyona duyarlı restriksiyon enzimi ile parçalara ayrılan DNA fragmanlarını 'Southern Blot' yöntemi ile analiz edip, önemli miktarda

'CpG' bölgelerinin normal dokularda metillendiğini ve kanser dokularında metillenmediğini bulmuşlardır [115].

İlk bilinen tümör baskılayıcı gen ise retinoblastom *RB* genidir. *RB* promotörü kayda değer oranda, sporadik ve hatta kalıtsal *RB*'de metilenmiş durumdadır. Dryja ve Horsthemke laboratuvarlarına ait yayınlarda 'tümör baskılayıcı genlerin susturulması epigenetik mekanizma ile oluşabilir' düşüncesi ilk olarak belirtilmiştir [117,118]. Tümör baskılayıcı genlerin susturulması ile promotör hipermetilasyonu arasında bağlantı olduğu, Retinoblastom ile ilişkili olan *RB* geninde tanımlanmıştır [117]. Buna ek olarak *P16*, *VHL* (von Hippel-Lindau), *MHL1*, *APC* (adenomatosis polyposis coli) ve *E-cadherin* gibi tümör baskılayıcı genlerin tümörlerde hipermetilasyona uğradığı gözlemlenmiştir [108].

Tümör baskılayıcı genlerin epigenetik mekanizmalar ile susturulması hakkındaki doğrulama, 1993 yılında Sakai ve grubu tarafından sağlanmıştır. Bu doğrulama retinoblastom tümörlerinde promotör hipermetilasyonu ile *RB* ifadesinin %92 oranında azalmasının gösterilmesi ile sağlanmıştır [119]. İki yıl sonra, Baylin, Jones ve Sidransky laboratuvarlarının yaptığı çalışmalarla kanser hücrelerinde sayısız lokusta promotör hipermetilasyonunu doğrulanmıştır. Edinilen bu bilgi P. Issa ve arkadaşlarının, kanser hücrelerinde epigenetik gen inaktivasyonu ilkesini desteklemiştir. Bunun arkasından P. Issa, elde edilen metilasyon profili verisi ışığında, insanda görülen kanser türlerini sıkça görülen promotör metilasyonu ve nadir görülen metilasyon grubu olarak iki farklı sınıf altında toplamıştır. Bu sınıflandırma insan kanserlerinde 'CpG'-adacığı metilatör fenotipi (CIMP) terimini tanımlamasına olanak sağlamıştır [120].

DNA hipometilasyonu gen aktivasyonuna yol açabilmektedir. Yakın zamanda somatik hücrelerde birçok 'CpG' adacığının metillenmiş durumda olduğu bulunmuştur [121]. Bu metilenmiş bölgeler, kanser hücrelerinde hipometile hale gelebilirken civarında bulunan genler aktif hale gelebilmektedir. Bu duruma örnek olarak, normal şartlarda testiste ifade olan *HRAS* [122] ve *CT* (cancer/testis) gibi onkogenler hipometilasyondan etkilenip tümörlerde anormal olarak ifade edilebilmektedir. Bu genlerin hipometilasyonu melanomda *MAGE* geninin ifadesine neden olmakta ve bu durum immunoterapi için umut verici olarak görülmektedir [123].

Genomik metilasyon analizlerinin sonucunda [124,125] mide, böbrek, kolon, pankreas, karaciğer, uterus, akciğer ve serviks kanserlerinde hipometile bölgelerin

oldukça fazla olduğu belirlenmiştir [126-133]. Hipometilasyonun, kanserlerde gen aktivasyonuna yol açtığına yönelik güçlü destekler bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak, 'CpG' adacıklarında oluşan demetilasyon, gastrik karsinomda *siklin D2* [126] ve *MASPIN* genlerinin aşırı ifadesi [127], renal hücreli karsinomda *MN/CA9* geninin aşırı ifadesi [128], kolon kanserinde *S100A4* metastaz-ilişkili geninin aşırı ifadesi [129] ve serviks kanserinde *HPV16* insan papillomavirüs 16 geninin ifadesi [121,131] gösterilebilir. Goggin ve arkadaşlarının yakın zamanda yaptığı pankreas kanseri üzerindeki çalışmalarda, yaygın hipometilasyon ile *14-3-3σ* geninin de içinde bulunduğu hücre çoğalması ile ilişkili genler arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [132].

Ehrlich ve arkadaşları, yakın zamanda kromozomal karasızlık ile kanserde hipometilasyon arasında ilişki kurmuşlardır. Sentromere yakın satellitlerde oluşan hipometilasyon ağır sonuçlar doğururken, birtakım kanserlerde (Wilms tümörü, over ve meme kanserinde) 1. ve 16. kromozomların sentromere yakın bölgelerinde oluşan kırılma noktaları sonucu dengesiz translokasyonlar oluşmaktadır [134]. Bu yeniden yapılanmalar kendine hastır ve genel genomik karasızlıktan dolayı olmamaktadır. Wilms tümörlerinde t(1;16) parça değişimi bazen soliter anomali olabilmektedir. Bu dengesiz parça değişimleri, 16. kromozom üzerindeki belirteçlerde heterozigotluk kaybı (LOH) üretebilmekte ve bu durum tümör anapilazi ilişkilendirilmektedir [135].

Satellit dizilerdeki demetilasyona uğramış bölgeler kırılma ve yeniden birleşmeye daha yatkın olabilmektedir. Bu kanserlerde öngörülen genel bağlantı kanıtlanamamasına rağmen farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, sitozin DNA metiltransferaz *DNMT3B*'de oluşan fonksiyon kaybı mutasyonlarının gelişimsel bir hastalık olan ICF (immünyetmezlik, kromozomal karasızlık ve yüz anomalileri) sendromuna neden olduğunu bulunmuştur [136-138]. ICF sendromunda, gelişim sırasında *de novo* metilasyondan sorumlu olan *DNMT3B* geninde oluşan mutasyonlar bağışıklık sistemini etkilemektedir [137]. ICF sendromu hastalarında, immünoglobulin geninin susturulmasında ve yeniden aktif hale getirilmesinde rol oynayan *DNMT3B* geninin mutasyonu ile heterokromatin yapısında bozukluklar oluşmaktadır [139].

Hirohashi ve grubu böbrek kanseri hastalarında *DNMT3B* geninin en sık ifade edilen ürününü tanımlamışlardır [140]. Bu ürün hücrelere transfekte edildiğinde, sentromere yakın bölgelerde bulunan satellit dizilerde hipometilasyona sebep

olmaktadır. Bu çalışma hipometilasyon ile tümör oluşumu arasındaki bağlantıyı desteklemektedir [140].

Yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler, tümör baskılayıcı genlerin yeniden çalıştırılmasıyla sonuçlansa da uygulanan deneysel sistemlerin farklılığına dayalı, sonuçlarda çeşitlilik görülmüştür. Buna örnek olarak HCT116 hücre hattında DNMT1'in 'antisens' veya RNA interferans ile 'acute' safdışı bırakılmasıyla *CDKN2A* geni yeniden çalıştırılırken, aynı hücre hattında bu genin yeniden aktif hale geçmesi için DNMT1 ve DNMT3B'nin aynı anda 'somatic knock-out' edilmesi gerekmektedir. Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak DNMT3B'nin DNMT1 yerine görev yapabildiği fakat tam olarak aynı görevi yapmadığı bilgisi elde edilebilmektedir [84]. Kromatin oluşumunda rol oynayan histon H3 lizin9 metilasyonu, daha önce 'knock-out' yöntemi sırasında DNA metiltransferaz ile yeniden aktif hale getirilen *CDKN2A* geninin susturulmasında rol oynamaktadır [141].

Cedar ve Graessmann'ın yaptığı çalışmada, çıplak DNA in vitro koşullarda yarı-metillenmiş ve mikroyenjeksiyon yolu ile hücrelere aktarılmıştır. Bu DNA parçaları, ancak baskılanmış kromatin paketleri haline geldiğinde ifadeleri susturulmuştur [142,143]. Bu çalışmadan kısa bir süre sonra Adrian Bird ve grubu metillenmiş CpG adacıklarına proteinlerin bağlandığını tespit etmiş [144,145], Steve Baylin ve Alan Wolfe gruplarıyla yaptıkları ortak çalışma ile de, bu proteinlerin MECP2 ve MDB2 proteinleri oldukları bulmuşlardır. MECP2 ve MDB2 proteinlerinin yanı sıra, metillenmiş 'CpG' adacıklarına metil transferazların da (DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B) bağlandığını belirtmişlerdir [146-149].

DNMT1, replikasyon sırasında hali hazırda bulunan metilasyon örüntüsünün devamlılığını sağlamakla sorumlu iken DNMT3A ve DNMT3B metillenmemiş bölgelere metil ekleyebilirler. Histon proteinlerindeki lizin kalıntılarının metillenmesi uzun yıllar boyunca bilinmesine karşın, bu modifikasyonun gen düzenlenmesinde önemli olduğunu yakın zamanda Jenuwein ve arkadaşları belirtmişlerdir [150,151]. Jones'un kanser hücrelerinde, histon H3 lizin9 metillenmesi ile tümör baskılayıcı gen olan *CDKN2A*'nın susturulduğunu bulmasıyla da bu düşünce sabitlenmiştir [152]. DNMT1 metiltransferazın kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiği bildirilmesine karşın [153], karşıt çalışmalarda yapılan kontrollü gerçek zamanlı PCR deneyleri sonucunda, bu genin ifadesinde belirgin bir artış olmadığı gösterilmiştir [154-156].

1984 yılında Weinstein ve arkadaşları tarafından, metiltransferazların etkinliğini engelleyen 5-azaCdR adlı ilacın kültüre edilmiş hücrelerin farklılaşmasını tetiklediği bulunmuştur [157]. Böylece daha önce Taylor ve Jones tarafından yapılan çalışmada 5-azaCdR ilacının hücre farklılaşmasında olumlu etki gösterdiği buluşu desteklenmiştir [158].

Hipometilasyon ile kromozomal kararsızlık arasındaki bir diğer potansiyel bağlantı, kolon kanserindeki L1 retrotransposon hipometilasyonudur ve bu durum kromozomda yeniden düzenlemeye önayak olabilmektedir [159]. Hipometilasyon kanserlerde ilaç, toksin ve viral etkilere karşı bir mekanizma oluşturmaktadır. Akut miyelom lösemide gen amplifikasyonuna ek olarak, çoklu ilaç direnci geni olan *MDR1*'in hipometilasyonu gen ifadesini arttırmakta ve hücrenin ilaca karşı direnç oluşturmaya neden olmaktadır [160].

Toksik karsinojenler de metilasyonda değişikliğe neden olabilmektedir. Buna örnek olarak kadmiyum, DNA metiltransferaz aktivitesini bozarak akut hipometilasyona öncülük etmektedir. Bu durumun ardından DNA hipermetilasyona uğramaktadır [161]. Buna benzer bir şekilde arsenik, farelerde *RAS* geninin hipometilasyonuna sebep olmaktadır [162].

Yakın zamanda kanserde görülen hipometilasyon ile beslenme biçimi arasında bir bağlantı olduğunun bulunması heyecan verici bir gelişme olarak görülmüştür. Tümör baskılayıcı aktivite ile DNA metilasyonu arasında bir ilişki olduğu ilk defa 1993 yılında West ve Baretin yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada 'sryian hamster' hücrelerinde DNA metilasyona dayalı tümör baskılayıcı aktivitede ilerleyen bir kayıp olduğu bulunmuştur [163].

CpG adacıklarında hipermetilasyon şüphe edildiğinden daha az yaygın olabilmektedir [164]. Ayrıca tümörlerde ilaçla-indüklenen hipometilasyon ve DNA metiltransferazların 'knock-down' edilmesi ile aktif hale getirilen gen sayısı kadar susturulan genlerin bulunduğu bilgisi, hem hipometilasyonun hem de hipermetilasyonun kanserlerde genlerin aktif hale getirilmesi ve susturulmasında rol oynadığını göstermektedir [102].

Lengauer ve arkadaşları, kanser hücrelerinde DNA metilasyonu içeren retroviral yapılı promotörler ile mismatch tamir sisteminin susturulduğunu ve bunun sonucunda mismatch tamir sistemi ile metilatör fenotipi arasında bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir [165]. Kolodner ve grubunun mismatch tamir sistemi kusurlu

olan tümörlerde, mismatch tamir sistemi geni olan *MLH1*'in çoğunlukla hipermetile olduğunu göstermesi ile bu durum anlam kazanmıştır [166]. Buna ek olarak anormal imprintleme, çoğunlukla mismatch tamir sistemi kusurlu olan kolon kanserlerinde görülmektedir [167].

2.4.1.2. Histon Metilasyonu

Nükleozomlar, ökaryotik hücrelerde kromozomların sıkı bir biçimde paketlenip düzenlenmesini sağlayan makara biçimindeki protein yapılarıdır. Bu yapılar histon H3, H4, H2A ve H2B proteinlerinden oktamler oluşturarak gen transkripsiyonunda düzenleyici görev üstlenirler [168,169]. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlar, histonların kuyruk kısımlarında gerçekleşmektedirler. Bu kuyruk bölgeleri proteazlara karşı duyarlı olmakla birlikte histonların yaklaşık %25-30'luk kütlelerini barındırdığından, diğer proteinlerin bağlanabilmesi için nükleozomdan dışarı yeterli uzantılar oluşturmaktadırlar [170-173]. Yapılan çalışmalar kromozom yapısının histon-DNA ve histon-histon etkileşimleriyle düzenlenebileceğini göstermiştir. Bu etkileşimler histon proteinlerinin kuyruk kısımlarının modifiye edilmesi sonucunda gerçekleşmektedir [174-176].

Histon proteinlerinin amino ucu kuyruk kısımları fosforilasyon, ubiquitinasyon, metilasyon ve asetilasyon gibi bir dizi post-transkripsiyonel modifikasyona uğrar [177,178]. Histon metilasyonu; heterokromatin oluşumu, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprintleme, ve homeotik genlerin susturulması gibi bir çok biyolojik işlemde görev alır [179-182]. Anormal histon metilasyonu insanlarda, kanser başta olmak üzere, birçok hastalığa neden olabilmektedir [183-187]. Metilasyon, histon proteinlerinin amino ucunda bulunan lizin(K) ve arjinin(R) kalıntılarında gerçekleşebilir. Bunlardan metilasyona uğrayan lizinler H3-K4, H3-K9, H3-K27, H3-K36 ve H4-K20 olarak belirlenmiştir [181,188]. Bu bölgelerin metilasyonu, gen ifadesi aktivasyonu/inaktivasyonu ve DNA hasarı ile ilişkilidir [188,189].

Lizin kalıntıları mono-, di-, tri- metile olabilir. Farklı derecelerde metile olan bu lizin kalıntıları histon metilazları, deasetilazları, kromatin değiştiricileri gibi değişik kromatin “modifier”larına bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır ve bu durumun farklı işlevsel sonuçları bulunmaktadır [188]. Ökromatik histon metilasyonu transkripsiyon üzerinde hem aktive edici hem baskılayıcı özellik gösterebilmektedir. Histon H3-K4

ve H3-K36 dimetilasyonu ve trimetilasyonu transkripsiyonu aktive edici olarak belirlenmişken, H3-K9 metilasyonu ökromatik genlerin promotör bölgelerinde baskılayıcı etki göstermektedir [182]. Histonlar üzerinde yapılan eski çalışmalarda, metilasyonun sabit ve geri dönüşümsüz olduğu düşünölmekteydi [190,191], fakat H3-K4 spesifik demetilaz enzimi *LSD1*'in bulunmasıyla histon metilasyonunun tersinir ve dinamik bir işlem olduğu ortaya çıkmıştır [192]. *LSD1*'in bulunuşundan 2 yıl sonra JHDM1 adında ikinci bir histon demetilaz keşfedilmiştir ve bu enzimin *LSD1*'den farklı olarak bulunan JmjC "domain"i, H3-K36-me2 demetilasyonundan sorumlu olduğu belirlenmiştir [193]. JmjC domaini metalloenzimlerin cupin süperailesine bağılı olup yaklaşık 100 tane protein bu domaini taşımaktadır [194]. JmjC domaini taşıyan protein gruplarından bir tanesi JMJD2 süper ailesidir ve bu aileye mensup olan JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, JMJD2D proteinleri histon lizin trimetil demetilaz olarak işlev göstermektedir [195].

Güçlü transkripsiyon faktörlerinin promotörlere yerleşmesi ile histonların yer değıştirmesi, hücrelerin histon metilasyonu ile susturulmuş genleri yeniden aktifleştirmesi durumuna açıklama getirebilmektedir. Chinnaiyan ve arkadaşları kromatin baskılanmasında görev alan *EZH2* geninin aşırı ifadesinin metastatik prostat kanserinde hipermetilasyona ve gen susturulmasına neden olduğunu açıklamıştır [186]. Lenfomalarda ve kolon kanserinde ise, histon H4 lizin16 asetilasyonu (H4K16ac) eksikliğıinin ve histon H4 lizin20 üçlü metilasyonunun (H4K20me3) transkripsiyonu baskıladığı anlaşılmıştır [183].

2.4.1.3. Histon Asetilasyonu

Asetilasyon, histonların amino ucunda bulunan pozitif yüklü lizin kalıntılarını nötrlediği için, amino uçlarının nükleozomda yer değiştirmesi nükleozomların açılmasına ve transkripsiyon faktörlerine alan oluşturulmasına sebebiyet vermektedir [196-199]. Histon asetiltransferazlar 2 grupta incelenebilir: TipA HAT'lar -nükleus içinde sabitlenenler - histon proteinlerinin asetilasyonundan sorumludur ve transkripsiyonun aktivasyonunda görevlidirler; TipB HAT'lar ise sitoplazmada sabitlenir ve DNA replikasyonundan önce yeni sentezlenen histon proteinlerinin asetillenmesinden sorumlu olup bağlanma ile ilişkilidirler [200].

Histon asetiltransferazlar (HATs) ve histon deasetilazlar (HDACs) histon proteinlerinin amino ucunda bulunan lizin kalıntılarının asetillenmesinde görev alarak transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynarlar [169,201]. Birçok türde histon H3 proteini lizin 9, 14, 18 ve 23 bölgelerinden asetillenirken, kendisi kadar aktif görev üstlenen H4 proteini de lizin 5, 8, 12 ve 16 bölgelerinden asetilasyona uğramaktadır [170,176,202]. Histon asetilasyonunun kararlı (steady-state) ve dengeli kalmasını sağlayan durum, histon asetiltransferazlar ve histon deasetilazların ters aktiviteleri arasındaki dengedir [203]. Genel olarak histon asetilasyonundaki artış transkripsiyonun aktivasyonu ile ilişkilendirilirken, azalış ise gen ifadesinin baskılanması anlamına gelmektedir [203-205].

Ökromatin ve heterokromatin yapıları farklı asetilasyon örüntüsü sergilemektedir. Histon H4 üzerinde bulunan belirli asetilasyon bölgelerine (K5, K8, K12, K16) uygulanan özel antikolar, aktif ökromatin bölgelerinin bütün H4 asetilasyon bölgeleri tarafından değiştirildiğini göstermişken, heterokromatin bölgelerinde yerleşen H4 proteinlerinin hipoasetile durumda olduğu belirlenmiştir [206,207]. Buna ek olarak, bu dört bölgeden hiçbirini inaktif X kromozomu üzerinde asetilasyona uğramamaktadır [208].

Bugüne değin insan onkojenezinde histon deasetilaz grubu HDAC genlerinin ifadesinde direkt bir değişiklik gözlenmemesine rağmen, HDAC proteinlerinin anormal aktivasyonunun, iyi karakterize edilmiş hücresel onkojenez ve tümör baskılayıcı genler ile ilişkili olduğu, bunun sonucunda gen ifadesini değiştirdiği bilinmektedir [209-213]. HDAC enzimleri çoğunlukla yalnız çalışmamakla birlikte baskılayıcı kompleks oluşturmak için diğer proteinlere ihtiyaç duymaktadır. Bu kompleksin oluşturulması ve işlevini yerine getirmesi için gereken ilk sinyal DNA üzerinde

bulunan CpG adacıklarına bağlanan proteinler ve DNA metiltransferazlar tarafından gönderilmektedir [108,214,215]. HDAC proteinlerinin inhibisyonu histon proteinlerinin hiperasetilasyonu ile sonuçlanırken bu durum DNA yapısını gevşeterek bir dizi genin aktivasyonuna neden olmaktadır [E38]. HDAC inhibisyonunun *in vivo* ve *in vitro*'da büyümeyi durdurduğu, farklılaşmaya veya kanser hücrelerinin apoptozuna neden olduğu bilinmektedir [213,216-226].

HDAC proteinleri 2 farklı filogenetik grupta sınıflandırılmıştır. Bunlardan sınıf 1 HDAC olarak bilinen HDAC 1, 2 ve 8 mayada transkripsiyonel düzenleyici olan *RPD3* ile benzerlik gösterirken, sınıf 2 HDAC proteinleri HDAC 4, 5, 6, 7, 9 ve 10 ise yine mayada bulunan *HDA1* deasetilaz ile benzerlik göstermektedir [205]. Yakın zamanda bulunan HDAC11 ailesi, sınıf 1 HDAC ailesi ile benzerlik göstermesine karşın dizi benzerliğinin çok az olması nedeniyle yeni bir aile olarak isimlendirilmiştir [227]. Sınıf 1 HDAC proteinlerinin genel olarak bütün hücre çeşitlerinde ifadesi gözlenirken, sınıf 2 HDAC proteinlerinin kısıtlı sayıda hücre çeşidinde ifadesinin gözlenmesi, bu sınıf proteinlerin hücrelerel farklılaşma ve gelişimde rol oynadığı fikrini doğrulamıştır [228,229].

Histon deasetilasyonu ve histon H3 lizin 4 metilasyonu, bazı modellerde DNA metilasyonunun ve histon H3 lizin9 metilasyonuna sebep olmaktadır [230]. Bununla birlikte Sp1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasının, diğer sistemlerde epigenetik susturmayı bloke ettiği görülmektedir [231]. Sp1 bağlanma bölgelerindeki DNA metilasyonu, transkripsiyonunun uzamasına müdahale edebilmektedir [232,233]. Bunun yanında Sp1 bağlanma bölgelerinin kaldırılmasının zorunlu olduğu, fakat bu kaldırma sonucunda transkripsiyonun susturulması ve 'CpG' adacıklarının hipermetilasyonu yeterli derecede olmadığı belirtilmiştir [234].

DNA metilasyonunun epigenetik kontrolünü destekleyici bir çalışmada, gelişimsel süreçte ifadesi düzenlenen *SERPINB5* geninin DNA metilasyonun ihtiyaç duyduğu [235] ve kanser hücrelerinde anormal olarak susturulan genlerin DNA metiltransferaz inhibitörleri aracılığı ile aktive edildiği, fakat sadece histon deasetilazlar kullanılarak aktive edilmediği bulunmuştur [152,215,236,237]. Buna ek olarak, inhibitör deneylerinde, DNA demetilasyonunun ilk gerçekleştiği, genin tekrardan aktif hale geldiği ve ardından histon kodlarının tersine çevrildiği belirtilmiştir [237].

2.4.1.4. Histon Ubiquitinasyonu

Ubiquitinasyon proteaz-bağımlı veya proteaz-bağımsız mekanizmalar yolu ile transkripsiyonu düzenlemektedir [238]. Nükleozomunda ubiquitinasyona uğramış H2A proteini içeren genlerin transkripsiyonunun arttığı düşüncesi; transkripsiyonu sürekli olan *Hsp70* geninde bulunan H2A proteinlerinin %50'sinin ubiquitinasyona uğradığı, buna karşılık transkripsiyona uğramayan satellit DNA yapısında bulunan H2A proteinlerinin sadece %4'ünün ubiquitinasyona uğradığı bilgisi ile doğrulanmaktadır [239]. Ökaryotik organizmalarda H2A proteininin amino ucunda bulunan lizin119 kalıntısından yaklaşık %5-15 oranında ubiquitinasyona uğramaktadır [240]. H2A'ya ek olarak H2B de, amino ucunda bulunan lizin120 kalıntısından ubiquitinasyona uğramakta, fakat bu oran %1-2'lere kadar düşmektedir [241]. H1 ve H3 proteinlerinin de ubiquitinasyona uğradığı belirtilmişse de bu işlemin hangi bölgelerde gerçekleştiği henüz bulunamamıştır [242,243].

2.4.1.5. Histon Fosforilasyonu

Histon proteinlerinin fosforilasyonu çoğunlukla mitoz, mayoz, apoptoz ve DNA hasarı durumlarında, farklı histon kinazları aracılığı ile kromozomların kısalıp kalınlaşması işlevinde ilişkilidir [195]. Bilhassa H1 ve H3 histonlarının fosforilasyonu, mitoz sırasında kromozomların kısalıp kalınlaşmasıyla ilişkilendirilmiştir. Fakat günümüze değin yapılan çalışmalarda özellikle serin10'da görülen H3 fosforilasyonunun, *c-jun*, *c-fos* ve *c-myc* gibi erken evre genlerinin tetiklenmesinde görev aldığını göstermektedir [244-248].

2.4.2. Nöroblastom ve Epigenetik

Belirli genetik anomalilerin hastalığın özelliklerinde ve klinik seyrinde etkili olduğu gösterilmişse de, yakın zamanda yapılan çalışmalar epigenetik sapmaların da hastalık patogenezinde rol oynadığını ortaya koymuştur. Yang ve arkadaşları, *RASSF1A*, *CASP8*, *HIN1* ve *DCR2* gibi tümör-baskılayıcı genlerdeki hipermetilasyonun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir [249-251].

Nöroblastom prognozunun iyi veya kötü olmasına neden, birçok genin mRNA düzeyindeki ifadesidir. Agresif Nöroblastomda, histon asetilasyonu ve DNA metilasyonunun hastalık patogenezinde rol oynayan genlerin ifadelerini düzenleyebileceği gösterilmiştir [252-254]. NB tümörlerinin histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ve DNA-demetilaz ajanlarla muamelesi ile etkili sonuçlar elde edilmiş ve *in vivo* çalışmalarda kullanılması düşüncesi ortaya atılmıştır [252].

Yakın zamanda histone H3 üzerindeki metil gruplarını uzaklaştıran ve sonucunda genlerin aktivasyonunu sağlayan histon demetilazlar tanımlanmıştır [192,255]. Johannes ve arkadaşları lizin-spesifik demetilaz1 (LSD1) genini işlevsel önemini NB'de belirtmişlerdir. LSD1'in bulunuşundan sonra yapısal farklılıklar taşıyan fakat hepsinde 'jumonji' bölgesi bulunan 30'dan fazla histon demetilaz tanımlanmıştır. LSD1 özel olarak androjen reseptörüne [255] ya da büyük kromatin-düzenleyen eş baskılayıcı kompleks 'Co-Rest'e bağlanmaktadır [256]. Bu sebeple LSD1'in aşırı ifadesi nöroblastlarda nöron farklılaşmasını baskılamaktadır [257]. Aynı şekilde NB hücrelerinin farklılaşması sonucu LSD1 geni 'downregüle' olmaktadır. LSD1 geninin RNA interferaz ile 'knockdown' edilmesi sonucunda hücresel büyümede azalış, farklılaşma ile ilgili genleri ifadesinin tetiklenmesi ve hedef gene özgü H3K4 metilasyonu gözlemlenmektedir. Buna ek olarak, NB hücrelerinde LSD1 geninin monoamin oksidaz inhibitörleri ile ifadesinin baskılanması sonucu genel bir H3K4 metilasyonu ve hücresel büyümenin kısıtlanması *in vitro* çalışmalarla bulunmuştur [257].

Bu çalışmada, NB'deki heterojeniteye sebep olabilecek epigenetik mekanizmaları incelemek amacı ile, yedi farklı NB hücre hattı üzerinde deneyler yapılmıştır. Deney kapsamında; DNA metilasyonu, histon metilasyonu, histon asetilasyonu, histon fosforilasyonu ve histon ubiquitinasyonu gibi epigenetik değişimleri etkileyen genlerin ifade örüntüleri arasındaki farklılıklar, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda elde edilen veriler

ışığında, ifadesinde farklılık görülen genlerin işlevi araştırılmış ve bu genlerin ifade değişimlerinin NB patogenezindeki olası rolü tartışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

KB.SAG.2012.051 numaralı proje ile elde edilen yedi adet Nöroblastom hücre hattı kullanılarak deneyler yürütülmüştür. Proje kapsamında deneysel araştırma yöntemleri kullanılmıştır. Bu kapsamda, epigenetik faktörleri etkileyen genlerdeki ifade değişimlerinin Nöroblastom üzerindeki etkileri incelenmiş ve değişken olarak nitelendirilen hedef genlerin ifade değişimleri, yedi Nöroblastom hücre hattı kullanılarak denetimli bir ortamda incelenmiştir. Deney süresince bağımsız değişkenler dışındaki etkiler her grupta aynı düzeyde tutulmuş, bağımlı değişkenler arasındaki farklılıklar karşılaştırma ile analitik açıdan değerlendirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Proje kapsamında yürütülen hücre kültürü, RNA izolasyonu, cDNA sentezi deneyleri 16.04.2012 - 01.05.2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneyleri 18.02.2013 - 20.02.2013 tarihleri arasında Ankara ATQ Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Proje kapsamında Nöroblastom hücre hatları örnek olarak kullanıldığı için, bu araştırmanın evreni ve örneklimi bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan yedi adet hücre hattı Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında geçmiş projelerden elde edilip çoğaltılmış ve uygun koşullarda saklanmış olan Nöroblastom hücre hattı örneklerinden temin edilmiştir. Bu hücre hatlarından iki tanesinde *MYCN* amplifikasyonu bulunmazken, diğer beş tanesinde *MYCN* amplifikasyonu bulunmaktadır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Proje kapsamı; araştırma, deneysel ve analiz sırasında oluşacak problemlere yanıt aramak ve örnekleri test etmek amacı ile belgesel ve deneysel olmak üzere iki başlık altında modellenmiştir.

Araştırmanın belgesel kısmını oluşturan bilgi ve verilerin bulunduğu literatürlerin taraması, U.S. National Library Medicine Pubmed veritabanı kullanılarak EndNote yazılım ortamına indirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bilgilerin derlenmesi, konu ile ilgili ana başlıkların MeSH anahtar sözcükleri ile taranması sonucunda, makalelerin künye ve özetlerine erişilmesi ile sağlanmıştır.

Araştırmanın deneysel yapılandırılması bir dizi değişkenlere bağlanarak, elde edilecek verilerin karşılaştırılması temeline dayandırılmıştır. Teste tabi tutulacak *MYCN* amplifikasyonu belirlenen hücre hatları ile *MYCN* amplifikasyonu taşımayan hücre hatları bağımsız değişkenler ve kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. İlk bağımlı değişken olarak, epigenetik değişikliklerde rolü bulunduğu bilinen seksen dört (84) genin ifade örüntüleri arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma, ifade açısından sabitliği bilinen üç (3) farklı genin kontrol grubu ile eşitlenmesi sonucunda ortaya çıkmıştır. İkinci bağımlı değişken olarak, ilk bağımlı değişkenin anlam kazanması amacı ile yedi (7) farklı hücre hattı kullanılmış ve bu sayede değerlendirme genişletilmiştir. Projede bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerinde etkisi bulunmadığından varyans hesaplamasına gerek duyulmamıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 1: Projede kullanılan mevcut makine-teçhizat listesi

ADI/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Hava akışkanlı kabinet/Nüve MN 090	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
CO2 inkübatörü/Sanyo MCO-5AC	Hücrelerin belli sıcaklık ve CO2 içeren ortamda büyütülmesi amacıyla kullanılmıştır.
PCR cihazı/PeqLab Biotechnologie GmbH	Ters transkripsiyon ve cDNA sentezi için kullanılmıştır.
İnverted mikroskop/Olympus CKX41	Hücrelerin kontrolü ve hücre sayımı amacıyla kullanılmıştır.
Su Banyosu/Polyscience Digital Temperature Controller	Hücre ortamları ve kimyasallar için kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj/Sigma 2-6	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Buzdolabı (-20°C,+4°C)/ Bosch	Kimyasalların saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-80°C)/Hettich Freezer	Hücrelerin saklanması için kullanılmıştır.
Nanodrop/Thermo Scientific 2000	DNA ve RNA miktarlarını ölçmek için kullanılmıştır.
RT PCR cihazı/Rotor-Gene Q	Gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılmıştır.

3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler

Tablo 2: Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler

Maddenin Adı	Markası-Cat No:
RPMI 1640 besi ortamı	Lonza/BE12-167F
DMEM besi ortamı	Lonza/BE12-733F
Penicillin/Streptomycin	Gibco/15140
L-Glutamin	Gibco/25030
NE amino asitler	Gibco/1140-035
Fetal Dana Serum (FBS)	Gibco/ 10500
Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	Lonza/BE17-516F
RNA izolasyon kiti	Qiagen RNeasy Minikit/ 74104
cDNA sentez kiti	Qiagen RT ² HT First Strand Kit/ 330441
RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	Qiagen/330620
100 kuyucuklu dizin	Qiagen Custom RT ² Profiler PCR Arrays/ 330131

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Çalışmanın süresi 24 ay olarak planlanmıştır. Çalışma çizelgesi aşağıda gösterildiği gibidir.

Tablo 3: Araştırmanın öngörülen çalışma süresi

Ay	3	6	9	12	15	18	21	24
Literatür İzleme								
Hazırlık								
Deney Optimizasyonları								
Veri Toplama								
Veri Analizi								
Çözümleme								
Makale ve Tez Yazımı								

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. Hücre Hattı Seçimi

Homo sapiens NB hücre hatları, *MYCN* amplifikasyonuna sahip ve sahip olmayan olarak iki grupta seçilmiştir. Bu hücre hatlarına ait bilgiler www.atcc.org (erişim tarihi 17.01.2013) ve www.dsmz.de (erişim tarihi 17.01.2013) internet sitelerinden elde edilmiştir.

3.8.1.1. KELLY Hücre Hattı: (DSMZ no: ACC 355)

Yapışkan, nöritik birleşmeler ile yuvarlak yapıya erişebilen, tek ve çoklu tabakalar halinde üreyebilen bir NB hücre hattıdır.

MYCN amplifikasyonuna sahiptir.

%90 RPMI1640 + %10 FBS +2 mM L-glutamin içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

3-6 gün arasında tripsin/EDTA kullanılarak 1:3-1:10 bölme oranı ile pasajı yapılabilir.

%70 RPMI1640 + %20 FBS + %10 DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 3x10⁶/ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.1.2. SIMA Hücre Hattı: (DSMZ no: ACC 164)

Bipolar hücre şekline sahip, merkezden çevreye doğru odak noktası etrafında tek tabaka halinde üreyebilen bir NB hücre hattıdır.

MYCN amplifikasyonuna sahiptir.

%90 RPMI1640 + %10 FBS + 2 mM L-glutamin içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

3-5 gün arasında tripsin/EDTA kullanılarak 1:3-1:5 bölme oranı ile pasajı yapılabilir.

%70 RPMI1640 + %20 FBS + %10 DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 1-2x10⁶/ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.1.3. IMR-32 Hücre Hattı: (DSMZ no: ACC 165)

Fibroblast-benzeri yapışkan, tek tabaka halinde üreyebilen bir NB hücre hattıdır.

MYCN amplifikasyonuna sahiptir.

80% RPMI1640 + 20% FBS + 2 mM L-glutamin + 1x esansiyel olmayan aminoasitler içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

3-5 gün arasında şişeye darbe veya pipetleme yöntemi ile 1:2 bölme oranı ile pasajı yapılabilir.

70% RPMI1640 + 20% FBS + 10% DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 1.5×10^6 /ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.1.4. MHH-NB-11 Hücre Hattı: (DSMZ no: ACC 157)

Yapışkan, fibroblast-benzeri tek tabaka halinde üreyebilen bir NB hücre hattıdır.

MYCN amplifikasyonuna sahiptir.

%90 RPMI 1640 + %10 FBS + 2 mM L-glutamin + 1x esansiyel olmayan aminoasitler içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

4 günde bir tripsin/EDTA kullanılarak 1:2 bölme oranı ile pasajı yapılabilir. Besi ortamının asitliğinden kaynaklı hücrelerde kümelenme oluştuğundan tripsin muamelesinden sonra şırınga yardımı ile hücreler ayrıştırılır.

%70 RPMI 1640 + %20 FBS + %10 DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 3×10^6 /ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.1.5. CHP-126 Hücre Hattı: (DSMZ no:ACC 304)

Süspanse halde kümeler şeklinde üreyebilen küresel hücrelerden oluşur. Poly-L-lizin kaplı şişelerde yarı-yapışkan ve tek tabaka halinde üreyebilen NB hücre hattıdır.

MYCN amplifikasyonuna sahiptir.

%80 RPMI 1640 + %20 FBS + 2 mM L-glutamin içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

3-5 günde bir santrifüj ile hücreler çöktürülerek 1:2-1:3 bölme oranı ile pasajı yapılabilir. Kümeleşen hücreleri ayırmak amacı ile bölme işleminden sonra pipet aracılığı ile hücreler ayrıştırılır.

%70 RPMI 1640 + %20 FBS + %10 DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 4×10^6 /ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.1.6. SH-SY5Y Hücre Hattı: (DSMZ no: ACC 209)

Epitelyum/nöron benzeri uzamış tek tabaka ve hücre kümeleri halinde üreyebilen NB hücre hattıdır. Kümelerin yapıştığı yüzeyden kalkıp süspanse halde büyümelerinden dolayı hücreler şişe çeperini tamamen kaplayacak kadar üremezler.

MYCN amplifikasyonuna sahip değildir.

%80-85 Dulbecco's-MEM + %15-20 FBS + 2 mM L-glutamin içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

Haftada bir besi ortamı santrifüj işlemi ile çöktürülerek ve yapışkan hücreler tripsin/EDTA kullanılarak 1:2-1:3 bölme oranı ile pasajı yapılabilir. Kümeleşen hücreleri ayırmak amacı ile bölme işleminden sonra pipet aracılığı ile hücreler ayrıştırılır.

%70 Dulbecco's-MEM + %20 FBS + %10 DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 2×10^6 /ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.1.7. SK-N-AS Hücre Hattı: (ATCC no: CRL-2137)

Yapışkan, epitelyum-benzeri bir NB hücre hattıdır. Beyin ve kemik iliği dokularından elde edilir.

MYCN amplifikasyonuna sahip değildir.

%90 Dulbecco's-MEM + %15-20 FBS + 2 mM L-glutamin + 0.1mM esansiyel olmayan amino asitler içeren besi ortamında üreyebilir.

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

Haftada iki kere tripsin/EDTA kullanılarak 1:5-1:10 bölme oranı ile pasajı yapılabilir.

%95 besi ortamı + %5 DMSO içeren dondurma solusyonu içinde 1×10^6 /ml olacak şekilde dondurulabilir.

3.8.2. Hücre Kültürü

3.8.2.1. Hücre Çözme Protokolü

Tablo 4: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler ve miktarları

	KELLY	SIMA	IMR-32	MHH-NB-11	CHP-126
RPMI 1640	45ml (%90)	45ml (%90)	40ml (%80)	45ml (%90)	40ml (%80)
FBS	5ml (%10)	5ml (%10)	10ml (%20)	5ml (%10)	10ml (%20)
L-Glutamin	100µl (%1) 2mM	100µl (%1) 2mM	100µl (%1) 2mM	100µl (%1) 2mM	100µl (%1) 2mM
Penicilin/Streptomycin	100µl (%1)	100µl (%1)	100µl (%1)	100µl (%1)	100µl (%1)
Esansiyel olmayan amino asitler			100µl (0.1mM)	100µl (0.1mM)	
	50ml	50ml	50ml	50ml	50ml

Tablo 5: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler ve miktarları

	SH-SY5Y	SK-N-AS
D-MEM	40ml (%80)	40ml (%80)
FBS	10ml (20)	10ml (20)
L-Glutamin	100µl (%1) 2mM	100µl (%1) 2mM
Penicilin/Streptomycin	100µl (%1)	100µl (%1)
Esansiyel olmayan amino asitler		100µl (0.1mM)
	50ml	50ml

1. Tabloda belirtilen maddeler 50ml'lik falkon tüp içerisinde pipet aracılığı ile karıştırıldı. Kullanımdan sonra +4°C' de muhafaza edildi.
2. Hücre kültürü için kullanılan su banyosu 37°C'ye ısıtıldı.
3. Hazırlanan besi ortamı su banyosu içinde ısıtıldı.
4. Düzey 2 kabinet (Nüve/MN090) UV lambası açılarak 15 dakika boyunca sterilize edildi.
5. Sterilizasyon işlemi sonrası hücre kültüründe kullanılacak besi ortamları, steril pipetler, flasklar ve pipet uçları %70 etil alkol ile temizlenerek kabinet içine alındı.
6. -80°'de cryovial tüpler içinde dondurulmuş hücre hatları alınarak 37°C'ye ısıtılmış su banyosu içinde hızlı bir şekilde çözüldü.
7. Çözme işleminden sonra hücreler içinde 5 ml ortam bulunan 10 ml'lik santrifüj tüpüne pipet aracılığı ile aktarıldı.
8. Hücreler santrifüj cihazı ile 5 dakika boyunca 1000 g'de çöktürülerek DMSO'dan arındırıldı.
9. Tüp içindeki ortam pipet aracılığı ile uzaklaştırılarak çöken hücreler üzerine besi ortamı eklendi.
10. Pipetleme işlemi ile hücreler süspanse hale getirilerek 25 mm²'lik flaska aktarıldı.
11. Flask 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren steril inkübatöre kaldırıldı ve hücre kültürünün büyüme süresine uygun olarak inkübatörde bekletildi.

3.8.2.1.1. Yapışkan Hücre Hattı Pasaj Protokolü

1. Hücreler %70 oranında flaskın tabanını kaplamış ise pasaj yapıldı. Bu aşamada flask içindeki hücreler mikroskop altında incelendi. Su banyosu 37°C'ye ısıtıldı.
2. Hazırlanan besi ortamı ve tripsin/EDTA su banyosu içinde 37°C'ye ısıtıldı.
3. Düzey 2 kabinet (Nüve/MN 090) UV lambası açılarak 15 dakika boyunca sterilize edildi.
4. Sterilizasyon işlemi sonrası hücre kültüründe kullanılacak besi ortamları, steril pipetler, flasklar ve pipet uçları %70 etil alkol ile temizlenerek kabinet içine alındı.
5. Flaskın içindeki ortam pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
6. 4 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) hücreler üzerine pipet aracılığı ile eklenerek yıkama yapıldı, PBS uzaklaştırıldı.
7. 1-2 ml Tripsin/EDTA karışımı 25 mm²'lik flaska eklendi, hücreler yüzeyden ayrılana kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
8. Tripsin inaktivasyonu için 6 ml FBS içerikli besi ortamı pipet aracılığı ile flaska eklendi.
9. Flask içindeki ortam-hücre karışımı pipetleme işlemi ile süspanse hale getirilerek hücre hattının bölünebilme oranında bir miktar çekilerek yeni 25 mm²'lik flasklara aktarıldı.
10. Flask içindeki miktar 4 ml olacak şekilde üzerine besi ortamı eklendi.
11. Elde edilen flasklar 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ altında inkübasyona bırakıldı.

3.8.2.1.2. Süspanse Hücre Hattı Pasaj Protokolü

1. Hücre hattının büyüme potansiyeline uygun bekleme süresi sonrasında hücre yoğunluğu uygun görülen flasklar pasaj için ayrıldı. Bu aşamada flask içindeki hücreler mikroskop altında incelendi.
2. Su banyosu 37°C'ye ısıtıldı.
3. Hazırlanan besi ortamı su banyosu içinde 37°C'ye ısıtıldı.
4. Düzey 2 kabinet, UV lambası açılarak 15 dakika boyunca sterilize edildi.
5. Sterilizasyon işlemi sonrası hücre kültüründe kullanılacak besi ortamları, steril pipetler, flasklar ve pipet uçları %70 etil alkol ile temizlenerek kabinet içine alındı.
6. Flaskın içindeki hücre-besi ortamı karışımı pipet aracılığı ile 10 ml'lik propilen santrifüj tüpüne aktarıldı.

7. Tüp içindeki karışım 5 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü.
8. Tüp üzerinde kalan besi ortamı pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
9. Yıkama işlemi için tüp içerisine 5 ml PBS eklendi ve pipetleme işlemi ile hücreler süspanse hale getirildi.
10. Tüp içindeki karışım 5 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü.
11. Tüp üzerinde kalan PBS pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
12. Tüp içerisine 4 ml besi ortamı eklenerek pipetleme işlemi ile hücreler süspanse hale getirildi.
13. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre üzerine 10 µl Tryphan Blue boyası ve 30 µl besi ortamı eklenerek pipetleme işlemi ile karıştırıldı.
14. Neubauer lamı üzerine lamel kapatıldı.
15. 1:5 oranında dilüsyonu yapılan hücre çözeltisinden 10 µl alınarak neubauer lamı ile lamel arasına pipet aracılığı ile yerleştirildi.
16. Mikroskop altında boyayı içine almayan hücreler sayıldı. Sayma işlemi 10 kare belirlenerek yapıldı.
17. $[(\text{hücre sayısı}/10) \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4 = \text{hücre sayısı/ml}]$ formülünden 1ml içindeki hücre miktarı bulundu ve flask içindeki 4 ml'lik çözelti içindeki hücre miktarı hesaplandı.
18. Hücre hattının bölünebilme oranında (split ratio) bir miktar pipet ile çekilerek 25 mm²'lik flaslara aktarıldı.
19. Flask içindeki miktar 4 ml olacak şekilde besi ortamı eklendi.
20. Elde edilen flasklar 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.8.3. RNeasy mini kit ile hayvan hücresinden RNA izolasyonu

1. RNA izolasyonu yapılacak bölge yüzeyi DEPC içeren su ile muamele edildi.
2. Kullanılacak kit içerikleri, pipetörler ve pipet uçları DEPC içeren su ile muamele edildi.
3. Kit içerisinde bulunan RPE tamponuna hacminin 4 katı miktarda %96 etil alkol eklendi.
4. Flask içindeki besi ortamı pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
5. Hücreler 4 ml PBS ile yıkandıktan sonra PBS pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
Süspanse hücre hattı pasajında hücre-besi ortamı polipropilen santrifüj tüpüne aktarılarak 5 dakika boyunca 1000 g'de çöktürüldü ve besi ortamı pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı. Bu sebeple süspanse hücre hatları için tripsin/EDTA muamelesi yapılmadı.
6. Yıkama işleminden sonra flaska 1-2 ml tripsin/EDTA karışımı eklenerek hücreler yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı.
7. Tripsin/EDTA miktarının 3 katı kadar FBS içeren besi yeri eklenerek tripsin inaktive edildi.
8. Karışımdan 100 µl alınarak 100 µl tryphan blue boyası ile karıştırıldı. Neubauer lamı ile hücre miktarı tayin edildi. Süspanse hücre hatları için bu işlem santrifüj öncesi yapıldı.
9. Örnek, pipet aracılığı ile 5×10^6 hücre yoğunluğuna sahip miktarı flasktan polipropilen santrifüj tüpüne transfer edildi.
10. Hücreler 5 dakika boyunca 300 g'de santrifüj edildikten sonra üstte kalan besi ortamı pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
11. Tüpe 350 µl RTL tamponu ve 350 µl %70 etil alkol eklenerek pipetleme işlemi ile hücreler parçalandı.
12. Homojenize edilen hücre-tampon karışımı pipet aracılığı ile 2 ml'lik toplama tüpü içine yerleştirilmiş RNeasy spin kolonuna aktarıldı ve kolonun kapağı kapatıldı.
13. Tüp 15 saniye boyunca en yüksek hızda (10000 g) santrifüj edildi.
14. Santrifüj sonrası RNA kolona yapışırken hücre kalıntıları çözelti ile beraber toplama tüpünde birikti. Toplama tüpündeki solüsyon uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüp içine yerleştirildi.
15. Kolon içine 700 µl RWI tamponu eklendi, kolonun kapağı kapatıldı.
16. Tüp 15 saniye boyunca en yüksek hızda (10000 g) santrifüj edildi.

17. Santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken solüsyon uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüp içine yerleştirildi.
18. Kolon içine 500 µl RPE tamponu eklendi, kolonun kapağı kapatıldı. RPE tamponu kolonun yıkanması ve RNA harici hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için kullanıldı.
19. Tüp 15 saniye boyunca en yüksek hızda (10000 g) santrifüj edildi.
20. Santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken solüsyon uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüp içine yerleştirildi.
21. Kolon içine 500 µl RPE tamponu tekrar eklendi, kolonun kapağı kapatıldı.
22. Tüp 2 dakika boyunca en yüksek hızda (10000 g) santrifüj edildi.
23. Kolon yeni bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerinde 30-50 µl arası RNaz-free su eklendi, kolonun kapağı kapatıldı.
24. Tüp 1 dakika boyunca en yüksek hızda (10000g) santrifüj edildi.
25. Santrifüj sonrası kolona yapışan RNA su ile çözünerek solusyon içinde kaldı, böylece hücre kalıntılarından ayrılmış saf bir DNA elde edildi.
26. RNA'nın saflığını ve miktarını anlamak için nanodrop cihazı ile optik yoğunluğu (O.D.) ölçüldü. RNA için 260 nm'de ve 1cm'lik saptama bölgesinde 1.0 absorbans değeri 40 µg/ml olduğundan ölçümler 40 değeri üzerinden yapıldı. Ölçümler 3 kere tekrarlanıp hesaplanan yoğunluk değerlerinin ortalaması alındı.
27. $A_{260}:A_{230}$ değeri 1.7'den büyük ve $A_{260}:A_{280}$ değeri 1.8 ile 2.0 arasında olan RNA örnekleri cDNA sentezine uygun olarak belirlenip, bu değerlere sahip örnekler -80°C'ye kaldırılıp bekletildi.

3.8.4. RT First Strand Kit ile cDNA sentezi

1. cDNA sentezi yapılacak bölge yüzeyi DEPC içeren su ile muamele edildi.
2. Kullanılacak kit içerikleri, pipetörler ve pipet uçları DEPC içeren su ile muamele edildi.
3. Kit içerisinde bulunan GE2 ve BC4 solüsyonları muhafaza edildiği -20°C'den çıkartıldı ve buz üzerinde çözüldü.
4. RNA örnekleri muhafaza edildiği -80°C'den çıkartıldı ve buz üzerinde çözüldü.
5. 500 µl'lik steril PCR tüpüne 8µl RNA örneği aktarıldı.
6. RNA örneği üzerine 6 µl GE2 solusyonu eklendi ve pipet aracılığı ile iyice karıştırıldı.
7. Tüp 1 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildi.
8. Tüp PCR cihazı içerisinde 5 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.
9. Tüp içerisine 6 µl BC4 solusyonu (ters transkripsiyon karışımı) eklendi ve pipet aracılığı ile iyice karıştırıldı.
10. Tüp 1 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildi.
11. Ters transkripsiyon işlemi için PCR cihazı programlandı. Program 42°C'de 15 dakika, ardından 95°C'de 5 dakika ve 4°C sonsuzda bekletme olacak şekilde 1 döngü olarak ayarlandı. PCR cihazının kapağı kapatıldı ve işlem başlatıldı.
12. Ters transkripsiyon işleminin ardından cDNA'nın saflığını ve miktarını anlamak için nanodrop cihazı ile optik yoğunluğu (O.D.) ölçüldü. DNA için 260nm'de ve 1cm'lik saptama bölgesinde 1.0 absorbans değeri 50 µg/ml olduğundan ölçümler 50 değeri üzerinden yapıldı. Ölçümler 3 kere tekrarlanıp hesaplanan yoğunluk değerlerinin ortalaması alındı.
13. Ölçüm işlemi sonrasında örnekler alınıp -20°C'de muhafaza edildi.

3.8.5. RT² Profiler PCR Dizin için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. -20°C'de muhafaza edilen 2X RT² SYBR Gren ROX FAST Mastermix ve cDNA sentez reaksiyonu santrifüj ile çöktürüldü.
2. 2X RT² SYBR Gren ROX FAST Mastermix içeriğindeki HotStart DNA Taq Polimeraz enzimi sadece ısı ile aktive olduğu için reaksiyon oda sıcaklığında hazırlandı.

Tablo 6: Gerçek zamanlı PCR analizi için hazırlanan karışım

Dizin Formatı	Rotor-Gene 100
2x RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	1150µl
cDNA sentez reaksiyonu	102µl
RNase-free su	1048µl
Total hacim	2300µl

3. Tabloda belirtilen hacimlerdeki PCR içerikleri 5 ml steril propilen tüp içerisine pipet aracılığı ile eklendi, tüpün kapağı kapatıldı.
4. Tüp içerisindeki içerikler çalkalama yöntemi ile karıştırıldı. Çözelti üzerinde oluşan hava kabarcıkları pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı.
5. -20°C'de muhafaza edilen RT² Profiler PCR dizini kapalı poşetinden çıkarılarak QIAgility pipetleme cihazına yerleştirildi. Pipetleme işlemi için gerekli 50 µl'lik steril pipet uçları ve 5 ml'lik tüp içerisinde hazırlanan PCR içeriği cihazın uygun kısımlarına yerleştirildi.
6. QIAgility cihazı her kuyucuğa 20 µl içerik aktaracak şekilde programlandı.
7. İşlem tamamlandıktan sonra dizin cihazdan çıkarılıp Rotor-Disc Heat Sealer cihazı ile Rotor-Disc Heat Sealing filmi dizin üzerine kaplandı.
8. RT² Profiler PCR Dizin, Rotor-Disc100 kilitleme yüzüğü içerisine sabitlendi ve Rotor-Disc 100 Gerçek Zamanlı PCR cihazı içerisine yerleştirildi.

Tablo 7: Rotor-Gene Q cihazı için uygun döngü profili

Döngü sayısı	Zaman	Sıcaklık	Yorum
1	10 dakika	95°C	HotStart DNA Taq Polimeraz aktive edilir.
40	15 saniye 30 saniye	95°C 60°C	Floresans veri toplama döngüsü

9. Tabloda belirtilen sıcaklık ve döngü sayısı programa yüklenip gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu başlatıldı.
10. İşlem sonrasında eşik değeri belirlenip ekspresyonun başladığı döngüyü ifade eden C_T değerlerine ulaşıldı.

3.8.6. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.6.1. $\Delta\Delta CT$ Yöntemi İle Verilerin Değerlendirilmesi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun temeli, floresan ışımaya yapabilen işaretleyici moleküllerin ışımaya miktarlarının tespitine dayanmaktadır. Reaksiyonda döngü sayısı arttıkça nükleik asit miktarında gözlenen artış floresans ışımaya miktarı ile belirlenir [258].

Göreceli gen ifadesi, ilgili genin verilerinin bazı kalibrasyon öğelerine veya içsel kontrol genlerine bağlı olarak elde edilmesidir. Göreceli gen ifadesinin belirlenmesinde sıkça kullanılan yöntem karşılaştırmalı CT yöntemidir ve ' $2^{-\Delta CT}$ ' ile ifade edilir [259]. CT yöntemi ilgili genin ifadesinin test ile referans örnek arasındaki farklılığını belirlemek amacı ile kullanılır [260].

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda nicel olarak ölçüm yapılabilen döngüye eşik değeri döngüsü (CT) denir. Bu eşik değeri ürün oluşumunun lineer fazdan logaritmik faza geçiş noktasını, başka bir deyişle amplifikasyonun eksponansiyel artışının başladığı noktayı ifade etmektedir. Sayısal olarak CT değeri reaksiyondan elde edilecek ürün miktarı ile ters orantılıdır [261].

Göreceli ölçümde gerçek zamanlı PCR verisi, ilgili genin iç kontrol deneni başka bir genin ifadesine bağıntılı değerini vermektedir.

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ eşitliği kullanılmaktadır. Bu eşitlikte iki farklı örnek içinde ifadesi belirlenen ilgili gen ve bu genlerin ifade

düzeylerini belirlemek için kullanılan içsel kontrol genleri kullanılmaktadır. Örneklerden ilki ifadesinde farklılık aranan geni içermektedir. Bu farklılık kanser hücresinde ifade değişikliği, ilaca maruz kalmış hücrelerdeki ifade değişikliği veya mutasyon belirlenen genin ifade değişikliği olabilir. İkinci örnek ise kontrol grubu olarak, ilgili genin normal koşullarda ifadesinin belirlenmesi için kullanılır. Normalize edilmiş bu eşitlik $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile formüle edilir ve 'kat-değişim' olarak isimlendirilir [259]:

$$\Delta\Delta CT = [\text{Örnek 1}(\text{CT ilgili gen} - \text{CT iç kontrol}) - \text{Örnek 2}(\text{CT ilgili gen} - \text{CT iç kontrol})]$$

İç kontrol gen olarak, ifade düzeyi her hücrede sabit olan 'housekeeping' genleri kullanılır [262]. Bu genlerin ifade düzeylerinin sabitlenmesi hususunda, daha doğru sonuç elde edilmesi açısından 3 ya da 4 tane kullanılması önerilmektedir. Genlerin ifade düzeylerinin her döngüde exponansiyel olarak artmasından kaynaklı, kullanılan genlerin CT değerlerinin normalizasyonu geometrik ortalama ile hesaplanır. Geometrik ortalama ile bulunan değer, aritmetik ortalama ile bulunan değerden daha doğrudur [263,264].

Geometrik ortalama formülü şöyledir:

$$\text{Geometrik ortalama} = \sqrt[n]{a_1 a_2 \dots a_n}$$

a = 'housekeeping' genlerin CT değerleri

n = işleme koyulan 'housekeeping' gen sayısı

Elde edilen CT verilerinin analizi için <http://www.sabiosciences.com/> (erişim tarihi 24.03.2013) internet sitesinde bulunan PCR-dizin verisi analiz programı kullanılmıştır. Analiz sırasında *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan hücre hatlarındaki hedef genlerin genel ve bireysel ifade düzeylerindeki değişiklikler belirlenmiştir. Buna ek olarak *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatlarındaki hedef genlerin ifade düzeyleri bireysel olarak belirlenmiştir. Veri analizi şu şekilde yapılmıştır:

1. Gerçek zamanlı PCR sonucu elde edilen CT değerleri Excel dosyasına aktarıldı.
2. Rotorgene cihazı için amplifikasyonun sınır döngüsü 33 olduğundan dolayı, bu değer üstündeki değerler ve değeri olmayan kısımlar yerine 33 yazıldı.

3. Veri analiz programı bulunan <http://www.sabiosciences.com/> (erişim tarihi 24.03.2013) internet sitesine gidildi ve 'Kaynaklar' (Resources) menüsünden 'Veri analizi' (Data Analysis) sekmesi seçildi.
4. Açılan sayfada deney için kullanılan 'RT² Profiler PCR Dizin' başlığı altındaki 'Web-based software for Cataloged and Custom Arrays' seçildi.
5. Yeni açılan sayfada 'Standard RT² PCR Array' düğmesine basıldı ve sayfanın sağında çıkan 'Select Cataloged PCR Array' kısmından deneyde kullanılan dizinin katalog numarası olan PAHS-085Z seçildi.
6. Aynı sayfada bulunan 'File' kısmına elde edilen CT değerlerinin Excell formatı yüklendi ve 'Upload' düğmesine basıldı.
7. Elde edilen veriler analiz programına yüklendikten sonra, sol sütunda dizin üzerindeki gen sembolleri ve bulundukları kuyucuk numarası ortaya çıktı. Kuyucuk numarasından veya gen sembollerinden faydalanarak genlerin ifade düzeylerini sabitlemek amacı ile kullanılacak olan 'housekeeping' genler işaretlendi. Dizin üzerinde bulunan beş 'housekeeping' genden HPRT1 geninin CT değeri diğerlerine nazaran yüksek ve RPLP0 geninin CT değeri diğerlerine nazaran düşük olduğu için bu genler normalizasyon için kullanılmazken kalan üç gen işaretlendi.
8. MYCN amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları, isimlerinin altında bulunan grup seçimi düğmesinden 'kontrol grubu' olarak işaretlenirken diğer hücre hatları 'grup 1' olarak bırakıldı.
9. Gen sembollerinin üst kısmında bulunan 'update' düğmesine basılarak gruplar sabitlendi.
10. Sabitlemenin ardından 'Select Housekeeping Genes' düğmesine basılarak normalizasyon işlemi başlatıldı. Açılan sayfada yöntem seçimi kısmında 'manuel seçim' belirlendi. Normalizasyon geometrik ortalama ile yapıldı ve CT eşik değeri Rotor-Gene Q için tavsiye edilen '33' sayısına çekildi. 'Perform Normalization' tuşuna basılarak analiz başlatıldı.
11. Normalizasyon işleminden sonra 'Analysis' kısmına geçildiğinde, kontrol grubu ve test grubu için elde edilen ortalama ΔCt ile $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri, her genin p-değeri ve test grubundaki gen ifadelerinin kontrol grubundakilere göre azalış ya da artış miktarları elde edildi.

12. 'Plots and Charts' kısmına geçildiğinde yapılan analize en uygun olduğu düşünülen 'Scatter Plot' seçildi ve genlerin kat düzenlemeleri (fold-regulation) tablo üzerinde görüldü. Tablonun üzerindeki 'Export Data' tuşundan tablo verileri Excel formatında elde edildi.
13. Grafik verilerinin ardından 'Export Data' kısmından analiz sonucu elde edilen veriler Excel formatında elde edildi.

3.8.6.2. MYCN Transkripsiyon Faktörü ile İlgili Genler Arasındaki İlişkinin JASPAR Veritabanı Aracılığı ile Araştırılması

Genlerin değişmeyen bir kümesinden farklı hücre tiplerinin oluşturulması gen aktivitesini düzenleyen biyokimyasal süreçler tarafından yönetilir. Gen ifadesinde ilk adım olan transkripsiyon, düzenleyici mekanizmaların merkezini oluşturmaktadır. Transkripsiyon, transkripsiyon faktörlerinin (TF) DNA dizisinde bulunan cis-düzenleyici elemanlarına bağlanması ve ilave kofaktörlerin kromatin yapısını tanınması ile şekillenir. Transkripsiyon faktörlerinin de içinde bulunduğu trans-işleyen proteinler, cis-düzenleyici dizilere bağlanarak genlerin ifade düzeylerini kontrol ederler [265].

Genlerle bağlantılı cis-düzenleyici dizilerin belirlenmesi için kullanılan hesaplama yöntemleri ile tanımlanabilmesi için zor laboratuvar yöntemleri ve uzun uğraşlar gerektirmektedir. Gen analizindeki ilk adım, düzenleyici kontrol elemanlarını barındırma potansiyeli olan büyük bölgeleri belirlemektir. Çeşitli hesaplama araçları sonucunda cis-düzenleyici elemanların yeri hakkında tahmin yürütebilmeyi kolaylaştırmıştır. Bu araçlar, promotör (transkripsiyon başlama konumu; TSS) ve hızlandırıcı bölgelerin (enhancer) tespiti olarak iki kategoriye ayrılırlar. Kullanılan yöntemler, ortolog genler arasındaki korunmuş dizileri (filogenetik footprinting), nükleotid birleşimlerini ve mevcut ifade verilerinin değerlendirilmesini incelerler. Veri toplama sürecinde, düzenleyici dizilerin transkripsiyon başlama konumuna yakın bölgelerde aranması ve en çok bu bölgelerde bulunması bilgisinin çıkış noktası, deneysel açıdan ispatlanmış verilere göre distal bölgelerdeki düzenleyici dizilere nazaran işlevsel önemi yüksek olan düzenleyici dizilerin çoğunun TSS noktasına yakın olduğu bilgisidir. Buna karşın, transkripsiyon başlama konumunun belirlenmesi güç olabilir. Bunun sebebi, artan sayıda genin değişik başlangıç konumlarını seçerek kullanması ile durumun karmaşıklaşmasıdır [266].

'Eukaryotic Promoter Database (EPD)' algoritması, promotör tahmini için kullanılan referans koleksiyonlarından biridir [267]. Bu veritabanının kullandığı yeni nesil algoritma, promotör bölgesi tahmini için birden fazla TSS içeren promotör dizi bilgisini sunmaktadır. Birçok genin birden fazla transkripsiyon başlama konumuna sahip olduğu göz önüne alındığında, bu değişiklik biyokimyasal açıdan doğru olmaktadır. İnsan genomunda promotör dizilerin baskın özelliği CpG dinükleotidleri fazlalıkla bulundurmasıdır. DNA metilasyonu, gen aktivitesini düzenleme açısından önemli bir rol oynamaktadır. Düzenleyici dizilerdeki CpG dizileri metillenmemiş durumdadır. Buna karşın diğer bölgelerde bulunan CpG dizilerinin %80'i sitozin nükleotidinden metillenirler ve sitozin nükleotidi yüksek oranda adenozine dönüşür. Bunun sonucunda düzenleyici bölgeler dışında kalan dizilerde CpG dizileri %20'ye kadar azaltılır ve düzenleyici dizinin bulundurma gereken CpG miktarını karşılayamazlar. Hesaplama açısından CG dinükleotidleri arasındaki dengesizlik promotör dizisi içerebilecek bölgelerin bulunmasında güçlü bir araç olarak kullanılabilir [268].

Düzenleyici dizilerin hesaplanması ve analiz edilmesi genom ve transkriptom verilerinin yorumlanması açısından giderek daha önemli hale gelmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma özgünlüğünü belirleyen yüksek kaliteli modellere sahip olmak, cis-düzenleyici elemanlar hakkında güvenilir tahminlerde bulunmayı sağlar [266]. Bu modeller çoğunlukla, tahminsel TF bağlanma bölgelerinin boşluksuz hizalamalarını sağlayan matrisler tarafından oluşturulur [269]. JASPAR veritabanı, çok sayıda TF bağlanma bölgesi profiline sahip bir biyoinformatik araçtır [270-275]. JASPAR veritabanını, çok hücreli ökaryotların yayınlanan TF bağlanma noktaları verilerini içermektedir. JASPAR CORE, deneysel açıdan kanıtlanmış olan 123 tane TF bağlanma bölgesi içermektedir [276]. Sandelin ve arkadaşları JASPAR veritabanında bulunan 174 tane phylo-FACTS matrisi ile JASPAR-CORE matrislerini benzerlik açısından değerlendirmek için Pearson İlişki Katsayısı'nı (PCC) kullanmışlardır. Sonuç olarak JASPAR-CORE aracının içerdiği memeli matrislerinde 0.8'den yüksek bir benzerlik bulmuşlardır. 0.8 değeri PCC için yüksek benzerliği ifade eden deneysel bir değerdir [277]. Bilgisayar hesaplamaları sonucunda elde edilen potansiyel TF bağlanma bölgeleri hakkındaki bilgilerin çoğu deneysel açıdan kanıtlanmadığından ve hızlandırıcı bölgelerin uzunluğundan kaynaklı, JASPAR-

CORE deneysel açıdan kanıtlanmış bağlanma bölgeleri hakkında sınırlı miktarda bilgi verebilmektedir [278].

Yapılan bu çalışmada ifade düzeylerinde kontrol grubuna nazaran artış belirlenmiş genlerin promotör dizileri, 'Eukaryotic Promoter Database (EPD)' veritabanından elde edilmiştir (<http://epd.vital-it.ch/>, erişim tarihi 24.03.2013) . Bu diziler JASPAR veritabanında bulunan JASPAR CORE aracındaki MYCN transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi ile eşleştirilmiş ve genlerin ifade düzeylerindeki artışın *MYCN* amplifikasyonu ile ilişkisi araştırılmıştır (<http://jaspar.genereg.net/>, erişim tarihi 24.03.2013).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada gen ifadesi tespiti yalnızca Nöroblastom hücre hatları üzerinde yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak hücre hatlarını temsil edebilecek herhangi bir doku bulunmamasından kaynaklı normal doku ile Nöroblastom hücre hatları arasında gen ifadesi bakımından bir karşılaştırma yapılamamıştır. Araştırmanın temel elementinin hücre hattı olması nedeni ile elde edilen veriler tüm organizmayı temsil etmemektedir. *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda hücrelerin organizma içerisindeki komşu hücrelerle etkileşimleri göz ardı edilmektedir. Verilerin gerçeği tam yansıtması için, hayvan modelleri ile deneylerin devam ettirilmesi ve sonuçların karşılaştırılması gerekmektedir. Buna ek olarak kullanılan hücre hattı sayısının yedi(7) ile sınırlandırılması, araştırmanın genellenmesi açısından sınırlama getirebilir. Proje kapsamında ilgili genlerin ifade değişimleri mRNA düzeyinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilmiştir. Tespit edilen ifade değişimlerinin *MYCN* amplifikasyonu ile ilgisini araştırmak için, JASPAR veritabanında ilgili genlerin promotör dizileri ile *MYCN* transkripsiyon faktörünün bağlanma dizisi eşleştirilmiştir. Bağlanma dizisinin kısa ve dejenere olmasından kaynaklı, elde edilen yüzdeler tahminsel verilere dayanmaktadır. Literatür taramasında yeterli bilgi elde edilemediğinden ilgili genlerin ifade değişimlerinin *MYCN* geni amplifikasyonuna dayandırılabilmesi için “DNA footprinting” deneyleri gerçekleştirilmelidir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen verilerde analiz için yetersiz olan gen ifadelerine rastlanmıştır. Bu yetersizlikten kaynaklı elde edilen kat belirlemesi değerlerinden bir kısmı gerçeği ifade etmemektedir. *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonucunda, *in vivo* çalışmalarda gözlenmemesi düşünülen ifade değişimleri tespit edilmiştir. Çalışmanın hücre hatları ile birlikte Nöroblastom tümör dokuları ile de gerçekleştirilmesi daha kesin sonuçlar elde etmek için gerekli olabilir.

3.10. Etik Kurul Onayı

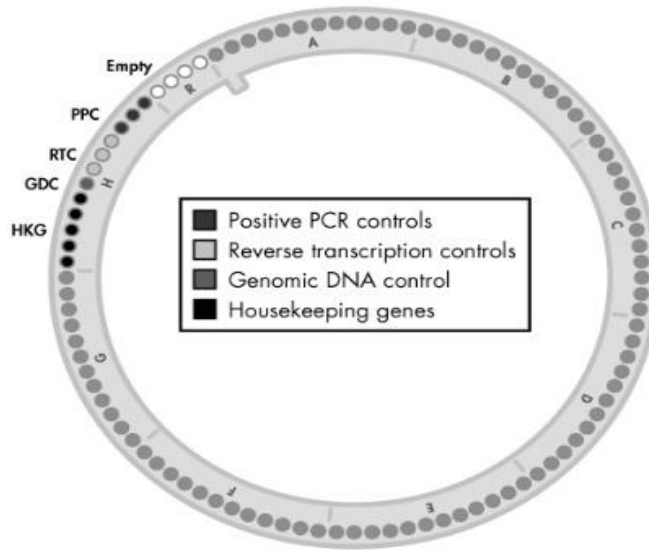
Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından KB.SAG.2012.051 sayı ile desteklenen “Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade Örüntüsünün Araştırılması” isimli proje Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulundan 15.12.2011 tarihinde alınan 2011/39-08 sayılı karar ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından desteklenen KB.SAG.2012.051 numaralı proje kapsamında SK-N-AS, SH-SY5Y, KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 Nöroblastom hücre hatlarında epigenetik değişiklikleri etkileyen 84 adet genin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmada yer alan hücre hatları *MYCN* geni amplifikasyonu olanlar ve olmayanlar olmak üzere iki farklı grupta incelenmiştir.

4.1. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunda elde edilen bulgular

MYCN amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları ile *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları arasında, ilgili genlerin ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar incelenmiştir. İnceleme için Qiagen Rotor-Gene Q gerçek zamanlı PCR cihazı ve 330231 PAHS-85ZR katalog numaralı RT² Profiler PCR Dizin kullanılmıştır.



Şekil 1: RT2 Profiler PCR dizin R Formatı. 1-84 kuyucuklar epigenetik faktörleri etkileyen genleri içermektedir. 85-89 arasındaki kuyucuklar normalizasyon için gerekli housekeeping genleri, 90 numaralı kuyucuk genomik DNA kontrolü ve 91-93 arasındaki kuyucuklar ters transkripsiyon kontrollerini içermektedir. 97-100 arasındaki kuyucuklar herhangi bir prob içermemektedir.

(<http://www.sabiosciences.com/Manual/1075380.pdf> erişim tarihi 20.03.2013)

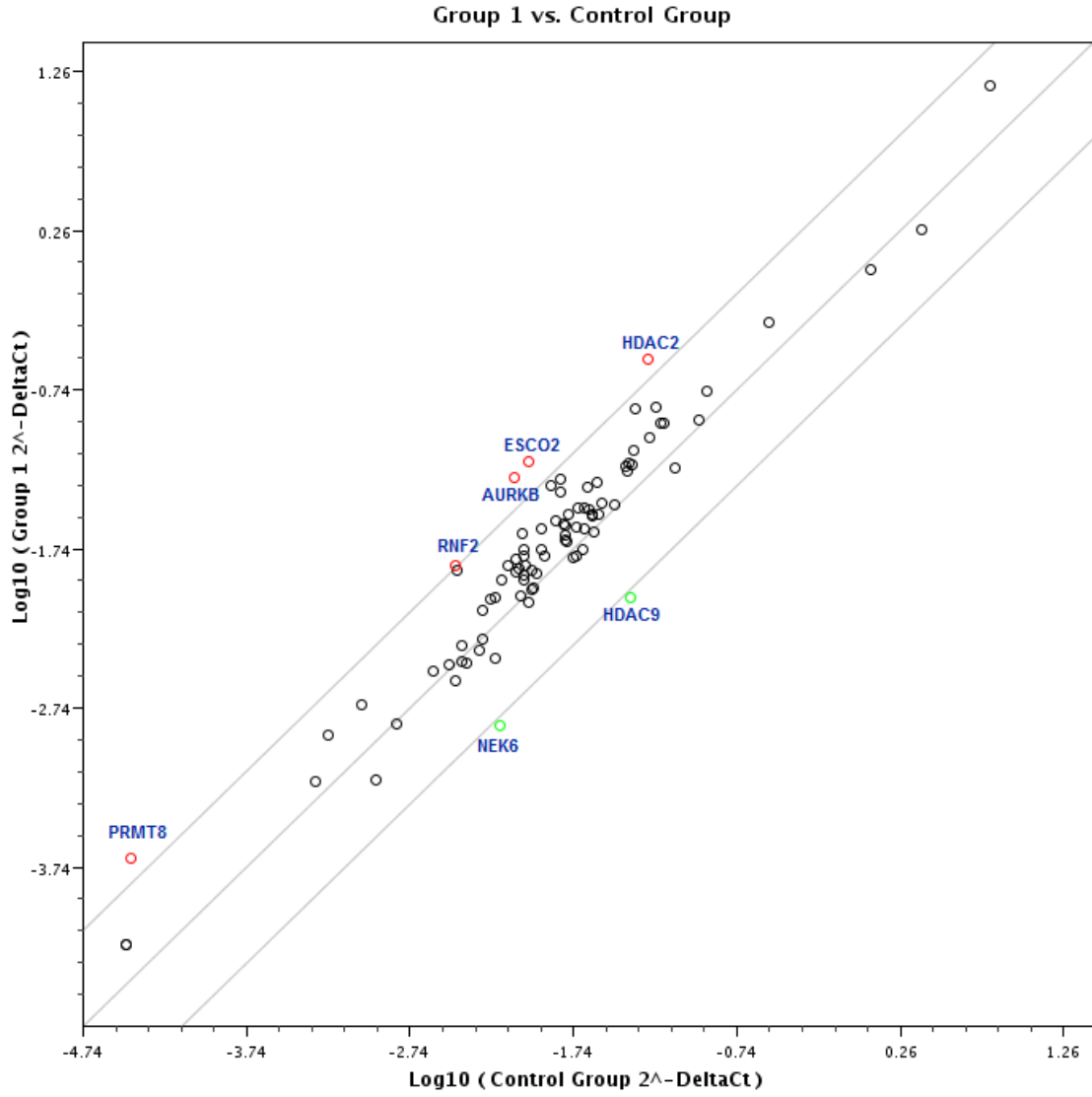
RT² Profiler PCR Dizin Data Analysis version 3.5 yazılımı kullanılarak *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları Grup1 içerisinde incelenmiştir. Her hücre hattı için çalışma iki kez tekrarlandığından dolayı kontrol grubunda dört adet ve Grup1’de on adet Ct değeri bulunmaktadır. İnceleme sırasında gerçek zamanlı PCR sonucu elde edilen Ct değerleri ve normalizasyon için ifade düzeyleri yakın olan *ACTB*, *B2M* ve *GAPDH* ‘housekeeping’ genleri kullanılmıştır. *HPRT1* ve *RPLP0* ‘housekeeping’ genlerinin ifade düzeyleri diğerleri ile uyumluluk göstermediğinden, bu genlerin Ct değerleri normalizasyona katılmamıştır.

Tablo 8: Genlerin delta(Ct) değerleri ve standart sapmaları. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları Grup1 olarak kullanılmıştır. Hesaplama sonrasında kontrol grubunun ve Grup1’in Ct değerleri ortalaması ve bu değerlerin standart sapması tabloda olduğu gibidir.

Pozisyon	Sembol	AVG Delta(Ct)		Standart Sapma	
		Kontrol Grup	Grup1	Kontrol Grup	Grup1
A01	ASH1L	24,51	24,91	1,48675	2,139216
A02	ATF2	22,37	22,42	1,152288	1,41545
A03	AURKA	24,37	23,44	0,279583	1,572651
A04	AURKB	25,13	23,28	1,031665	2,587832
A05	AURKC	27,93	29,57	1,329486	1,859492
A06	CARM1	24,77	25,19	0,859011	2,820785
A07	CDYL	25,5	27,02	0,421347	2,547652
A08	CIITA	33	33	33	33
A09	CSRP2BP	24,12	24,24	1,012172	1,362654
A10	DNMT1	23,54	24,03	0,273557	2,165556
A11	DNMT3A	25,08	24,98	0,72844	2,05376
A12	DNMT3B	28,88	28,64	0,637358	2,366473
B01	DOT1L	26,46	27,17	0,38863	2,421402
B02	DZIP3	26,28	25,19	1,681596	1,433411
B03	EHMT2	24,07	24,46	0,351805	2,652379
B04	ESCO1	24,89	25,11	1,2685	1,063569
B05	ESCO2	24,84	22,91	0,900389	0,914065
B06	HAT1	22,24	21,81	1,565256	0,575906
B07	HDAC1	24,05	24,6	0,722911	1,52371
B08	HDAC10	27,49	28,4	0,61684	2,674342
B09	HDAC11	29,15	29,62	0,902626	2,071866
B10	HDAC2	22,4	20,8	1,150692	0,894197
B11	HDAC3	23,92	24,93	1,224255	3,132483
B12	HDAC4	25,08	25,23	0,43546	2,012671

C01	HDAC5	25,36	25,41	0,907267	2,777908
C02	HDAC6	26,19	26,76	0,505066	2,574132
C03	HDAC7	24,77	25,59	1,501022	2,253147
C04	HDAC8	24,67	25,27	0,590508	1,235134
C05	HDAC9	22,75	25,76	0,25632	4,427322
C06	KAT2A	23,53	24,08	0,592199	2,085623
C07	KAT2B	26,17	27,09	0,281943	1,921604
C08	KAT5	25,77	26,63	1,095213	2,878613
C09	KAT6A	24,55	24,75	1,371496	2,142206
C10	KAT6B	23,7	23,9	1,04618	1,560319
C11	KAT7	24	24,01	0,621611	2,003652
C12	KAT8	22,86	23,04	1,263075	1,208463
D01	KDM1A	21,21	21,47	0,921245	1,376703
D02	KDM4A	24,08	24,57	0,743819	1,141588
D03	KDM4C	25,76	26,04	0,385789	1,978734
D04	KDM5B	22,08	22,13	1,348357	1,042329
D05	KDM5C	26,08	27,13	0,891179	2,278969
D06	KDM6B	25,49	25,76	0,400115	2,506387
D07	MBD2	21,84	23,06	1,863205	1,281102
D08	MLL	25,02	25,16	1,165686	2,376275
D09	MLL3	24,93	25,39	0,985102	2,827067
D10	MLL5	22,13	22,13	1,59266	1,854335
D11	MYSM1	25,26	25,1	2,043973	1,652691
D12	NCOA1	24,07	24,27	1,097068	0,940777
E01	NCOA3	24,94	24,43	1,496538	1,039086
E02	NCOA6	22,82	23,14	0,993479	1,531731
E03	NEK6	25,39	28,45	1,453717	2,802895
E04	NSD1	24,84	25,88	0,160208	3,021082
E05	PAK1	24,19	23,56	0,161967	1,08212
E06	PRMT1	21,36	22,05	0,908125	1,555426
E07	PRMT2	23,58	23,93	1,300881	1,417731
E08	PRMT3	23,87	24,31	1,657858	1,881237
E09	PRMT5	23,82	23,89	2,492957	2,086456
E10	PRMT6	26,78	27,29	1,02367	3,140598
E11	PRMT7	24,26	24,18	1,381192	1,193026
E12	PRMT8	32,92	31,22	0,155	1,69331
F01	RNF2	26,3	25,09	4,433339	1,223166
F02	RNF20	23,71	24,35	2,015118	2,118685
F03	RPS6KA3	23,09	23,84	1,852359	1,435413
F04	RPS6KA5	25,59	25,81	1,395215	1,982327
F05	SETD1A	25	25,74	0,296915	2,440824
F06	SETD1B	26,31	27,5	0,858307	2,940605
F07	SETD2	23,64	23,45	0,949474	1,751039
F08	SETD3	23,49	24,41	0,908676	2,654266
F09	SETD4	23,72	24,75	1,639044	0,655141
F10	SETD5	22,69	22,68	0,299819	1,887258
F11	SETD6	24,92	25,31	3,103718	1,465001
F12	SETD7	24,93	24,91	2,711562	2,464707
G01	SETD8	23,86	24,89	1,586527	1,751856
G02	SETDB1	23,33	23,78	1,325016	1,891845
G03	SETDB2	24,91	24,78	2,019596	1,185646
G04	SMYD3	24,57	24,32	1,753786	1,778133

G05	SUV39H1	28,21	28	1,336675	1,868581
G06	SUV420H1	22,73	22,99	0,966484	1,184569
G07	UBE2A	23,41	24,02	1,667223	0,86213
G08	UBE2B	22,67	21,81	3,096864	0,684609
G09	USP16	22,8	22,96	1,758797	0,473362
G10	USP21	24,72	25,57	0,446542	1,948391
G11	USP22	25,84	26,87	2,470093	4,298257
G12	WHSC1	23,45	23,35	0,721734	2,915202
H01	ACTB	16,83	18,07	0,521824	2,668417
H02	B2M	19,95	20,04	3,657899	1,168135
H03	GAPDH	17,86	18,91	0,315529	3,023883
H04	HPRT1	24,17	23,3	1,605293	1,84883
H05	RPLP0	15,44	15,08	2,075966	0,850153
H06	HGDC	33	33	33	33
H07	RTC	22,84	24,39	0,19721	3,1405
H08	RTC	24,06	23,25	2,6028	0,966623
H09	RTC	24,81	23,97	4,183765	2,057005
H10	PPC	18,68	18,76	0,268995	0,744458
H11	PPC	18,81	18,57	0,460072	0,294846
H12	PPC	18,82	18,62	0,5096	0,308842



Şekil 2: *MYCN* amplifiye hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları tek grup içerisinde incelenmiştir. Kırmızı halkalar ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran artış, yeşil halkalar ise ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azalış gösteren genleri ifade etmektedir.

Tablo 9: SK-N-AS hücre hattına ait kat düzenlemesi değerleri. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları Grup1 içerisinde incelenmiştir. Pozisyonlar problemlerinin dizin içerisindeki kuyucuk numaralarını belirtmektedir. Kat düzenlemeleri pozitif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran fazla iken, negatif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azdır. Yorumlar kısmında ‘OK’ ile ifade edilen genlerin Ct değerleri analiz için yeterli iken ‘B’ ile ifade edilen genin Ct değeri hem kontrol grubunda hem de Grup1’de 33’ten büyük olduğundan dolayı ifade düzeyleri analiz için düşük demektir.

Grup 1 ile Kontrol Grubu Karşılaştırması			
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Düzenlemesi	Yorumlar
A04	AURKB	6,4535	OK
B05	ESCO2	6,7556	OK
B10	HDAC2	5,4136	OK
E12	PRMT8	5,8021	B
F01	RNF2	4,1284	OK
C05	HDAC9	-4,5187	OK
E03	NEK6	-4,6603	OK

$\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda Grup1 ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 6.45 kat, *ESCO2* geninin ifadesinde 6.75 kat, *HDAC2* geninin ifadesinde 5.41 kat, *PRMT8* geninin ifadesinde 5.80 kat ve *RNF2* geninin ifadesinde 4.12 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *HDAC9* geninin ifadesinde 4.51 ve *NEK6* geninin ifadesinde ise 4.66 kat azalış gözlenmiştir.

Yapılan ikinci çalışmada 'RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5' yazılımı kullanılarak *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları her biri birer grup olacak şekilde incelenmiştir. Her hücre hattı için çalışma iki kez tekrarlandığından dolayı, kontrol grubunda dört adet ve diğer gruplarda ikişer adet Ct değeri bulunmaktadır. İnceleme sırasında gerçek zamanlı PCR sonucu elde edilen Ct değerleri ve normalizasyon için ifade düzeyleri yakın olan *ACTB*, *B2M* ve *GAPDH* 'housekeeping' genleri kullanılmıştır. *HPRT1* ve *RPLP0* 'housekeeping' genlerinin ifade düzeyleri diğerleri ile uyumluluk göstermediğinden bu genlerin Ct değerleri normalizasyona katılmamıştır. Genlerin Ct değerleri ve bu değerlerin kontrol grubuna oranı hesaplanarak her genin *MYCN* amplifiye olan hücre hatlarındaki ifade düzeyleri göreceli olarak hesaplanmıştır. Hesaplama sonrasında her hücre hattı için ifade düzeyi fazla ve az olan genler belirlenmiş ve bu genler diğer gen gruplarından ayrılarak incelemeye alınmıştır.

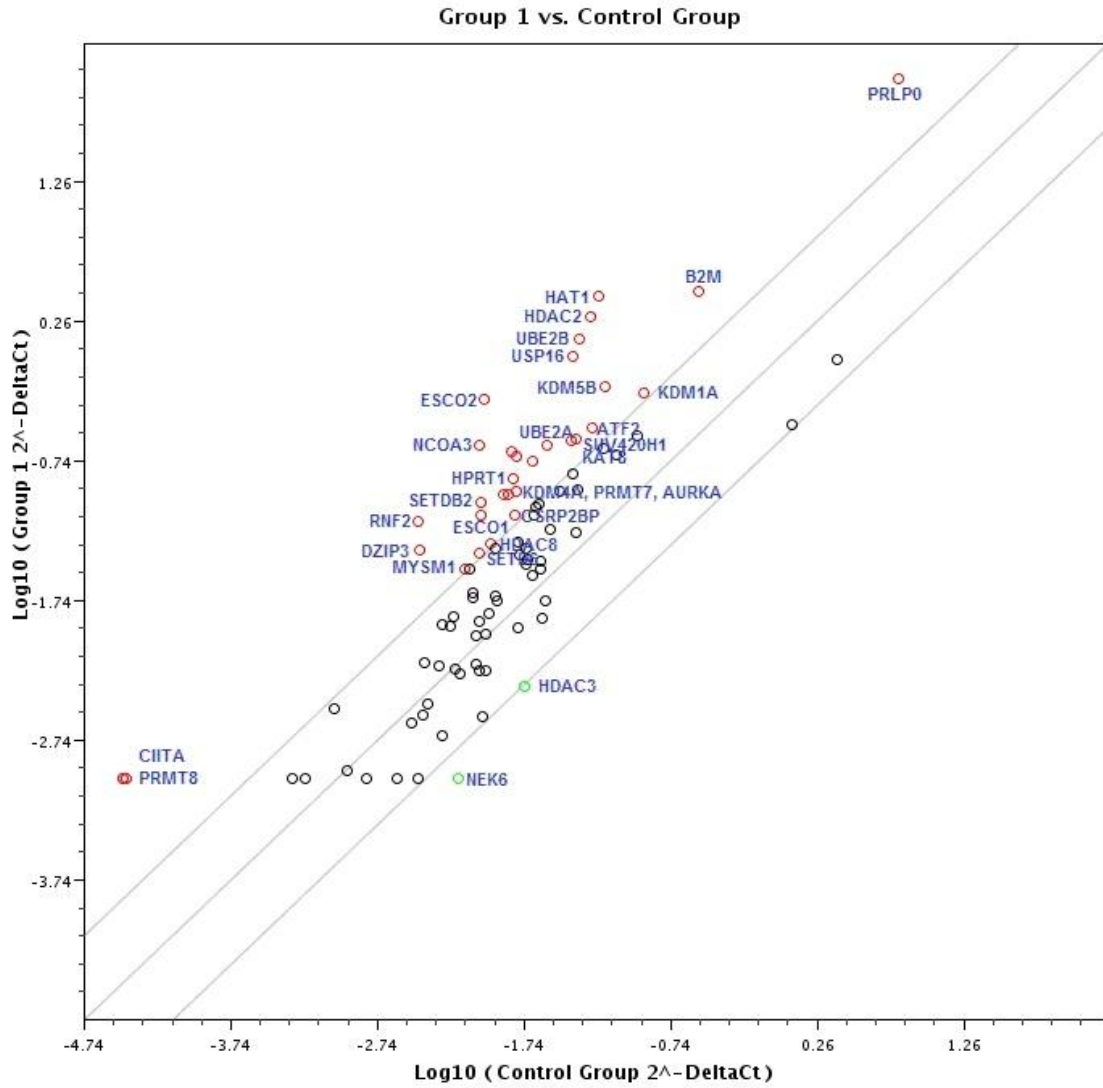
Tablo 10: Hücre Hatlarına ait delta(Ct) değerleri ve standart sapmaları. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 hücre hatları her biri bir grup olacak şekilde kullanılmıştır. Hesaplama sonrasında kontrol grubunun ve karşılaştırılan hücre hatlarının Ct değerleri ortalaması ve bu değerlerin standart sapması tabloda olduğu gibidir.

PST	Sembol	AVG Delta(Ct)						Standart Sapma					
		Kontrol G.	KELLY	SIMA	MHH-NB-11	IMR-32	CHP126	Kontrol G.	KELLY	SIMA	MHH-NB-11	IMR-32	CHP126
A01	ASH1L	6,387887	5,805605	6,373093	5,952073	6,340468	5,280258	0,215458	0,042935	0,002995	0,074891	0,038434	0,054629
A02	ATF2	4,240387	1,700605	4,158093	4,097073	4,470468	2,880258	0,261167	0,035864	0,03236	0,053677	0,137429	0,082914
A03	AURKA	6,240387	3,265605	5,243093	4,607073	4,930468	4,360258	1,136436	0,070202	0,039432	0,096104	0,018135	0,054629
A04	AURKB	7,005387	5,040605	4,768093	4,297073	3,975468	3,495258	2,21859	0,064148	0,109061	0,152672	0,067632	0,033416
A05	AURKC	9,805387	9,845605	10,48809	10,65707	11,83546	10,21025	0,347317	0,52275	0,03236	0,209241	0,172784	0,167766
A06	CARM1	6,640387	7,450605	5,428093	6,547073	6,125468	5,575258	0,768599	0,176268	0,03236	0,124388	0,059647	0,231406
A07	CDYL	7,375387	6,170605	7,043093	11,41707	10,04046	5,640258	1,157683	0,246979	0,067716	0,237525	0,131272	0,068771
A08	CIITA	14,875387	10,01560	14,90309	14,98207	14,97046	15,33025	1,363194	0,282334	0,017137	0,173886	0,773825	0,054629
A09	CSRP2BP	5,997887	3,760605	5,793093	5,637073	5,695468	5,535258	0,352606	0,063131	0,002995	0,152672	0,059647	0,033416
A10	DNMT1	5,410387	5,055605	5,183093	5,292073	5,175468	4,650258	1,17089	0,013633	0,039432	0,145601	0,003079	0,12534
A11	DNMT3A	6,952887	5,710605	5,793093	6,332073	6,775468	5,480258	1,767918	0,246979	0,059563	0,173886	0,130358	0,167766
A12	DNMT3B	10,757887	10,01560	9,883093	10,00207	9,505468	8,985258	1,93621	0,282334	0,124284	0,173886	0,1445	0,118269
B01	DOT1L	8,330387	8,685605	7,683093	8,272073	8,595468	7,810258	1,089738	0,155055	0,073706	0,287023	0,059647	0,139482
B02	DZIP3	8,150387	4,590605	6,433093	6,637073	7,470468	6,005258	0,667736	0,219712	0,116132	0,067819	0,003993	0,051437
B03	EHMT2	5,940387	6,450605	5,208093	5,392073	5,360468	5,075258	1,607485	0,050006	0,03236	0,145601	0,032277	0,132411
B04	ESCO1	6,762887	3,760605	6,693093	6,662073	7,460468	6,160258	0,177543	0,106575	0,017137	0,216312	0,038434	0,040487
B05	ESCO2	6,710387	0,990605	5,483093	4,137073	5,030468	4,130258	0,8225	0,105557	0,031279	0,180957	0,046419	0,054629
B06	HAT1	4,112887	-1,45439	4,288093	3,317073	4,355468	3,730258	0,265831	0,112628	0,010066	0,166814	0,05349	0,12534
B07	HDAC1	5,925387	4,380605	5,453093	6,142073	6,375468	5,870258	0,682555	0,078291	0,039432	0,131459	0,031363	0,111198
B08	HDAC10	9,367887	10,01560	8,723093	9,532073	10,90046	8,040258	0,816506	0,282334	0,053574	0,258738	0,024292	0,001939
B09	HDAC11	11,025387	10,01560	9,403093	11,64207	12,00046	10,21525	1,890444	0,282334	0,067716	0,173886	0,236424	0,320137
B10	HDAC2	4,277887	-0,95939	3,178093	1,692073	2,525468	2,770258	0,521614	0,20557	0,052492	0,024104	0,067632	0,012203
B11	HDAC3	5,795387	7,835605	5,373093	5,852073	5,390468	5,380258	0,643912	0,000509	0,031279	0,258738	0,060561	0,12534

B12	HDAC4	6,957887	5,590605	6,213093	6,807073	7,545468	5,210258	1,008731	0,006562	0,073706	0,279952	0,05349	0,082914
C01	HDAC5	7,235387	7,535605	6,108093	7,087073	5,925468	5,605258	0,615781	0,225765	0,060645	0,364804	0,081774	0,146553
C02	HDAC6	8,067887	8,495605	7,438093	7,862073	8,270468	6,935258	0,926074	0,155055	0,046503	0,20217	0,11713	0,005132
C03	HDAC7	6,645387	6,585605	6,478093	6,592073	7,405468	6,065258	0,465694	1,061169	0,094919	0,151384	0,25148	0,305995
C04	HDAC8	6,540387	4,435605	6,298093	7,167073	7,085468	6,580258	0,822877	0,05606	0,03236	0,195099	0,095916	0,054629
C05	HDAC9	4,620387	4,160605	14,90309	4,662073	7,025468	3,230258	1,404312	0,006562	0,017137	0,20217	0,102074	0,12534
C06	KAT2A	5,400387	4,845605	4,808093	5,077073	6,080468	4,775258	0,964058	0,057077	0,060645	0,251667	0,145414	0,089985
C07	KAT2B	8,042887	7,265605	7,783093	8,597073	9,635468	7,345258	1,513192	0,367187	0,10199	0,209241	0,003079	0,075842
C08	KAT5	7,642887	8,990605	6,993093	7,727073	7,825468	6,820258	0,92501	0,19041	0,039432	0,13853	0,095916	0,040487
C09	KAT6A	6,425387	5,670605	5,828093	5,672073	6,470468	5,310258	0,081677	0,050006	0,010066	0,032464	0,046419	0,082914
C10	KAT6B	5,577887	3,760605	5,078093	5,077073	5,705468	5,090258	0,368308	0,048989	0,074787	0,067819	0,025206	0,153624
C11	KAT7	5,875387	4,700605	5,043093	5,307073	5,535468	4,680258	0,786681	0,020704	0,025289	0,13853	0,05349	0,12534
C12	KAT8	4,732887	2,000605	4,493093	4,477073	5,335468	4,070258	0,439862	0,20557	0,130274	0,13853	0,081774	0,111198
D01	KDM1A	3,082887	0,840605	3,388093	2,112073	3,290468	2,905258	0,514568	0,091415	0,046503	0,074891	0,046419	0,118269
D02	KDM4A	5,955387	3,195605	5,498093	6,647073	7,090468	5,605258	0,686451	0,113646	0,066634	0,096104	0,066718	0,089985
D03	KDM4C	7,630387	6,360605	6,243093	7,872073	8,395468	6,535258	1,088916	0,402542	0,116132	0,046606	0,073789	0,132411
D04	KDM5B	3,955387	0,700605	3,978093	3,057073	4,565468	3,530258	0,207761	0,063131	0,046503	0,124388	0,073789	0,111198
D05	KDM5C	7,955387	8,265605	7,573093	8,597073	8,840468	7,580258	0,816238	0,169197	0,265706	0,251667	0,060561	0,097056
D06	KDM6B	7,367887	7,430605	5,993093	6,727073	7,175468	6,665258	1,682463	0,064148	0,124284	0,039535	0,067632	0,18898
D07	MBD2	3,715387	2,330605	4,798093	4,017073	4,915468	4,440258	0,682702	0,063131	0,080777	0,124388	0,045505	0,224335
D08	MLL	6,892887	6,610605	6,338093	6,007073	6,060468	5,995258	0,606965	0,27628	0,094919	0,251667	0,102987	0,089985
D09	MLL3	6,807887	7,470605	6,428093	6,602073	6,805468	4,855258	0,39115	0,064148	0,23634	0,244596	0,081774	0,104127
D10	MLL5	4,000387	2,155605	4,123093	3,227073	4,195468	2,170258	0,243669	0,112628	0,011147	0,067819	0,05349	0,167766
D11	MYSM1	7,132887	5,055605	6,938093	5,962073	6,670468	6,080258	0,686879	0,057077	0,024208	0,145601	0,046419	0,210193
D12	NCOA1	5,947887	2,360605	6,728093	5,727073	6,495468	5,250258	0,29319	0,006562	0,060645	0,110246	0,011064	0,153624
E01	NCOA3	6,812887	2,080605	5,738093	6,427073	7,730468	5,370258	0,325076	0,035864	0,060645	0,110246	0,046419	0,181908
E02	NCOA6	4,695387	2,765605	5,228093	3,867073	4,895468	4,130258	0,422806	0,041918	0,117213	0,110246	0,087931	0,252619
E03	NEK6	7,267887	10,01560	11,61809	8,052073	7,955468	9,800258	0,320119	0,282334	0,187924	0,216312	0,025206	0,181908
E04	NSD1	6,715387	8,550605	6,058093	6,917073	6,730468	6,330258	1,303422	0,741953	0,131355	0,110246	0,018135	0,12534
E05	PAK1	6,060387	2,265605	5,458093	5,042073	5,690468	4,520258	1,239059	0,028793	0,046503	0,117317	0,137429	0,167766
E06	PRMT1	3,232887	1,865605	2,598093	3,777073	3,685468	3,535258	0,458925	0,014651	0,03236	0,152672	0,045505	0,18898
E07	PRMT2	5,457887	3,475605	5,238093	5,692073	5,490468	4,975258	0,296468	0,070202	0,131355	0,159743	0,102987	0,146553

E08	PRMT3	5,742887	4,545605	6,363093	5,452073	5,825468	4,560258	0,329823	0,070202	0,017137	0,173886	0,045505	0,181908
E09	PRMT5	5,690387	4,815605	4,968093	4,792073	5,035468	5,045258	1,240602	0,140913	0,018218	0,20217	0,095916	0,146553
E10	PRMT6	8,650387	10,01560	6,468093	9,127073	7,880468	8,145258	1,860077	0,282334	0,046503	0,322378	0,08086	0,104127
E11	PRMT7	6,137887	3,285605	5,828093	5,202073	6,065468	5,705258	0,048742	0,170214	0,080777	0,188028	0,017221	0,146553
E12	PRMT8	14,797887	10,01560	14,49309	13,09207	12,68546	11,02025	1,403186	0,282334	0,271695	0,145601	0,732312	0,157503
F01	RNF2	8,172887	3,910605	7,503093	6,242073	6,835468	6,145258	3,151415	0,643976	0,110142	0,032464	0,05349	0,291853
F02	RNF20	5,580387	5,175605	5,443093	5,387073	6,170468	4,750258	0,776652	0,225765	0,017137	0,124388	0,102987	0,054629
F03	RPS6KA3	4,960387	3,200605	5,003093	5,352073	6,250468	4,590258	0,654791	0,091415	0,053574	0,230454	0,01015	0,082914
F04	RPS6KA5	7,462887	6,390605	6,783093	6,792073	7,800468	6,485258	0,110133	0,00758	0,039432	0,173886	0,032277	0,104127
F05	SETD1A	6,872887	7,300605	6,518093	6,627073	7,145468	6,310258	1,160078	0,063131	0,004076	0,13853	0,073789	0,097056
F06	SETD1B	8,182887	10,01560	8,248093	8,612073	8,055468	7,755258	0,613425	0,282334	0,088929	0,117317	0,059647	0,005132
F07	SETD2	5,510387	3,56565	4,808093	4,542073	5,400468	4,115258	0,501444	0,155055	0,060645	0,173886	0,018135	0,104127
F08	SETD3	5,367887	6,21065	5,183093	6,032073	5,590468	4,225258	0,577746	0,219712	0,166711	0,173886	0,003993	0,160695
F09	SETD4	5,595387	2,48565	6,163093	6,532073	7,395468	6,380258	0,306141	0,140913	0,087848	0,244596	0,186926	0,068771
F10	SETD5	4,567887	3,145605	4,053093	3,917073	4,115468	3,375258	1,253361	0,084344	0,031279	0,308236	0,003079	0,146553
F11	SETD6	6,795387	4,660605	6,973093	5,847073	7,845468	6,445258	1,820788	0,487395	0,138426	0,166814	0,031363	0,037295
F12	SETD7	6,800387	6,270605	5,923093	6,322073	6,655468	4,595258	1,348578	0,078291	0,031279	0,159743	0,102074	0,132411
G01	SETD8	5,735387	4,940605	6,653093	6,237073	6,185468	5,650258	0,294801	1,110666	0,096	0,124388	0,031363	0,12534
G02	SETDB1	5,205387	4,115605	4,923093	4,637073	6,000468	4,430258	0,32796	0,140913	0,130274	0,180957	0,046419	0,12534
G03	SETDB2	6,780387	3,460605	6,733093	6,222073	7,215468	5,455258	0,665027	0,105557	0,087848	0,173886	0,017221	0,0617
G04	SMYD3	6,440387	4,555605	5,928093	5,587073	5,700468	5,045258	0,469077	0,098486	0,074787	0,124388	0,018135	0,104127
G05	SUV39H1	10,080387	8,355605	8,783093	9,862073	9,535468	8,675258	0,814103	0,170214	0,124284	0,188028	0,073789	0,00901
G06	SUV420H1	4,602887	1,940605	4,538093	4,577073	5,165468	3,950258	0,40855	0,064148	0,088929	0,096104	0,003079	0,139482
G07	UBE2A	5,280387	2,105605	6,483093	4,952073	6,135468	5,640258	0,456207	0,041918	0,002995	0,089033	0,102074	0,026345
G08	UBE2B	4,540387	-0,43439	4,143093	3,047073	4,040468	3,470258	1,758688	0,057077	0,152569	0,152672	0,095002	0,12534
G09	USP16	4,670387	-0,00439	5,038093	4,397073	5,475468	5,075258	0,485731	0,000509	0,117213	0,13853	0,017221	0,104127
G10	USP21	6,595387	6,085605	6,873093	6,972073	7,105468	5,995258	0,997045	0,013633	0,152569	0,244596	0,045505	0,075842
G11	USP22	7,712887	7,355605	14,90309	5,832073	6,630468	4,835258	3,741769	0,338902	0,017137	0,244596	0,173698	0,18898
G12	WHSC1	5,320387	5,785605	4,323093	3,982073	4,340468	3,500258	0,800475	0,127788	0,067716	0,066531	0,060561	0,111198
H01	ACTB	-1,299613	0,070605	-1,83690	-0,71292	-1,37453	-0,57474	0,904219	0,106575	0,017137	0,350662	0,017221	0,075842
H02	B2M	1,822887	-1,57939	2,803093	0,897073	2,130468	1,125258	2,302993	0,020704	0,025289	0,469582	0,032277	0,475701
H03	GAPDH	-0,267113	1,620605	-0,65690	-0,14292	-0,57453	-0,49474	1,102094	0,091415	0,002995	0,081962	0,017221	0,358685

H04	HPRT1	6,040387	2,890605	5,328093	3,097073	5,440468	4,935258	0,32251	0,078291	0,046503	2,279775	0,088845	0,0617
H05	RPLP0	-2,689613	-6,61439	-3,36190	-3,72792	-2,49453	-3,21974	0,737058	0,338902	0,010066	0,089033	0,087931	0,097056
H06	HGDC	14,875387	10,01560	14,90309	14,98207	14,97046	15,33025	1,363194	0,282334	0,017137	0,173886	0,773825	0,054629
H07	RTC	4,712887	4,745605	4,808093	4,822073	6,175468	6,620258	1,216859	7,735239	0,03835	0,089033	0,045505	0,977747
H08	RTC	5,930387	-0,68439	4,758093	4,787073	6,190468	6,420258	1,532843	0,041918	0,018218	0,110246	0,066718	1,373726
H09	RTC	6,682887	2,920605	4,768093	4,877073	6,170468	6,295258	3,066613	5,126015	0,080777	0,096104	0,060561	1,19695
H10	PPC	0,557887	-4,36439	0,488093	0,407073	0,555468	1,925258	1,316852	0,791451	0,131355	0,166814	0,922317	1,649498
H11	PPC	0,685387	-4,14939	0,503093	0,322073	0,595468	0,795258	1,110895	0,925801	0,152569	0,103175	0,922317	0,13629
H12	PPC	0,692887	-4,24939	0,503093	0,287073	0,770468	0,965258	1,285835	0,897517	0,096	0,209241	0,886962	0,348422



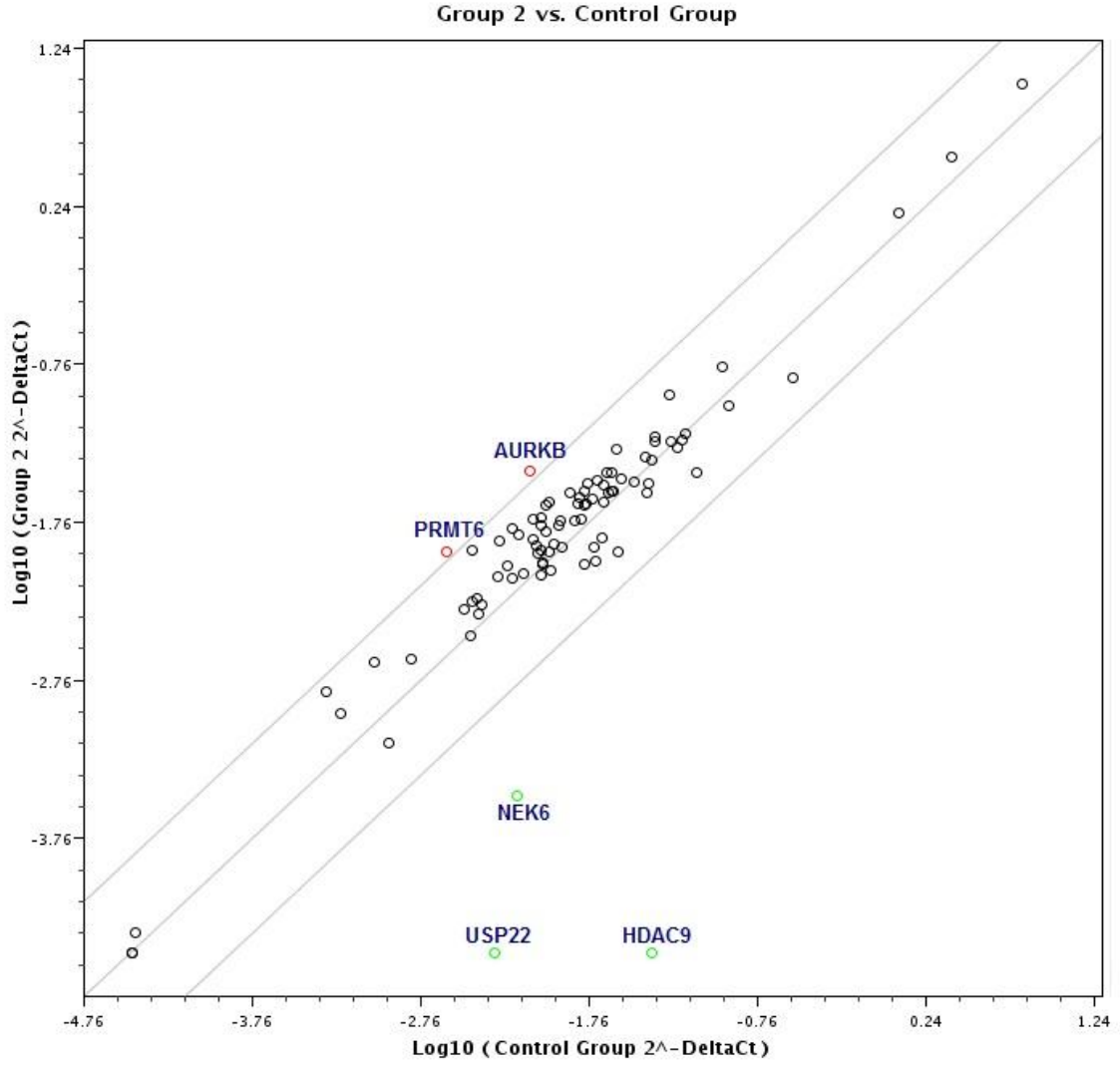
Şekil 3: KELLY hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY hücre hattı Grup1 olarak incelenmiştir. Kırmızı halkalar ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran artış, yeşil halkalar ise ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azalış gösteren genleri ifade etmektedir.

Tablo 11: KELLY hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan KELLY hücre hattı Grup1 içerisinde incelenmiştir. Pozisyonlar problemlerinin dizin içerisindeki kuyucuk numaralarını belirtmektedir. Kat düzenlemeleri pozitif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran fazla iken, negatif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azdır. Yorumlar kısmında ‘OK’ ile ifade edilen genlerin Ct değerleri analiz için yeterlidir. ‘A’ ile ifade edilen genin Ct değeri kontrol grubunda veya test grubunda fazlasıyla düşük olmasından kaynaklı kat düzenlemesi en düşük değere göre hesaplanmıştır. ‘B’ ile ifade edilen genin Ct değeri hem kontrol grubunda hem de test grubunda 33’ten büyük olduğundan dolayı ifade düzeyleri analiz için düşüktür. ‘C’ ile ifade edilen genin Ct değeri hem kontrol hem de test grubunda ‘cut-off’ değeri olan 33’ten yüksektir.

KELLY Hücre Hattı ile Kontrol Grubu Karşılaştırması			
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Düzenlemesi	Yorumlar
A02	ATF2	5,815	OK
A03	AURKA	7,8614	OK
A08	CIITA	29,0362	C
A09	CSRP2BP	4,7151	OK
B02	DZIP3	11,7924	OK
B04	ESCO1	8,0127	OK
B05	ESCO2	52,7019	OK
B06	HAT1	47,4153	OK
B10	HDAC2	37,7206	OK
C04	HDAC8	4,3013	OK
C12	KAT8	6,6451	OK
D01	KDM1A	4,7314	OK
D02	KDM4A	6,7729	OK
D04	KDM5B	9,5452	OK
D11	MYSM1	4,2201	OK
D12	NCOA1	12,0193	OK
E01	NCOA3	26,5802	OK
E05	PAK1	13,8785	OK
E11	PRMT7	7,2214	OK
E12	PRMT8	27,5176	B
F01	RNF2	19,19	OK
F09	SETD4	8,6325	OK
F11	SETD6	4,3917	OK
G03	SETDB2	9,9851	OK
G06	SUV420H1	6,3303	OK
G07	UBE2A	9,0303	OK
G08	UBE2B	31,4455	OK
G09	USP16	25,5417	OK

H02	B2M	10,5728	OK
H04	HPRT1	8,8752	OK
H05	RPLP0	15,1872	OK
B11	HDAC3	-4,1131	A
E03	NEK6	-6,7165	A

$\Delta\Delta C_t$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda KELLY hücre hattı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 32 gende ifade artışı gözlenmiştir. Bunlardan *CIITA* geninin ifadesinde 29.03 kat, *ESCO2* geninin ifadesinde 52.70 kat, *HAT1* geninin ifadesinde 47.41 kat, *HDAC2* geninin ifadesinde 37.72 kat, *NCOA3* geninin ifadesinde 26.58 kat, *PRMT8* geninin ifadesinde 27.51 kat, *UBE2B* geninin ifadesinde 31.44 kat, ve *USP16* geninin ifadesinde 25.54 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *HDAC3* geninin ifadesinde 4.11 ve *NEK6* geninin ifadesinde ise 6.71 kat azalış gözlenmiştir.

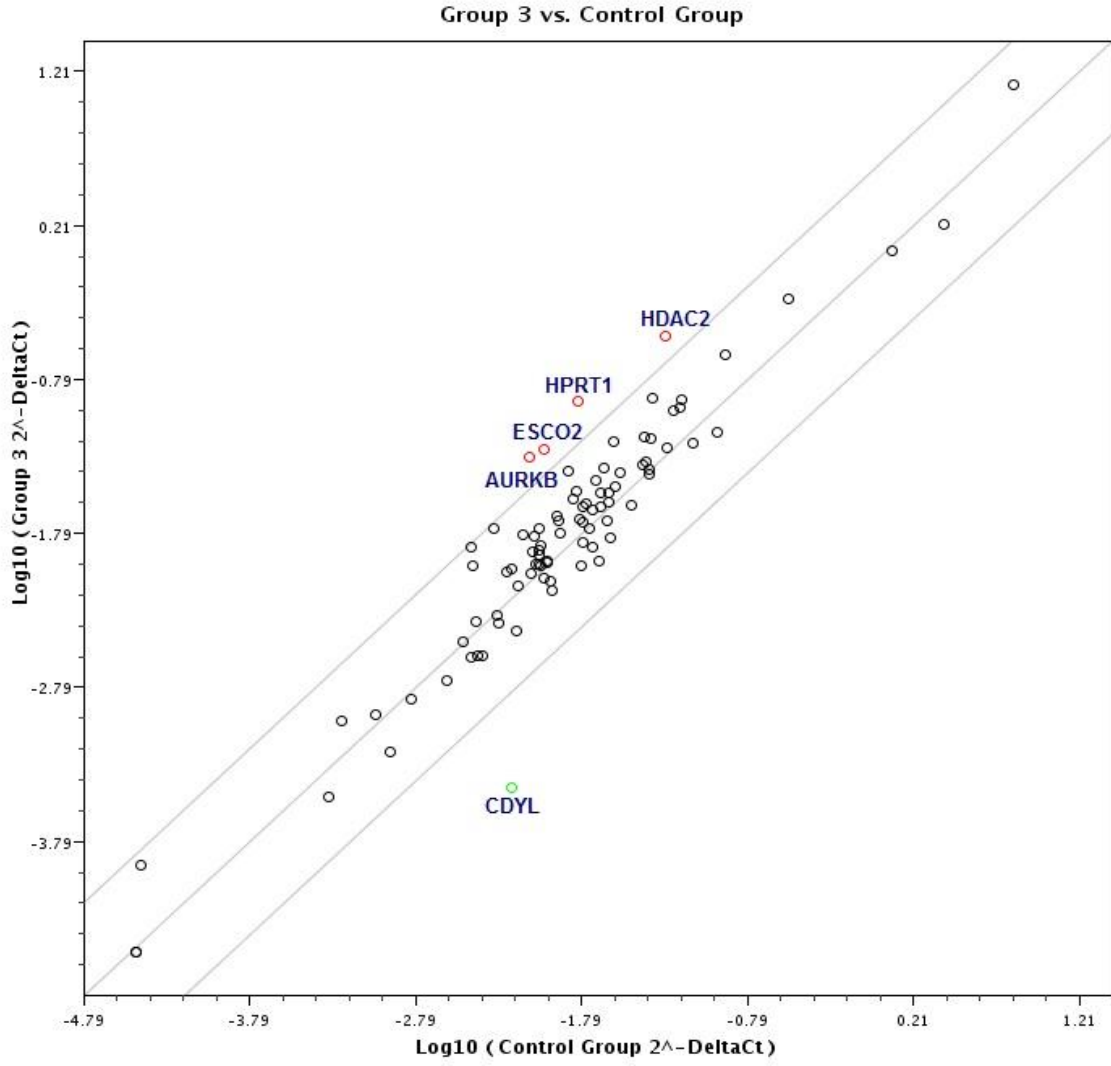


Şekil 4: SIMA hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan SIMA hücre hattı Grup2 olarak incelenmiştir. Kırmızı halkalar ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran artış, yeşil halkalar ise ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azalış gösteren genleri ifade etmektedir.

Tablo 12: SIMA hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan SIMA hücre hattı Grup2 içerisinde incelenmiştir. Pozisyonlar problemlerinin dizin içerisindeki kuyucuk numaralarını belirtmektedir. Kat düzenlemeleri pozitif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran fazla iken, negatif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azdır. Yorumlar kısmında 'OK' ile ifade edilen genlerin Ct değerleri analiz için yeterlidir. 'A' ile ifade edilen genin Ct değeri kontrol grubunda veya test grubunda fazlasıyla düşük olmasından kaynaklı kat düzenlemesi en düşük değere göre hesaplanmıştır

SIMA Hücre Hattı ile Kontrol Grubu Karşılaştırması			
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Düzenlemesi	Yorumlar
A04	AURKB	4,7151	OK
E10	PRMT6	4,5387	OK
C05	HDAC9	-1245,6697	A
E03	NEK6	-20,3959	OK

$\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda SIMA hücre hattı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 4.71 kat ve *PRMT6* geninin ifadesinde 4.53 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *HDAC9* geninin ifadesinde 1245.66 ve *NEK6* geninin ifadesinde ise 20.39 kat azalış gözlenmiştir.

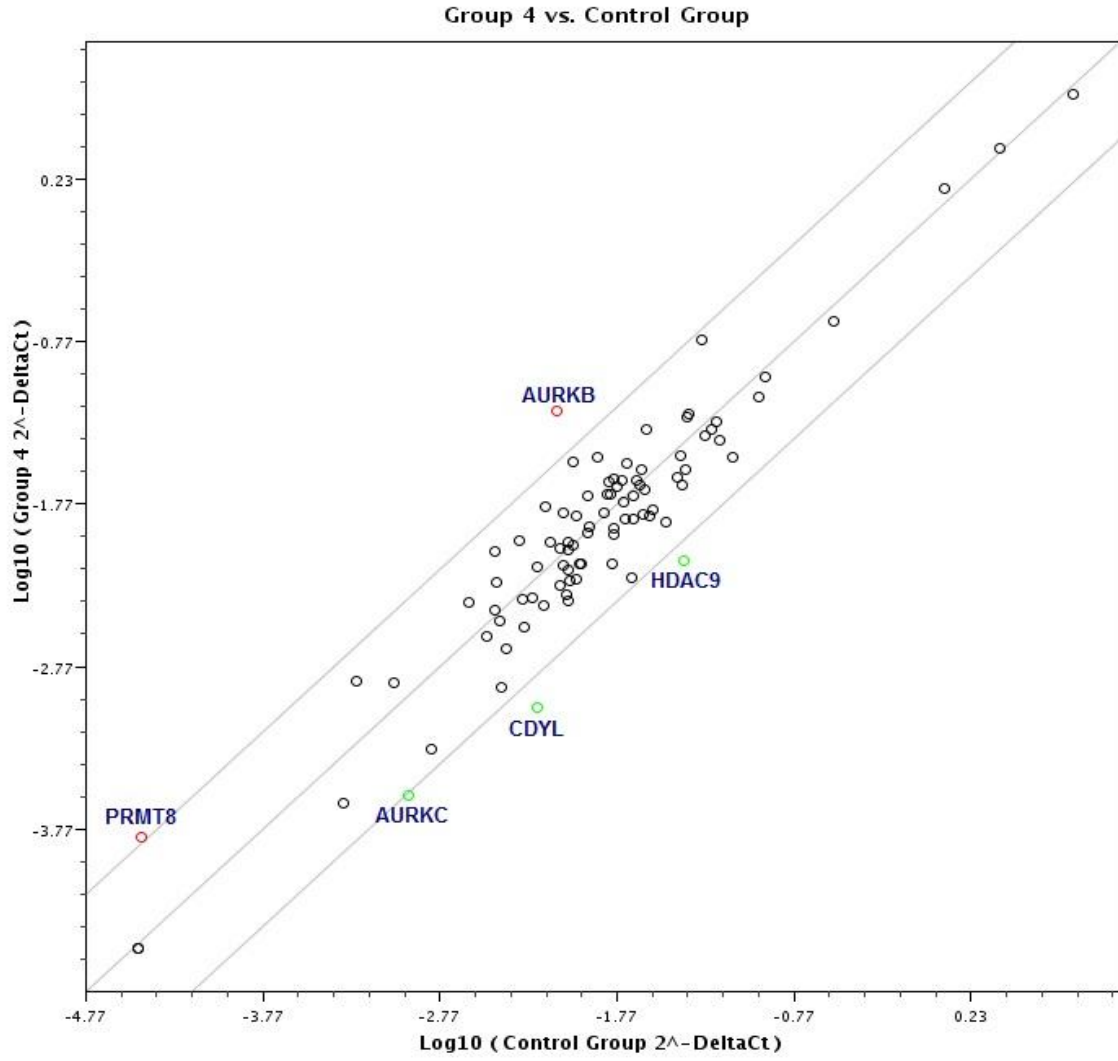


Şekil 5: MHH-NB-11 hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan MHH-NB-11 hücre hattı Grup3 olarak incelenmiştir. Kırmızı halkalar ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran artış, yeşil halkalar ise ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azalış gösteren genleri ifade etmektedir.

Tablo 13: MHH-NB-11 hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan MHH-NB-11 hücre hattı Grup3 içerisinde incelenmiştir. Pozisyonlar problemlerinin dizin içerisindeki kuyucuk numaralarını belirtmektedir. Kat düzenlemeleri pozitif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran fazla iken, negatif olan genin ifade düzeyi kontrol grubuna nazaran azdır. Yorumlar kısmında ‘OK’ ile ifade edilen genlerin Ct değerleri analiz için yeterlidir.

MHH-NB-11 Hücre Hattı ile Kontrol Grubu Karşılaştırması			
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Düzenlemesi	Yorumlar
A04	AURKB	6,5356	OK
B05	ESCO2	5,9517	OK
B10	HDAC2	6,0035	OK
A07	CDYL	-16,4691	OK

$\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda MHH-NB-11 hücre hattı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 6.53 kat, *ESCO2* geninin ifadesinde 5.95 kat ve *HDAC2* geninin ifadesinde 6.00 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *CDYL* geninin ifadesinde 16.46 kat azalış gözlenmiştir.

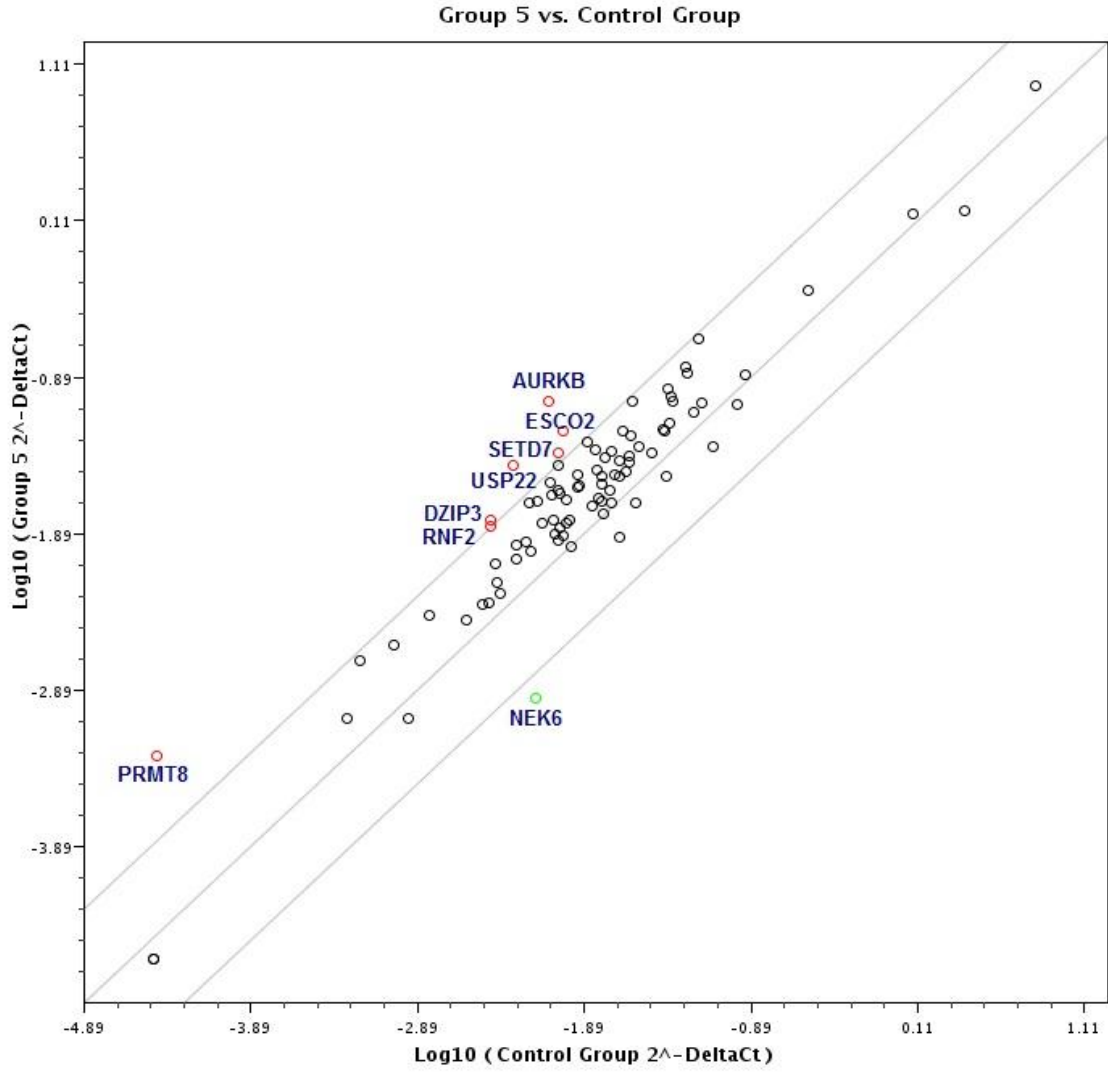


Şekil 6: IMR-32 hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan IMR-32 hücre hattı Grup4 olarak incelenmiştir. Kırmızı halkalar ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran artış, yeşil halkalar ise ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azalış gösteren genleri ifade etmektedir.

Tablo 14: IMR-32 hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan IMR-32 hücre hattı Grup4 içerisinde incelenmiştir. Pozisyonlar problemlerinin dizin içerisindeki kuyucuk numaralarını belirtmektedir. Kat düzenlemeleri pozitif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran fazla iken, negatif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azdır. Yorumlar kısmında ‘OK’ ile ifade edilen genlerin Ct değerleri analiz için yeterlidir. ‘B’ ile ifade edilen genin Ct değeri hem kontrol grubunda hem de test grubunda 33’ten büyük olduğundan dolayı ifade düzeyleri analiz için düşüktür.

IMR-32 Hücre Hattı ile Kontrol Grubu Karşılaştırması			
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Düzenlemesi	Yorumlar
A04	AURKB	8,1676	OK
E12	PRMT8	4,3242	B
A05	AURKC	-4,0843	OK
A07	CDYL	-6,3426	OK
C05	HDAC9	-5,2967	OK

$\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda IMR-32 hücre hattı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 8.16 kat ve *PRMT8* geninin ifadesinde 4.32 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *AURKC* geninin ifadesinde 4.08 kat, *CDYL* geninin ifadesinde 6.34 kat ve *HDAC9* geninin ifadesinde 5.29 kat azalış gözlenmiştir.



Şekil 7: CHP-126 hücre hattına ait kat düzenlemeleri grafiği. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan CHP-126 hücre hattı Grup5 olarak incelenmiştir. Kırmızı halkalar ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran artış, yeşil halkalar ise ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran azalış gösteren genleri ifade etmektedir.

Tablo 15: CHP-126 hücre hattına ait kat düzenlemeleri değerleri. *MYCN* amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan CHP-126 hücre hattı Grup5 içerisinde incelenmiştir. Pozisyonlar problemlerinin dizin içerisindeki kuyucuk numaralarını belirtmektedir. Kat düzenlemeleri pozitif olan genlerin ifade düzeyleri kontrol grubuna nazaran fazla iken, negatif olan genin ifade düzeyi kontrol grubuna nazaran azdır. Yorumlar kısmında ‘OK’ ile ifade edilen genlerin Ct değerleri analiz için yeterlidir. ‘A’ ile ifade edilen genin Ct değeri kontrol grubunda veya test grubunda fazlasıyla düşük olmasından kaynaklı kat düzenlemesi en düşük değere göre hesaplanmıştır.

CHP-126 Hücre Hattı ile Kontrol Grubu Karşılaştırması			
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Düzenlemesi	Yorumlar
A04	AURKB	11,3934	OK
B02	DZIP3	4,4233	OK
B05	ESCO2	5,9799	OK
E12	PRMT8	13,7145	A
F01	RNF2	4,0773	OK
E03	NEK6	-5,7852	OK

$\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda CHP-126 hücre hattı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 11.39 kat, *DZIP3* geninin ifadesinde 4.42 kat, *ESCO2* geninin ifadesinde 5.97 kat, *PRMT8* geninin ifadesinde 13.71 kat ve *RNF2* geninin ifadesinde 4.07 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *NEK6* geninin ifadesinde 5.78 kat azalış gözlenmiştir.

4.2. JASPAR Veritabanı ile MYCN Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Analizi

MYCN geni amplifiye olmayan hücre hatlarının kontrol grubu olarak ve MYCN geni amplifiye olan hücre hatlarının tek bir grupta incelendiği analiz sonucunda *AURKB*, *ESCO2*, *HDAC2*, *PRMT8* ve *RNF2* genlerinin ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu genlerin MYCN transkripsiyon faktörü ile düzenlenip düzenlenmediğini anlamak için, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri ile promotör dizileri arasındaki eşleşme yüzdesini hesaplayan JASPAR veritabanı kullanılmıştır.

İlgili genlerin promotör dizileri <http://epd.vital-it.ch/> (erişim tarihi 24.03.2013) adresli 'Eukaryotic Promoter Database' sitesinden alınmış ve JASPAR veritabanında (<http://jaspar.genereg.net/>, erişim tarihi 24.03.2013) bulunan fare MYCN transkripsiyon faktörü bağlanma dizisi ile eşleştirilmiştir. Analizde insan genomunda bulunduğu deneysel olarak kanıtlanmış promotör dizileri kullanılmıştır. Bu diziler promotör dizisinin muhtemel yerleştiği yer olan -499 ile +100 nükleotidleri arasında kalan bölge içinden seçilmiştir. JASPAR veritabanının bir uzantısı olan JASPAR CORE deney düzeneğine en uygun analiz yöntemi olarak seçilip kullanılmıştır. *PRMT8* genine ait deneysel olarak kanıtlanmış herhangi bir promotör dizisi bulunmadığı için bu gen araştırmaya katılmamıştır.

Tablo 16: *AURKB* genine ait birinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.

0 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named AURKB_1 NC_000017							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence

Tablo 17: *AURKB* genine ait ikinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.

1 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named AURKB_2 NC_000017							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0104.2	Mycn	6.992	0.828698040221643	291	300	1	CGCACGCCGC

AURKB genine ait iki adet promotör dizisi bulunmuştur. Bu diziler ile MYCN transkripsiyon faktörü bağlanma dizisi eşleştirildiğinde, MYCN transkripsiyon faktörünün ilk promotöre bağlanma potansiyelinin olmadığı, ikinci promotöre ise %82 bağlanma potansiyelinin bulunduğu bilgisi elde edilmiştir.

Tablo 18: *ESCO2* genine ait birinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.

0 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named ESCO2_1 NC_000008							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence

Tablo 19: *ESCO2* genine ait ikinci promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.

0 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named ESCO2_2 NC_000008							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence

ESCO2 genine ait iki adet promotör dizisi bulunmuştur. Bu diziler ile MYCN transkripsiyon faktörü bağlanma dizisi eşleştirildiğinde, MYCN transkripsiyon faktörünün her iki promotöre de bağlanma potansiyelinin olmadığı bilgisi elde edilmiştir.

Tablo 20: *HDAC2* genine ait promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.

8 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named HDAC2_1 NC_000006							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0104.2	Mycn	6.816	0.824910763572114	101	110	1	GGCTCGCGGC
MA0104.2	Mycn	12.097	0.93855058167529	108	117	-1	ACCACGTGCC
MA0104.2	Mycn	11.878	0.933838004480706	108	117	1	GGCACGTGGT
MA0104.2	Mycn	9.415	0.880837650004637	156	165	-1	CCCACGCTGC
MA0104.2	Mycn	5.798	0.803004811133366	265	274	1	TCCACCCGGC
MA0104.2	Mycn	5.745	0.801864324415042	275	284	1	TGCACGCTCC
MA0104.2	Mycn	6.400	0.815959018764138	428	437	1	CCCCCGTGGA
MA0104.2	Mycn	7.012	0.82912841256818	548	557	-1	ACCACCCGGC

HDAC2 genine ait bir adet promotör dizisi bulunmuştur. Bu dizi ile MYCN transkripsiyon faktörü bağlanma dizisi eşleştirildiğinde, MYCN transkripsiyon faktörünün karşı iplikte bulunan 108-117 arasındaki diziye %93 bağlanma potansiyelinin olduğu bulunmuştur. Diğer değerlerin yüzdesi daha düşük olduğu için göz önünde bulundurulmamıştır.

Tablo 21: *RNF2* genine ait promotör dizisi ile MYCN transkripsiyon faktörüne ait bağlanma dizisi arasındaki eşleşme.

4 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named RNF2_1 NC_000001							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0104.2	Mycn	7.065	0.830268899286504	119	128	-1	CCCACCCGGC
MA0104.2	Mycn	9.639	0.885657820285855	246	255	1	AGCACGAGGT
MA0104.2	Mycn	11.066	0.916364887211292	367	376	1	AACACGCGGC
MA0104.2	Mycn	5.714	0.801197247277909	394	403	-1	GGCCCGCGGC

RNF2 genine ait bir adet promotör dizisi bulunmuştur. Bu dizi ile MYCN transkripsiyon faktörü bağlanma dizisi eşleştirildiğinde, MYCN transkripsiyon faktörünün düz iplikte bulunan 367-376 arasındaki diziye %91 bağlanma potansiyelinin olduğu bulunmuştur. Diğer değerlerin yüzdesi daha düşük olduğu için göz önünde bulundurulmamıştır.

5. TARTIŞMA

Nöroblastom, sağkalım oranı %50'den az olan [39] ve spontan remisyondan hızlı metastatik progresyona kadar değişik klinik davranışlar gösteren bir kanser türüdür [62-64,279]. Bu klinik davranış farklılıkları; hastalığın evresine, hasta yaşına, reküran kromozom anomalilerine [76] tümörde bulunan kromozom seti sayısına [65] ve *MYCN* amplifikasyonuna dayandırılmaktadır [39]. Bu çalışmada, genetik mekanizmalar haricinde epigenetik düzenlemelerin de NB patogenezinde rol oynayabileceği düşüncesi ile epigenetik değişiklikleri etkileyen genlerin ifade düzeyleri araştırılmıştır.

Proje kapsamında SK-N-AS, SH-SY5Y, KELLY, SIMA, MHH-NB-11, IMR32 ve CHP-126 Nöroblastom hücre hatlarında epigenetik değişiklikleri etkileyen 84 adet genin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmada yer alan hücre hatları *MYCN* geni amplifikasyonu olanlar ve olmayanlar olmak üzere iki farklı grupta incelenmiştir. *MYCN* proto-onkogeninin, tümörlerin çoğunluğunda %20 oranında amplifiye durumda olması ve hasta yaşından bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmesinden kaynaklı böyle bir gruplandırma yapılmıştır [39-41].

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucu epigenetik faktörleri etkileyen 84 genin ifade düzeyleri saptanmıştır. *MYCN* geni amplifiye olmayan SK-N-AS ve SH-SY5Y hücre hatları kontrol grubu olarak *MYCN* geni amplifiye olan KELLY, SIMA MHH-NB-11, IMR32 ve CHP126 hücre hatlarında bu genlerin ifade düzeyleri araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

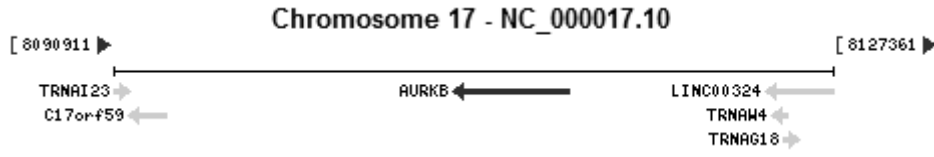
Birinci analizde *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmış ve *MYCN* amplifiye olan tek grup içerisinde incelenmiştir. $\Delta\Delta C_t$ formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda hedef grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *AURKB* geninin ifadesinde 6.45 kat, *ESCO2* geninin ifadesinde 6.75 kat, *HDAC2* geninin ifadesinde 5.41 kat, *PRMT8* geninin ifadesinde 5.80 kat ve *RNF2* geninin ifadesinde 4.12 kat artış gözlenmiştir. Aynı şekilde yapılan karşılaştırma sonucunda *HDAC9* geninin ifadesinde 4.51 ve *NEK6* geninin ifadesinde ise 4.66 kat azalış gözlenmiştir.

Kunitoku ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, mitoz ve mayoz sırasında Aurora Kinaz A (AURKA) proteini CENPA sentromer proteini ile direk etkileşime girmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmada AURKA proteini, CENPA proteininin ser7 kalıntısından fosforilasyonundan sorumludur. Aynı kalıntı AURKB proteini tarafından da fosforilasyona uğramaktadır. Erken mitozda AURKA ve AURKB proteinleri birbiri ardına CENPA proteini fosforillemektedir. Mitoz sırasında CENPA proteininin ser7 kalıntısından fosforillenmemesi sonucunda, mikrotübüller kinetokora tutunamamaktadır [280]. *AURKB* geninin baskılanması sonucunda normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin canlılığı ve çoğalma kapasiteleri etkilenirken [281-287], bölünmeyen hücrelerde bir etkisine rastlanmamıştır [287]. Bununla beraber Otto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *AURKA* geni *MYCN* amplifiye NB hücrelerinin büyümesi için gerekli olduğu fakat *MYCN* amplifiye olmayan NB hücrelerinde gerekli böyle bir gereksinimin bulunmadığı belirtilmiş, bunun sonucunda tümör seçilimi yapıldığı savunulmuştur [288].

Yapılan çalışmada *MYCN* amplifiye olan ve olmayan hücre hatları kıyaslandığı zaman, *AURKA* geninin ifadesinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum Otto ve arkadaşlarının savunduğu bulgulara ters düşmese de *AURKA* geninin *MYCN* amplifiye olmayan hücrelerdeki görevini sorgulatmaktadır.

JASPAR veritabanı ile elde edilen sonuçlara göre *AURKB* genine ait promotör dizisi ile *MYCN* transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi arasında %82 oranında bir eşleşme bulunmuştur. Fakat literatürde *MYCN* ile *AURKB* ifadesi arasında ilişki bulunduğunu gösterecek herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Aurora Kinaz B (*AURKB*) geni insan genomunun 17p13.1 bölgesinde bulunmaktadır. NB vakalarının %50'sinden fazlasında dengesiz kromozom 17q kazanımı ve hiperdiploid vakaların %40'ında bütün kromozom 17 kazanımı görülmektedir [55]. *MYCN* amplifiye olan hücre hatlarında görülen *AURKB* gen ifadesindeki artış kromozom 17q kazanımı ile ilişkili olabilir (Şekil 8).

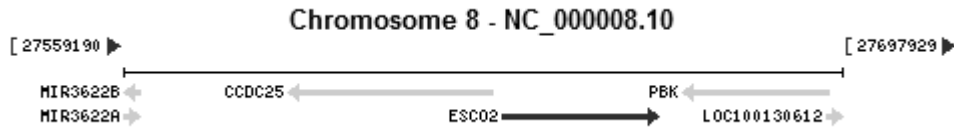


Şekil 8: *AURKB* geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9212>, erişim tarihi 30.05.2013)

Establishment of Cohesion 1 Homolog 2 (*ESCO2*) geninin kodladığı protein asetiltransferaz aktivitesi ile mitozun S fazında kardeş kromatidlerin birbirine tutunmasından görevlidir. *ESCO2* geninde oluşan mutasyonlar, otozomal resesif bir hastalık olan Roberts sendromu ile ilişkilendirilmiştir [289]. Literatürde *ESCO2* geni ile NB tümörleri arasında bağlantı olduğunu gösterecek herhangi bir yayın bulunmamaktadır.

ESCO2 geni insan genomunun 8p21.1 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 9). MHH-NB-11 hücre hattında bir adet fazladan kromozom 8 bulunmaktadır. Bunun haricinde diğer hücre hatlarında kromozom 8'i kapsayacak herhangi bir sitogenetik anomali gözlemlenmemiştir. Tek grupta toplanan *MYCN* amplifiye olan hücre hatları tek tek incelendiğinde *ESCO2* gen ifadesinin en çok KELLY hücre hattında olduğu görülmektedir. Diğer hücre hatlarında bu genin ifadesi kontrol grubuna nazaran fazla olmakla birlikte kendi aralarında yaklaşık aynıdır.



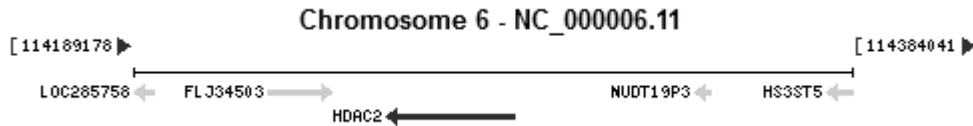
Şekil 9: *ESCO2* geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/157570>, erişim tarihi 30.05.2013)

JASPAR veritabanı ile elde edilen sonuçlara göre *ESCO2* genine ait promotör dizisi ile *MYCN* transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi arasında herhangi bir eşleşme bulunamamıştır. Bütün bu bilgiler ışığında, *ESCO2* genindeki ifade artışına *MYCN* geni amplifikasyonunun doğrudan neden olmadığı söylenebilse de bu artışa neden olabilecek diğer mekanizmaların incelenmesi sonucunda kesin bir yargıya ulaşılabilmektedir.

Histon Deasetilaz 2 (*HDAC2*), histon proteinlerinin N-ucunda bulunan lizin kalıntıları üzerindeki asetil gruplarını uzaklaştırmakla görevlidir [290]. Bugüne değin insan onkojenezinde *HDAC* genlerinin ifadesinde direkt bir değişiklik gözlenmemesine rağmen, *HDAC* proteinlerinin anormal aktivasyonu, iyi karakterize edilmiş hücresel onkojenez ve tümör baskılayıcı genler ile ilişkili olduğu, bunun sonucunda gen ifadesini değiştirdiği bilinmektedir [209-213].

HDAC2 geni insan genomunun 6q21 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 10). SIMA hücre hattında kromozom 6 ile kromozom 9 arasında parça değişimi tespit edilmiştir fakat *HDAC2* geninin bulunduğu bölge bu değişimden etkilenmemektedir. IMR-32 ve MHH-NB-11 hücre hatlarında bir adet fazladan kromozom 6 bulunmaktadır. *HDAC2* geninin ifade düzeylerine bakılacak olunursa, *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatlarına kıyasla KELLY hücre hattında 37.72 kat, SIMA hücre hattında 2.14 kat, MHH-NB-11 hücre hattında 6.00 kat, IMR-32 hücre hattında 3.36 kat ve CHP-126 hücre hattında ise 2.84 kat artış gözlenmiştir. IMR-32 ve MHH-NB-11 hücre hatları için *HDAC2* gen ifadesindeki artış fazladan kromozoma dayandırılabilirse de diğer hücre hatları için bir açıklama getirmemektedir.

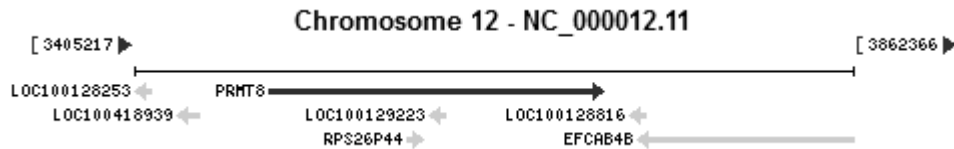


Şekil 10: *HDAC2* geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3066>, erişim tarihi 30.05.2013)

Marshall ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Nöroblastomda *HDAC2* geninin *MYCN* transkripsiyon faktörü ile regüle edildiği belirtilmiştir [291]. Proje sonucu elde edilen bulgular bu çalışmayı desteklemektedir. Buna ek olarak, JASPAR veritabanı ile elde edilen sonuçlara göre *HDAC2* genine ait promotör dizisi ile *MYCN* transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi arasında %93 oranında bir eşleşme bulunmuştur. *HDAC2* geninin *MYCN* transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmesinden kaynaklı eşleşme oranının yüksek çıktığı sonucuna varılabilir.

Protein arginin metiltransferaz 8 (*PRMT8*) posttranslasyonel modifikasyon sırasında proteinlerin arginin kalıntılarını metillemektedir. Arginin metilasyonunun; DNA tamiri, RNA transkripsiyonu, sinyal iletimi gibi birçok hücresel işlevi bulunmaktadır [292]. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada rekombinant *PRMT8* geninin beyin dokusunda ifade edildiği ve tercihen histon H4 üzerinde bulunan arginin kalıntılarını metillediği belirtilmiştir [292]. Aynı şekilde, Kousaka ve arkadaşlarının fare model sistemleri üzerine yaptığı çalışmada da *PRMT8* geninin beyin hücrelerinde tercihen ifade edildiği ve nöral gelişimde rol oynadığı belirtilmiştir [293]. Buna ek olarak literatürde *PRMT8* geni ile NB arasında bir ilişki olduğunu belirten herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Eş zamanlı PCR analizi sonucu elde ettiğimiz Ct değerlerine göre *PRMT8* geninin ifadesi hem *MYCN* amplifiye olmayan kontrol grubunda hem de *MYCN* amplifiye olan test grubunda düşük çıkmıştır. Sonuçlar değerlendirilecek olunursa *PRMT8* geninin nöral gelişimde rolü olmasına karşın NB tümörü gelişiminde pozitif bir etkisinin bulunmadığını söyleyebiliriz. Buna karşın, bu genin ifade düzeyinin düşük olması sonucunda nöron öncül hücrelerinin farklılaşma sürecinde *PRMT8* geninin ifadesine ihtiyaç duyduğu ve bunun yoksunluğunda olması gerektiği gibi farklılaşamayıp tümör hücresi oluşturduğu fikri öne sürülebilir.



Şekil 11: *PRMT8* geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56341>, erişim tarihi 30.05.2013)

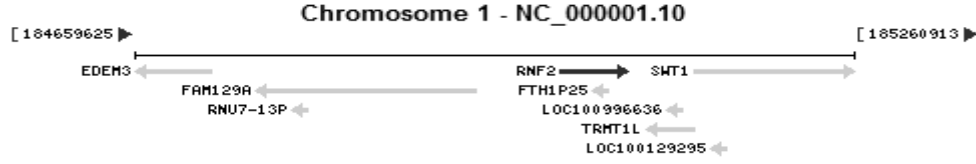
PRMT8 geni insan genomunun 12p13.3 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 11). SIMA hücre hattında 12. kromozomun q21q24 bölgesinde inversiyon tespit edilmiştir fakat bu bölge *PRMT8* genini kapsamamaktadır. Aynı şekilde CHP-126 hücre hattında tespit edilen 12. kromozomun q24.32 bölgesindeki kayıp da bu geni etkilememektedir. IMR-32 hücre hattında bir adet fazladan kromozom 12 bulunmaktadır. Buna rağmen, *PRMT8* geninin ifadesinde kontrol grubuna oranla

IMR-32 hücre hattında 1,23 kat artış gözlemlenmiştir. KELLY hücre hattında görülen 27.51 kat fark ise kontrol ve test gruplarında gen ifadesinin çok düşük olmasından kaynaklı düzgün bir hesaplama yapılması ile açıklanabilir. *PRMT8* genine ait deneysel olarak kanıtlanmış herhangi bir promotör dizisi bulunmadığı için MYCN transkripsiyon faktörü ile düzenlenip düzenlenmediği konusunda bir bilgi elde edilememiştir.

Ring finger protein 2 (*RNF2*), polycomb grup (PcG) protein ailesine mensup olan, ubiquitin ligaz 3 (E3) aktivitesi ile transkripsiyonu baskılamada ve gelişimsel süreçte etkili olan genlerin düzenlenmesinde görev alan bir proteindir [294,295]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada E3 ubiquitin kompleksinin histon H2A proteininde 119. aminoasit olan lizin kalıntısını ubiquitinlediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada HeLa hücrelerinde *RNF2* geninin ifadesi azaltıldığı zaman histon H2A proteinin ubiquitinlenmesinde yüksek oranda bir düşüş gözlemlenmişlerdir [295]. Boyer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *RNF2* proteinin de içinde bulunduğu polycomb baskılayıcı komplekslerin histon H3 üzerinde bulunan 27. lizin kalıntısını trimetillemekten sorumlu olduğu ve bunun sonucunda embriyonik kök hücrelerde genlerin susturulduğu belirtilmiştir [296]. Literatürde polycomb kompleks proteini olan *BMI1* geninin aşırı ifadesinin NB tümörüne yol açtığı belirtilmişse de *RNF2* geni ile ilgili doğrudan bir bilgi bulunmamaktadır [297]. Proje kapsamında yapılan çalışmada, *RNF2* geninin ifadesinde MYCN amplifiye olmayan kontrol grubuna oranla MYCN amplifiye olan test grubunda 4.12 kat artış gözlenmiştir. Hücre hatları tek tek incelendiğinde KELLY hücre hattında 19.19 kat ifade artışı gözlenirken SIMA hücre hattında ifade artışı belirlenmemiştir. Bu çeşitlilik hücre hatlarının sitogenetik anomalileri farklılıklarından kaynaklanabilir.

RNF2 geni insan genomunda 1. kromozomun q25.3 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 12). IMR-32 hücre hattında bir adet ve MHH-NB-11 hücre hattında iki adet fazladan kromozom 1 bulunmaktadır. Bunun haricinde bütün hücre hatlarında 1. kromozomun içinde bulunduğu bir çok sitogenetik anomali saptanmıştır. JASPAR veritabanında MYCN transkripsiyon faktörünün *RNF2* genine ait promotöre bağlanma yüzdesi %91 olarak bulunmuştur. Literatürde *RNF2* geninin MYCN transkripsiyon

faktörü tarafından düzenlendiğine dair bir bilgi bulunmasa da elde edilen bağlanma yüzdesi böyle bir düşüncenin doğru olabileceğini akla getirmektedir.



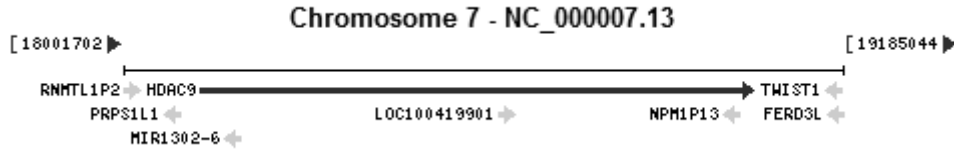
Şekil 12: *RNF2* geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6045>, erişim tarihi 30.05.2013)

Histon deasetilaz 9 (*HDAC9*) sınıf 2 HDAC protein ailesine mensuptur ve histon proteinleri üzerinde bulunan asetil gruplarının uzaklaştırılmasından sorumludur. HDAC proteinlerinin inhibisyonu histon proteinlerinin hiperasetilasyonu ile sonuçlanırken bu durum DNA yapısını gevşeterek bir dizi genin aktivasyonuna neden olmaktadır [217]. HDAC inhibisyonunun *in vivo* ve *in vitro*'da büyümeyi durdurduğu, farklılaşmaya veya kanser hücrelerinin apoptozuna neden olduğu bilinmektedir [213,216-226]. Sınıf 1 HDAC proteinlerinin genel olarak bütün hücre çeşitlerinde ifadesi gözlenirken sınıf 2 HDAC proteinlerinin kısıtlı sayıda hücre çeşidinde ifadesinin gözlenmesi bu sınıf proteinlerin hücrelerel farklılaşma ve gelişimde rol oynadığı fikrini doğurmuştur [228,229]. *HDAC8* geninin aşırı ifadesi NB tümörlerinde kötü prognozla ilişkilendirilse de literatürde *HDAC9* gen ifadesinin NB üzerindeki etkilerini içeren bir yayın bulunmamaktadır [298].

Proje kapsamında yapılan araştırmada *HDAC9* gen ifadesinin KELLY ve MHH-NB-11 hücre hatlarında normal olduğu, SIMA ve IMR-32 hücre hatlarında düşük olduğu ve CHP-126 hücre hattında ise yüksek olduğu gözlenmiştir. SIMA hücre hattında gözlenen ifade azlığının sebebi test grubunda ifade düzeyinin algılanamayacak kadar düşük olmasından kaynaklı kontrol grubu ile doğru bir karşılaştırma yapılamamasıdır. Diğer hücre hatlarındaki ifade düzeylerindeki heterojeniteye hücre hatlarının sahip olduğu sitogenetik anomaliler neden olabilir. *HDAC9* geni insan genomunda 7. kromozomun p21.1 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 13). KELLY ve MHH-NB-11 ve SH-SY5Y hücre hatlarında birer adet fazladan kromozom 7 bulunmaktadır. Bu hücrelerde *HDAC9* geninin ifade düzeyinin normal

olması fazladan bulunan bu kromozomla ilişkili olabilir. CHP-126 hücre hattında 7. kromozomun p15p22 bölgesinde duplikasyon bulunmaktadır ve *HDAC9* geni bu bölge içinde yer almaktadır. CHP-126 hücre hattında *HDAC9* gen ifadesinin 2.62 kat fazla olmasının sebebi olarak bu duplikasyon gösterilebilir.



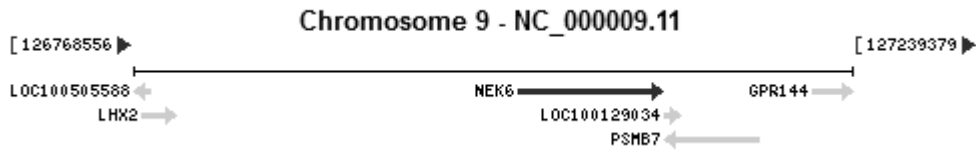
Şekil 13: *HDAC9* geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9734>, erişim tarihi 30.05.2013)

NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6 (NEK6) proteini mitozun başlaması için gerekli olan bir tür serin/thrionin kinazdır ve bu proteini kodlayan genin inaktivasyonu mitotik çıkış için gereklidir [299]. Jean ve arkadaşlarının insan hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada NEK6 proteininin mitozun M fazında fosforillenerek aktif hale geldiğini ve inaktivasyonu sonucu hücreler M fazında tutularak apoptozun indüklendiği belirtilmiştir [299]. *NEK6* geni Nöroblastomun içinde bulunduğu bir dizi insan kanseri türü ile ilişkisi bulunmuş olan genomun 9q33-34 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 14) [300,301]. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre DNA hasarı sonrası hücrenin G2/M fazında tutulması için NEK6 işlevinin ortadan kaldırılması gerekmektedir [302]. KELLY ve SH-SY5Y hücre hatlarında 9q34 kazanımı bulunmaktadır. Aynı bölgenin SIMA hücre hattında translokasyonu ve IMR-32 hücre hattında kaybı bulunmaktadır. Gerçek zamanlı PCR analizi sonucu elde edilen Ct değerlerine göre MHH-NB-11 ve IMR-32 hücre hatlarında *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatlarına oranla NEK6 geninin ifadesinde bir değişiklik görülmemiştir.

KELLY, SIMA ve CHP-126 hücre hatlarında ise *MYCN* amplifiye olmayan hücre hatlarına oranla *NEK6* geninin ifadesinde azalış gözlemlenmiştir. KELLY hücre hattında görülen ifade azalışının sebebi Ct değerinin cut-off değeri olan 33'ten fazla olmasıdır. Bu sonuç, *NEK6* geninin KELLY hücre hattında ifadesinin bulunmadığını veya çok az olduğunu göstermektedir. SIMA hücre hattında görülen ifade azalışının

sebebi bu bölgenin 6. kromozomun p21 bölgesi ile yer değiştirmesinden kaynaklı gen işlevinin kaybolması olabilir. Yapılan çalışma sonucu *MYCN* amplifiye olan hücre hatlarında *NEK6* geninin ifadesinde genel bir azalış gözlemlenmişse de bu azalış hücrelerin apoptoza indüklenmesi için yeterli olmamıştır. *NEK6* gen ifadesindeki azalış hücre kültürü şartları ile ilişkili olabilir. Başka bir deyişle, in vitro koşullarda hücrelerin maruz kaldığı stres sonucu *NEK6* geninin ifadesi yeniden düzenlenmiş ve hücre döngüsü durdurulmaya çalışılmış olabilir.



Şekil 14: NEK6 geninin insan genomundaki konumu

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10783>, erişim tarihi 30.05.2013)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Proje kapsamında yürütülen çalışma, iki adet *MYCN* geni amplifikasyonu bulunmayan ve beş adet *MYCN* geni amplifikasyonu bulunan toplam yedi adet hücre hattı içermektedir. *MYCN* amplifikasyonu gözlenmeyen hücre hatları kontrol grubu olarak belirlenmiş ve *MYCN* amplifikasyonu bulunan hücre hatlarında epigenetik değişiklikleri etkileyen 84 adet genin ifade farklılıkları araştırılmıştır. Araştırma sonucu elde edilen veriler ışığında ifade farklılığı gözlenen genler hedef alınarak *MYCN* amplifikasyonu ile ilişkisi tartışılmıştır.

Nöroblastom tümörleri sitogenetik açıdan oldukça heterojen olduğu bilinmektedir. Yapılan deneyler ve elde edilen sonuçlar ışığında genetik faktörler kadar epigenetik değişikliklerin de Nöroblastom patolojisinde etkili olabileceği kanısındayız. Bu anlamda, NB tanı ve tedavisi sürecinde epigenetik faktörlerin araştırılıp hedef alınmasının yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapmış olduğumuz bu çalışma, Nöroblastom hücre hatlarında epigenetik değişiklikleri etkileyen belirli genlerde ifade artışı ya da azalışı olduğunu göstermiştir. Buradan elde ettiğimiz bilgiler ışığında, literatürde yetersiz olan, Nöroblastom tümörleri üzerinde epigenetik faktörlerin etkisi hakkında önemli bir veri sunduğumuz kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, Ovid Technologies Inc. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer [Electronic Book] : principles & practice of oncology. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008
2. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1999;340:1954-1961
3. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334:225-230
4. Selzer RR, Richmond TA, Pofahl NJ, et al. Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44:305-319
5. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21-33
6. Tonini GP, Romani M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003;197:69-73
7. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37-50
8. Cheung N-KV, Cohn SL, SpringerLink (Online service). Neuroblastoma. In, *Pediatric oncology*,. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005
9. Beckwith JB, Perrin EV. In Situ Neuroblastomas: A Contribution to the Natural History of Neural Crest Tumors. *Am J Pathol* 1963;43:1089-1104
10. Rothenberg AB, Berdon WE, D'Angio GJ, Yamashiro DJ, Cowles RA. Neuroblastoma-remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison. *Pediatr Radiol* 2009;39:155-160
11. Wright JH. Neurocytoma or Neuroblastoma, a Kind of Tumor Not Generally Recognized. *J Exp Med* 1910;12:556-561

12. Gross RE, Farber S, Martin LW. Neuroblastoma sympatheticum; a study and report of 217 cases. *Pediatrics* 1959;23:1179-1191
13. Wittenborg MH. Roentgen therapy in neuroblastoma; a review of seventy three cases. *Radiology* 1950;54:679-688
14. Cushing H, Wolbach SB. The Transformation of a Malignant Paravertebral Sympathicoblastoma into a Benign Ganglioneuroma. *Am J Pathol* 1927;3:203-216 207
15. Koop CE, Hope JW, Abir E. Management of Nephroblastoma (Wilms'tumor) and Abdominal Neuroblastoma. *CA Cancer J Clin* 1964;14:178-186
16. Pinkel D, Pratt C, Holton C, et al. Survival of children with neuroblastoma treated with combination chemotherapy. *J Pediatr* 1968;73:928-931
17. Gestblom C, Grynfeld A, Ora I, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor dHAND, a marker gene for the developing human sympathetic nervous system, is expressed in both high- and low-stage neuroblastomas. *Lab Invest* 1999;79:67-79
18. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 2002;346:1041-1046
19. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362:2202-2211
20. Linet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1051-1058
21. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86:364-372
22. Wang Q, Diskin S, Rappaport E, et al. Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res* 2006;66:6050-6062
23. Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27:289-297

24. Trochet D, O'Brien LM, Gozal D, et al. PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;76:421-426
25. McConville C, Reid S, Baskcomb L, Douglas J, Rahman N. PHOX2B analysis in non-syndromic neuroblastoma cases shows novel mutations and genotype-phenotype associations. *Am J Med Genet A* 2006;140:1297-1301
26. van Limpt V, Schramm A, van Lakeman A, et al. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene* 2004;23:9280-9288
27. Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* 2008;27:469-476
28. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455:930-935
29. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:967-970
30. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11-23
31. George RE, Sanda T, Hanna M, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:975-978
32. Kushner BH, Gilbert F, Helson L. Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* 1986;57:1887-1893
33. Chen QR, Bilke S, Wei JS, et al. cDNA array-CGH profiling identifies genomic alterations specific to stage and MYCN-amplification in neuroblastoma. *BMC Genomics* 2004;5:70
34. Mosse YP, Greshock J, Margolin A, et al. High-resolution detection and mapping of genomic DNA alterations in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:390-403
35. Spitz R, Oberthuer A, Zapatka M, et al. Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals

- aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:1130-1142
36. Carr J, Bown NP, Case MC, et al. High-resolution analysis of allelic imbalance in neuroblastoma cell lines by single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;172:127-138
 37. Michels E, Vandesompele J, De Preter K, et al. ArrayCGH-based classification of neuroblastoma into genomic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:1098-1108
 38. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1026-1033
 39. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-1124
 40. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313:1111-1116
 41. Canete A, Gerrard M, Rubie H, et al. Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *J Clin Oncol* 2009;27:1014-1019
 42. Schleiermacher G, Peter M, Michon J, et al. Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:275-281
 43. Caron H, Spieker N, Godfried M, et al. Chromosome bands 1p35-36 contain two distinct neuroblastoma tumor suppressor loci, one of which is imprinted. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:168-174
 44. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer* 2001;91:680-686

45. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005;353:2243-2253
46. Maris JM, Weiss MJ, Guo C, et al. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000;18:1888-1899
47. Weiss MJ, Guo C, Shusterman S, et al. Localization of a hereditary neuroblastoma predisposition gene to 16p12-p13. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:526-530
48. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-819
49. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 2005;11:1119-1128
50. Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:940-949
51. Guo C, White PS, Weiss MJ, et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999;18:4948-4957
52. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. FISH analyses for alterations in chromosomes 1, 2, 3, and 11 define high-risk groups in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:30-35
53. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:52-58
54. Simon T, Spitz R, Hero B, Berthold F, Faldum A. Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastoma by the status of chromosomes 1p and 11q. *Cancer Lett* 2006;237:215-222

55. Bown N, Lastowska M, Cotterill S, et al. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:14-19
56. Chen ST, Lee JC. An inflammatory myofibroblastic tumor in liver with ALK and RANBP2 gene rearrangement: combination of distinct morphologic, immunohistochemical, and genetic features. *Hum Pathol* 2008;39:1854-1858
57. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984;311:231-235
58. Bowman LC, Castleberry RP, Cantor A, et al. Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:373-380
59. George RE, London WB, Cohn SL, et al. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2005;23:6466-6473
60. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, et al. Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *J Clin Oncol* 2009;27:365-370
61. Schneiderman J, London WB, Brodeur GM, et al. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26:913-918
62. Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1430-1437; discussion 1437-1438
63. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003;4:472-480
64. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106-2120
65. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991;9:581-591

66. Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1208-1219
67. Caren H, Fransson S, Ejekkar K, Kogner P, Martinsson T. Genetic and epigenetic changes in the common 1p36 deletion in neuroblastoma tumours. *Br J Cancer* 2007;97:1416-1424
68. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473-1479
69. Mora J, Cheung NK, Chen L, Qin J, Gerald W. Loss of heterozygosity at 19q13.3 is associated with locally aggressive neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1358-1361
70. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, et al. Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 1995;64:207-210
71. Fallon KB, Palmer CA, Roth KA, et al. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:314-322
72. Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, et al. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1098-1104
73. Ohgaki H, Schauble B, zur Hausen A, von Ammon K, Kleihues P. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch* 1995;427:113-118
74. Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 1999;18:4144-4152
75. Smith JS, Tachibana I, Lee HK, et al. Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:16-25
76. Alaminos M, Davalos V, Roperio S, et al. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of

- a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res* 2005;65:2565-2571
77. Martinsson T, Sjöberg RM, Hedborg F, Kogner P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res* 1995;55:5681-5686
 78. Martinsson T, Sjöberg RM, Hallstensson K, et al. Delimitation of a critical tumour suppressor region at distal 1p in neuroblastoma tumours. *Eur J Cancer* 1997;33:1997-2001
 79. Ejleskar K, Abel F, Sjöberg R, et al. Fine mapping of the human preprocortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3-->p36.2, but absence of mutations in primary tumors. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89:62-66
 80. Abel F, Sjöberg RM, Ejleskar K, Krona C, Martinsson T. Analyses of apoptotic regulators CASP9 and DFFA at 1P36.2, reveal rare allele variants in human neuroblastoma tumours. *Br J Cancer* 2002;86:596-604
 81. Abel F, Sjöberg RM, Krona C, Nilsson S, Martinsson T. Mutations in the N-terminal domain of DFF45 in a primary germ cell tumor and in neuroblastoma tumors. *Int J Oncol* 2004;25:1297-1302
 82. Caren H, Ejleskar K, Fransson S, et al. A cluster of genes located in 1p36 are down-regulated in neuroblastomas with poor prognosis, but not due to CpG island methylation. *Mol Cancer* 2005;4:10
 83. Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci* 2002;981:61-81
 84. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:143-153
 85. Ordway JM, Curran T. Methylation matters: modeling a manageable genome. *Cell Growth Differ* 2002;13:149-162
 86. Freiman RN, Tjian R. Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* 2003;112:11-17
 87. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003;421:448-453

88. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-254
89. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984;37:179-183
90. Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984;308:548-550
91. Pal N, Wadey RB, Buckle B, et al. Preferential loss of maternal alleles in sporadic Wilms' tumour. *Oncogene* 1990;5:1665-1668
92. Schroeder WT, Chao LY, Dao DD, et al. Nonrandom loss of maternal chromosome 11 alleles in Wilms tumors. *Am J Hum Genet* 1987;40:413-420
93. Scrable H, Cavenee W, Ghavimi F, et al. A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7480-7484
94. Williams JC, Brown KW, Mott MG, Maitland NJ. Maternal allele loss in Wilms' tumour. *Lancet* 1989;1:283-284
95. Hanash S. Integrated global profiling of cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:638-644
96. Zardo G, Tiirikainen MI, Hong C, et al. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet* 2002;32:453-458
97. Weinmann AS, Yan PS, Oberley MJ, Huang TH, Farnham PJ. Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* 2002;16:235-244
98. Mori Y, Yin J, Sato F, et al. Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res* 2004;64:2434-2438
99. Nouzova M, Holtan N, Oshiro MM, et al. Epigenomic changes during leukemia cell differentiation: analysis of histone acetylation and cytosine methylation using CpG island microarrays. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:968-981

100. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002;31:141-149
101. Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2002;62:961-966
102. Gius D, Cui H, Bradbury CM, et al. Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. *Cancer Cell* 2004;6:361-371
103. Shi H, Wei SH, Leu YW, et al. Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation. *Cancer Res* 2003;63:2164-2171
104. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-167
105. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054
106. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427-5440
107. Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87-101
108. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-428
109. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004;18:2315-2335
110. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:287-299
111. Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 2003;23:206-215
112. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13225-13230

113. Liang G, Lin JC, Wei V, et al. Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7357-7362
114. Boggs BA, Cheung P, Heard E, et al. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet* 2002;30:73-76
115. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301:89-92
116. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:138-162
117. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989;83:155-158
118. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991;48:880-888
119. Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, et al. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 1993;8:1063-1067
120. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8681-8686
121. Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res* 2002;12:543-554
122. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;111:47-54
123. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, et al. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7149-7153
124. Adorjan P, Distler J, Lipscher E, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e21

125. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, et al. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 2003;162:1151-1162
126. Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, et al. Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003;23:1663-1670
127. Akiyama Y, Maesawa C, Ogasawara S, Terashima M, Masuda T. Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. *Am J Pathol* 2003;163:1911-1919
128. Cho M, Uemura H, Kim SC, et al. Hypomethylation of the MN/CA9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2001;85:563-567
129. Nakamura N, Takenaga K. Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:471-479
130. Badal V, Chuang LS, Tan EH, et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003;77:6227-6234
131. de Capoa A, Musolino A, Della Rosa S, et al. DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep* 2003;10:545-549
132. Sato N, Maitra A, Fukushima N, et al. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003;63:4158-4166
133. Piyathilake CJ, Henao O, Frost AR, et al. Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14:37-42
134. Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:34-39

135. Yeh A, Wei M, Golub SB, et al. Chromosome arm 16q in Wilms tumors: unbalanced chromosomal translocations, loss of heterozygosity, and assessment of the CTCF gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35:156-163
136. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14412-14417
137. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999;402:187-191
138. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-257
139. Blanco-Betancourt CE, Moncla A, Milili M, et al. Defective B-cell-negative selection and terminal differentiation in the ICF syndrome. *Blood* 2004;103:2683-2690
140. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, et al. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10060-10065
141. Bachman KE, Park BH, Rhee I, et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003;3:89-95
142. Buschhausen G, Wittig B, Graessmann M, Graessmann A. Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1177-1181
143. Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 1986;44:535-543
144. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992;69:905-914

145. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5085-5092
146. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-191
147. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-389
148. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000;25:269-277
149. Wade PA, Geron A, Jones PL, et al. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999;23:62-66
150. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000;406:593-599
151. Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14967-14972
152. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, et al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2002;62:6456-6461
153. el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, et al. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3470-3474
154. Lee PJ, Washer LL, Law DJ, et al. Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10366-10370
155. De Marzo AM, Marchi VL, Yang ES, et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1999;59:3855-3860

156. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 1999;59:2302-2306
157. Hsiao WL, Gattoni-Celli S, Weinstein IB. Effects of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation. *Mol Cell Biol* 1985;5:1800-1803
158. Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979;17:771-779
159. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:95-101
160. Nakayama M, Wada M, Harada T, et al. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1998;92:4296-4307
161. Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* 2003;286:355-365
162. Okoji RS, Yu RC, Maronpot RR, Froines JR. Sodium arsenite administration via drinking water increases genome-wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl-deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 2002;23:777-785
163. West RW, Barrett JC. Inactivation of a tumor suppressor function in immortal Syrian hamster cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Carcinogenesis* 1993;14:285-289
164. Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005;37:853-862
165. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2545-2550
166. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808-811

167. Cui H, Horon IL, Ohlsson R, Hamilton SR, Feinberg AP. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nat Med* 1998;4:1276-1280
168. Luger K, Richmond TJ. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:140-146
169. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999;98:285-294
170. Van Holde KE. *Chromatin*. New York: Springer-Verlag; 1989:xii, 497 p.
171. Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 1999;27:711-720
172. Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 1995;80:583-592
173. Edmondson DG, Smith MM, Roth SY. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* 1996;10:1247-1259
174. Hansen JC, Tse C, Wolffe AP. Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 1998;37:17637-17641
175. Turner BM. Decoding the nucleosome. *Cell* 1993;75:5-8
176. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;389:349-352
177. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-1080
178. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41-45
179. Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:198-209
180. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:286-298
181. Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:163-176

182. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:838-849
183. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37:391-400
184. Hake SB, Xiao A, Allis CD. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 2004;90:761-769
185. Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T. Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem Sci* 2002;27:396-402
186. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002;419:624-629
187. Hess JL. Mechanisms of transformation by MLL. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:235-254
188. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;15:2343-2360
189. Sanders SL, Portoso M, Mata J, et al. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 2004;119:603-614
190. Byvoet P, Shepherd GR, Hardin JM, Noland BJ. The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 1972;148:558-567
191. Thomas G, Lange HW, Hempel K. [Relative stability of lysine-bound methyl groups in arginine-rich histones and their subfractions in Ehrlich ascites tumor cells in vitro]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1972;353:1423-1428
192. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004;119:941-953
193. Clissold PM, Ponting CP. JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem Sci* 2001;26:7-9
194. Katoh M. Identification and characterization of JMJD2 family genes in silico. *Int J Oncol* 2004;24:1623-1628
195. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 2003;425:475-479

196. Gross DS, Garrard WT. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 1988;57:159-197
197. McGhee JD, Felsenfeld G. Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 1980;49:1115-1156
198. Norton VG, Marvin KW, Yau P, Bradbury EM. Nucleosome linking number change controlled by acetylation of histones H3 and H4. *J Biol Chem* 1990;265:19848-19852
199. Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 1993;72:73-84
200. Brownell JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:176-184
201. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998;12:599-606
202. Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C. Patterns of histone acetylation. *Eur J Biochem* 1990;193:701-713
203. Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 2001;10:693-698
204. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000;20:6891-6903
205. Bjerling P, Silverstein RA, Thon G, et al. Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol Cell Biol* 2002;22:2170-2181
206. Clarke DJ, O'Neill LP, Turner BM. Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1993;294 (Pt 2):557-561
207. O'Neill LP, Turner BM. Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *EMBO J* 1995;14:3946-3957

208. Jeppesen P, Turner BM. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 1993;74:281-289
209. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 2000;184:1-16
210. Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, Harel-Bellan A. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:728-736
211. He LZ, Tolentino T, Grayson P, et al. Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 2001;108:1321-1330
212. Zhou DC, Kim SH, Ding W, et al. Frequent mutations in the ligand-binding domain of PML-RARalpha after multiple relapses of acute promyelocytic leukemia: analysis for functional relationship to response to all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo. *Blood* 2002;99:1356-1363
213. Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:8492-8497
214. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-174
215. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999;21:103-107
216. Forsberg EC, Bresnick EH. Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* 2001;23:820-830
217. Suenaga M, Soda H, Oka M, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2002;97:621-625
218. Pelidis MA, Carducci MA, Simons JW. Cytotoxic effects of sodium phenylbutyrate on human neuroblastoma cell lines. *Int J Oncol* 1998;12:889-893

219. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20:6969-6978
220. Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, et al. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* 2001;499:199-204
221. Remiszewski SW, Sambucetti LC, Atadja P, et al. Inhibitors of human histone deacetylase: synthesis and enzyme and cellular activity of straight chain hydroxamates. *J Med Chem* 2002;45:753-757
222. Lavoie R, Bouchain G, Frechette S, et al. Design and synthesis of a novel class of histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:2847-2850
223. Kim MS, Son MW, Kim WB, In Park Y, Moon A. Apicidin, an inhibitor of histone deacetylase, prevents H-ras-induced invasive phenotype. *Cancer Lett* 2000;157:23-30
224. Sandor V, Bakke S, Robey RW, et al. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res* 2002;8:718-728
225. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:194-202
226. Kijima M, Yoshida M, Sugita K, Horinouchi S, Beppu T. Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Biol Chem* 1993;268:22429-22435
227. Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 2002;277:25748-25755
228. Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, et al. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* 2000;350 Pt 1:199-205
229. Galasinski SC, Resing KA, Goodrich JA, Ahn NG. Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem* 2002;277:19618-19626

230. Mutskov V, Felsenfeld G. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J* 2004;23:138-149
231. Mummaneni P, Yates P, Simpson J, Rose J, Turker MS. The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse *aprt* gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5163-5169
232. Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Mol Cell Biol* 2003;23:4056-4065
233. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:1068-1075
234. Song JZ, Stirzaker C, Harrison J, Melki JR, Clark SJ. Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (*GSTP1*) in prostate cancer cells. *Oncogene* 2002;21:1048-1061
235. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 2002;31:175-179
236. Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, et al. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:7025-7029
237. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* 2002;62:7213-7218
238. Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 2002;296:1254-1258
239. Levinger L, Varshavsky A. Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell* 1982;28:375-385
240. Robzyk K, Recht J, Osley MA. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 2000;287:501-504

241. Thorne AW, Sautiere P, Briand G, Crane-Robinson C. The structure of ubiquitinated histone H2B. *EMBO J* 1987;6:1005-1010
242. Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR, Meistrich ML. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* 1998;273:13165-13169
243. Pham AD, Sauer F. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 2000;289:2357-2360
244. Bradbury EM. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 1992;14:9-16
245. Koshland D, Strunnikov A. Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:305-333
246. Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 1991;65:775-783
247. Thomson S, Mahadevan LC, Clayton AL. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10:205-214
248. Chadee DN, Hendzel MJ, Tylipski CP, et al. Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 1999;274:24914-24920
249. Yang Q, Zage P, Kagan D, et al. Association of epigenetic inactivation of RASSF1A with poor outcome in human neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:8493-8500
250. Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, et al. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2007;13:3191-3197
251. Teitz T, Wei T, Valentine MB, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000;6:529-535
252. de Ruijter AJ, Kemp S, Kramer G, et al. The novel histone deacetylase inhibitor BL1521 inhibits proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1279-1288

253. Stupack DG, Teitz T, Potter MD, et al. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 2006;439:95-99
254. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001;293:1068-1070
255. Metzger E, Wissmann M, Yin N, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 2005;437:436-439
256. Shi YJ, Matson C, Lan F, et al. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 2005;19:857-864
257. Schulte JH, Lim S, Schramm A, et al. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res* 2009;69:2065-2071
258. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4:357-362
259. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408
260. Ren Z, Shin A, Cai Q, et al. IGFBP3 mRNA expression in benign and malignant breast tumors. *Breast Cancer Res* 2007;9:R2
261. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-1108
262. McCulloch RS, Ashwell MS, O'Nan AT, Mente PL. Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage. *J Anim Sci Biotechnol* 2012;3:36
263. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034
264. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample

- integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004;26:509-515
265. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002:xxxiv, 1463 p.
 266. Wasserman WW, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet* 2004;5:276-287
 267. Schmid CD, Praz V, Delorenzi M, Perier R, Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database EPD: the impact of in silico primer extension. *Nucleic Acids Res* 2004;32:D82-85
 268. Hannenhalli S, Levy S. Promoter prediction in the human genome. *Bioinformatics* 2001;17 Suppl 1:S90-96
 269. Stormo GD. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics* 2000;16:16-23
 270. Aerts S, Van Loo P, Thijs G, et al. TOUCAN 2: the all-inclusive open source workbench for regulatory sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W393-396
 271. Berezikov E, Guryev V, Cuppen E. CONREAL web server: identification and visualization of conserved transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W447-450
 272. Ho Sui SJ, Mortimer JR, Arenillas DJ, et al. oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* 2005;33:3154-3164
 273. Marinescu VD, Kohane IS, Riva A. MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. *BMC Bioinformatics* 2005;6:79
 274. Roepcke S, Grossmann S, Rahmann S, Vingron M. T-Reg Comparator: an analysis tool for the comparison of position weight matrices. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W438-441
 275. Sandelin A, Wasserman WW, Lenhard B. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res* 2004;32:W249-252

276. Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 2004;32:D91-94
277. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005;434:338-345
278. Vlieghe D, Sandelin A, De Bleser PJ, et al. A new generation of JASPAR, the open-access repository for transcription factor binding site profiles. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D95-97
279. Gale GB, D'Angio GJ, Uri A, Chatten J, Koop CE. Cancer in neonates: the experience at the Children's Hospital of Philadelphia. *Pediatrics* 1982;70:409-413
280. Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, et al. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* 2003;5:853-864
281. Manfredi MG, Ecsedy JA, Meetze KA, et al. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:4106-4111
282. Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, et al. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 2003;161:267-280
283. Hauf S, Cole RW, LaTerra S, et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 2003;161:281-294
284. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* 2004;10:262-267
285. Soncini C, Carpinelli P, Gianellini L, et al. PHA-680632, a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity. *Clin Cancer Res* 2006;12:4080-4089
286. Oke A, Pearce D, Wilkinson RW, et al. AZD1152 rapidly and negatively affects the growth and survival of human acute myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2009;69:4150-4158

287. Hardwicke MA, Oleykowski CA, Plant R, et al. GSK1070916, a potent Aurora B/C kinase inhibitor with broad antitumor activity in tissue culture cells and human tumor xenograft models. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1808-1817
288. Otto T, Horn S, Brockmann M, et al. Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2009;15:67-78
289. van der Lelij P, Godthelp BC, van Zon W, et al. The cellular phenotype of Roberts syndrome fibroblasts as revealed by ectopic expression of ESCO2. *PLoS One* 2009;4:e6936
290. Jung KH, Noh JH, Kim JK, et al. HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. *J Cell Biochem* 2012;113:2167-2177
291. Marshall GM, Gherardi S, Xu N, et al. Transcriptional upregulation of histone deacetylase 2 promotes Myc-induced oncogenic effects. *Oncogene* 2010;29:5957-5968
292. Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 2005;280:32890-32896
293. Kousaka A, Mori Y, Koyama Y, et al. The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS. *Neuroscience* 2009;163:1146-1157
294. Suzuki M, Mizutani-Koseki Y, Fujimura Y, et al. Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development* 2002;129:4171-4183
295. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 2004;431:873-878
296. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006;441:349-353
297. Martin-Perez D, Piris MA, Sanchez-Beato M. Polycomb proteins in hematologic malignancies. *Blood* 2010;116:5465-5475
298. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, et al. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2009;15:91-99

299. Yin MJ, Shao L, Voehringer D, Smeal T, Jallal B. The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. *J Biol Chem* 2003;278:52454-52460
300. Li MZ, Yu L, Liu Q, Chu JY, Zhao SY. Assignment of NEK6, a NIMA-related gene, to human chromosome 9q33. 3-->q34.11 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1999;87:271-272
301. Hashimoto Y, Akita H, Hibino M, Kohri K, Nakanishi M. Identification and characterization of Nek6 protein kinase, a potential human homolog of NIMA histone H3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:753-758
302. Lee MY, Kim HJ, Kim MA, et al. Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. *Cell Cycle* 2008;7:2705-2709

8. EKLER

ÖZGEÇMİŞ
BURCU ÖZÇİMEN

TC Kimlik No / Pasaport No:	44302295986
Doğum Yılı:	1984
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Narlıdere/İZMİR
Telefon :	0 505 816 0004
Faks :	
e-posta :	burcuozcimen@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	DEU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	Genetik		
TR	İYTE	Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Genetik	BSc.	2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	400-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade Örüntüsünün Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Oğuz ALTUNGÖZ Burcu ÖZÇİMEN Tıbbi Biyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/39-08	Tarih: 15.12.2011
	Doç.Dr.Oğuz ALTUNGÖZ'in sorumlusu Burcu ÖZÇİMEN'in yürütücüsü olduğu "Nöroblastom Hücre Hatlarında Epigenetik Değişiklikleri Düzenleyen Genlerin İfade Örüntüsünün Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	İmza
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	Besti
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Osman
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr..Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	