

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOM HÜCRE HATLARINDAKİ
miRNA EKSPRESYON PROFİLLERİYLE
GENETİK PARAMETRELER ARASINDAKİ
İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZKAN BAĞCI

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

DEU.HSI.PhD-2009970172

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOM HÜCRE HATLARINDAKİ
miRNA EKSPRESYON PROFİLLERİYLE
GENETİK PARAMETRELER ARASINDAKİ
İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK
DOKTORA TEZİ

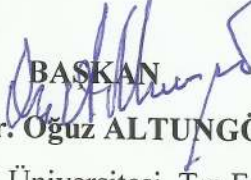
ÖZKAN BAĞCI

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. OĞUZ ALTUNGÖZ

(Bu araştırma DEÜ-Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2009.KB.SAG.021 sayı ile desteklenmiştir.)

DEU.HSI.PhD-2009970172

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi Özkan Bağcı “Nöroblastom Hücre Hatlarındaki miRNA Ekspresyon Profilleriyle Genetik Parametreler Arasındaki İlişkilerin Araştırılması” konulu Doktora tezini 22/05/2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


BAŞKAN

Doç. Dr. Oguz ALTUNGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı


ÜYE

Yrd. Doç Dr. Çağlar KARAKAYA

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

ÜYE

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı


ÜYE

Doç. Dr. Dilek GÜNEŞ İNCE

BUÇH Çocuk Onkolojisi Bölümü


ÜYE

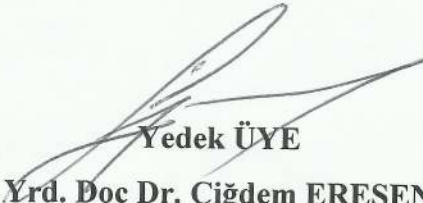
Prof. Dr. Gülgün OKTAY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yedek ÜYE

Doç. Dr. Cemal ÜN

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı


Yedek ÜYE

Yrd. Doç Dr. Çiğdem ERESEN

YAZICIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Tablolar Dizini.....	IV
Şekiller Dizini.....	V
Kısaltmalar	VI
Teşekkür	VII
Özet.....	1
Abstract.....	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	3-6
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	3
1.2. Araştırmanın Amacı.....	5
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7-21
2.1. Nöroblastom'un Tarihçesi ve Epidemiyolojisi	7
2.2. Nöroblastom'un Biyolojik Özellikleri	7
2.3. Nöroblastom'un Genetik Özellikleri	8
2.3.1. DNA Ploidisi	8
2.3.2. 1p allelik kaybı	9
2.3.3. MYCN Geni amplifikasyonu	9
2.3.4. 11q allelik kaybı ve 17q kazanımı	10
2.3.5. Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) ve paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gen Mutasyonları	10
2.4. Nöral Krest Gelişimi ve Nöroblastom	11
2.5. Sempatik Nöronların Farklılaşması ve Nöroblastom Gelişimi	13
2.6. Sempatik Nöronların Farklılaşma Sürecinde Rol Alan Genler	14
2.7. MikroRNA'lar (miRNA) ve Genel Özellikleri	17
2.7.1. miRNA Genlerinin Kansere İlişkisi	19
2.7.2. miRNA Genlerinin Nöroblastom ile İlişkisi	20

3. GEREÇ ve YÖNTEM	22-44
3.1. Araştırmanın Tipi	22
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	22
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	22
3.4. Çalışma Materyali	22
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	22
3.6. Veri Toplama Araçları.....	23
3.6.1. Hücre Hatlarını Çözme, Besleme ve Dondurma Protokolü	23
3.6.2. Hücre Hatlarından DNA İzolasyonu	24
3.6.3. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	25
3.6.4. miRNA Dizin Çalışması için RNA'nın Stabilize Edilmesi	26
3.6.5. Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)	27
3.6.6. miRNA Ekspresyon Profillerinin Mikro-dizin Yöntemi ile Belirlenmesi	33
3.6.6.1. Örneklerin Hazırlanması	33
3.6.6.2. Verilerin İşlenmesi	34
3.6.6.3. Mikro-dizin'in Kalite Kontrolü	34
3.6.6.4. Ekspresyon Farkının Analizi	35
3.6.7. MikroRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi	35
3.6.8. miRNA'ların Eş Zamanlı (Real Time) PCR ile Doğrulanması	37
3.6.8.1. Deneyin Aşamaları	38
3.7. Araştırma Planı	43
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	44
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	44
3.10. Etik Kurul Onayı	44
4. BULGULAR	45-64
4.1. Hücre Hatlarının DNA Ölçüm Sonuçları	45
4.2. MLPA Sonuçları	45
4.2.1. Hücre Hatlarının MLPA Sonuçlarına Göre Gruplandırılması	50
4.3. Hücre Hatlarının RNA Ölçüm Sonuçları	50
4.4. miRNA Mikro-dizin Sonuçları	52
4.5. miRNA'ların Saptanan Hedef Genleri	54

4.6. miRNA'ların Seçimi	56
4.6.1. Seçilen miRNA'ların Real Time PCR sonuçları	56
4.6.2. Seçilen miRNA'ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Farklılıkları Açısından Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları ile miRNA dizin Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	63
5. TARTIŞMA.....	65-71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	72-73
7. KAYNAKLAR	74-89
8. EKLER	90-95

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Nöral Krest Hücrelerinin Farklılaşma Sürecinde Rol Alan Genler	16
Tablo 2. MLPA Çalışmalarında Kullanılan Prob Setinde Hedef Alınan Genler, Bulundukları Lokuslar ve PCR Sonrası Baz Çifti Uzunlukları	28
Tablo 3. Hücre Hatlarının Genomik DNA'larının Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları	45
Tablo 4. P251-B1 Prob Çalışmaları ve Sonuçları	46
Tablo 5. P252-B1 Prob Çalışmaları ve Sonuçları	47
Tablo 6. P253-B1 Prob Çalışmaları ve Sonuçları	49
Tablo 7. Hücre Hatlarının Total RNA'larının Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları	51
Tablo 8. Grup2'ye Göre Grup1'de İstatistiksel Olarak Anlamlı Artış Saptanan miRNA'lar..	53
Tablo 9. Diana microT 4.0 ve miRanda web Tabanlı Yazılımı ile Saptanan Hedef Genler ...	54
Tablo 10. Birinci Gerçek Zamanlı PCR Çalışması ile Seçilmiş miRNA'ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Değişimi	59
Tablo 11. İkinci Gerçek Zamanlı PCR çalışması ile Seçilmiş miRNA'ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Değişimi	61
Tablo 12. Üçüncü Gerçek Zamanlı PCR çalışması ile Seçilmiş miRNA'ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Değişimi	62
Tablo 13. Seçilen miRNA'lar için Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları ile miRNA dizin Sonuçlarının Karşılaştırılması	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nöral krest hücrelerin oluşumu ve göç etmesi	12
Şekil 2. Sempatik nöronların farklılaşması ve nöroblastomun gelişimi	13
Şekil 3. miRNA oluşumu ve etki mekanizması	18
Şekil 4. miRNA'ların hedef mRNA'ya dört farklı bağlanma tipi	19
Şekil 5. Nükleosidlerin konformasyonu ve LNA yapısı	38
Şekil 6. RNA spike-in'den Elde Edilen Amplifikasyon eğrisi	57
Şekil 7. RNA spike-in ve Hücre Hatlarına Ait Amplifikasyon Eğrisi	57
Şekil 8. Snord 48'e Ait Amplifikasyon Eğrisi	58
Şekil 9. Gerçek zamanlı PCR çalışmasından elde edilen ekspresyon değişimi oranlarının ortalaması ile miRNA dizin çalışmasının sonuçlarının karşılaştırılması	64

KISALTMALAR

NB: Nöroblastom

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

CGH: Comparative Genomic Hiybrization

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

CCHS: Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu

HSCR: Hirschsprung sendromu

miRNA: MikroRNA

FDR: Pozitif Hata Oranı

LNA: Locked Nucleic Acid

LOH: Loss of Heterozygosity

MB: Medullablastom

TEŞEKKÜR

Akademik gelişimimin gerek yüksek lisans gerekse doktora süreci içerisinde, hem akademik hem de düşünsel anlamda kendisinden çok şey öğrendiğim, farklı bakış açılarıyla bana yeni ufuklar açan ve en önemlisi her türlü konuyu konuşabileceğim bir arkadaş yakınlığı gösteren çok değerli hocam; Doç. Dr. Oğuz Altungöz’e çok teşekkür ederim.

Süreç içinde gerek fikişsel gerekse bireysel anlamda hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen Araştırma Görevlisi Sait Tümer’e teşekkür ederim.

Çalışmalarımızın bir kısmını İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü BİYOMER’de gerçekleştirmiş olup, bu süreçte her türlü desteğini bizden esirgemeyen Yard. Doç Dr. Çağlar Karakaya’ya ve Uzman Evrim Balcı’ya teşekkür ederim.

Akademik anlamda yetişmemizde çok büyük katkıları olan Anabilim dalımızın çok değerli hocalarına teşekkür ederim. Süreç içinde maddi ve manevi anlamda desteğini benden esirgemeyen çok değerli aileme ve sevdiğime teşekkür ederim.

ÖZET

NÖROBLASTOM HÜCRE HATLARINDAKİ miRNA EKSPRESYON PROFİLLERİYLE GENETİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
Balçova-İzmir
ozkan.bagci@deu.edu.tr

Nöroblastomda delesyona uğrayan bölgelerde, çift vuruş (*double hit*) hipoteziyle uyumlu bir genin tanımlanamaması ve nöroblastom genetiğinde sıklıkla yapısal ve sayısal kromozomal aberasyonların gözlenmesine rağmen, gen mutasyonlarının çok nadir olarak görülmesi; son zamanlarda epigenetik değişimlerin araştırılmasına neden olmuştur. Nöroblastom örneklerinde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinde rol oynayan genlerde herhangi bir mutasyonun (*Phox2B* hariç) ve Transkripsiyonel epigenetik bir değişimin saptanmaması, bu genlerin, post-transkripsiyonel epigenetik mekanizmalarla susturulabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın temel amacı; Nöroblastomda sıklıkla delesyon gözlenen 11q veya 1p delesyonuna sahip olan hücre hatları ile delesyonun gözlenmediği hücre hatları arasındaki miRNA ekspresyon profillerini belirlemek ve nöral krest farklılaşma yolağında rol alan genlerin, ekspresyon değişikliği gözlenen miRNA'ların hedefi olup olmadıklarını belirlemektir. Çalışmamızda altı nöroblastom hücre hattının kromozomal aberasyonlarını MLPA yöntemiyle saptadık. Hücre hatlarının miRNA ekspresyon profillerini ise miRNA dizin çalışması ile gerçekleştirdik. Çalışmamızın sonucunda 1p delesyonu olan hücre hatlarında, 1p delesyonu olmayan hücre hatlarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren 33 miRNA saptadık. Bu miRNA'lar arasından miR-410, miR-543, miR-495 ve miR-494'ün en az üç geni hedef aldığını gösterdik. Seçilen miRNA'lardan miR-543, miR-495 ve miR-494'ün ekspresyon artışlarını ise gerçek zamanlı PCR çalışması ile doğruladık. Sonuç olarak; nöroblastomda sıklıkla gözlenen 1p delesyonunun, karsinogenez süreci bilinmeyen nöroblastomun ortaya çıkış nedenine ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom; 1p delesyonu; microRNA; 14q32 lokusu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONS BETWEEN miRNA EXPRESSION PROFILES AND GENETIC PARAMETERS IN NEUROBLASTOMA CELL LINES

Dokuz Eylül University, School of Medicine, Medical Biology and Genetics Department
Balçova-İzmir
ozkan.bagci@deu.edu.tr

Despite no gene being identified that is compatible with the double hit hypothesis and the observation of frequent structural and numerical chromosomal aberrations in neuroblastoma genetics in areas that are encounter deletion in neuroblastoma; the rare appearance of genetic mutations has led to the recent research of epigenetic changes. The fact that no mutations (excluding Phox2B) have been found in the genes that play a role in the transformation process of neural crest cells and no transcriptional epigenetic change has been determined in the studies that have been done to date on neuroblastoma examples suggests that these genes are able to be silenced with post-transcriptional epigenetic mechanisms. The main objective of our study is to determine the miRNA expression profiles between the cell lines that have 11q and 1p deletion, where deletion is frequently observed during neuroblastoma and the cell lines in which deletion is not observed and to determine whether the genes that play a role in the pathway of neural crest differentiation are the target of miRNA's in which expression change is observed. In our study, we determined the chromosomal aberrations of the six neuroblastoma cell lines using the MLPA technique. We carried out the miRNA expression profiles of cell lines with an miRNA *array* study. As a result of our study we determined that in cell lines with 1p deletion show a statistically significant increase in contrast to cell lines without 1p deletion of 33 miRNA. We showed that from among these miRNA's miR-410, miR-543, miR-495 and miR-494 target at least 3 genes. We confirmed the expression increases of miR-543, miR-495 and miR-494, from the selected miRNAs, with a real time PCR study. In conclusion: we believe that the 1p deletion that is frequently observed in neuroblastoma will shed light on the reason for the appearance of neuroblastoma for which the carcinogenesis process is unknown.

Key Words: *Neuroblastoma; 1p deletion; microRNA; 14q32 locus*

1.GİRİŞ ve AMAC

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nöroblastom (NB), nöral krestten köken alıp adrenal medulla ve sempatik sinir sistemine hedeflenen nöroektodermal hücrelerin embriyonel bir tümörü olup, çocukluk çağı kanser ölümlerinin yaklaşık %15'inden sorumludur. Tümör sempatik sinir sisteminin herhangi bir aşmasında gelişebildiği gibi, olguların %65'nde abdomende gözlenir. Bunun yanı sıra daha az sıklıkla boyun ve göğüs bölgesinde de tümör yerleşim gösterebilmektedir. Nöral tüpün dorsalinden ayrılan nöral krest hücreleri, göç ettikleri bölgelerde periferik sinir sisteminden, *Schwann* hücreleri, melanosit ve yüze ait iskelet hücrelerine kadar farklı hücre tiplerine farklılaşabilen *multipotent* hücrelerdir. Nöral krest hücrelerinin indüklenmesinden, farklılaşma aşamasına kadar olan süreçte rol alan genlerin birlikte hiyerarşik etkileşimi nöral krest gen düzenleyici ağı (NC-GRN) olarak tanımlanmaktadır. Nöral krest hücrelerinden başlayarak sempatik nöronların öncelikle adrenerjik ve sonrasında kolinerjik özellikler kazanmasıyla son bulan farklılaşma sürecindeki sapmalar nöroblastomun farklı fenotiplerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Tümör dokusundaki nöronal farklılaşmanın derecesiyle, hastalığın klinik özellikleri çok yakından ilişkilidir. *Undiferansiye* (farklılaşmamış) nöroblastomlar en saldırgan tümör özelliği sergilerlerken, ileri düzeyde *diferansiye* (farklılaşmış) tümörler ise hastalığın çok daha iyi klinik özelliklerine sahiptir. Bu farklılaşma sürecinde rol alan başlıca genler: kemik morfojenik proteinler (*BMP2-BMP4*), kemik morfojenik protein reseptörleri (*BMPRIA, BMPR1B, BMPR2*), *PHOX2A, PHOX2B*, tirozin kinaz reseptörü A/B (*TRKA-TRKB*) ve ligandları olan; sinir büyüme faktörü (*NGF*), glia hücre kökenli nörotrofik faktör (*GDNF*), nörotrofin-3 (*NT-3*), nörotrofin-4/5 (*NT-5*), *MTSS1, DPYSL3, NRCAM, GATA3* ve kofaktörü olan *ZFPM2*'dir.

Nöroblastom tümörlerinde diğer kanserlerde gözlenen onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonlarına rastlanmamasına karşın, karyotipik değişikliklerden kaynaklanan genomik dengesizlikler ve ploidi sapmaları nöroblastom genetiğinin tipik özellikleridir. Nöroblastom tümör hücrelerinde tutarlı bir şekilde değişikliğe uğradığı bilinen tek onkogen *MYCN* genidir. Yapılan sekans analizi çalışmalarında, *MYCN* geninin kodlayan sekanslarında

mutasyon saptanmamıştır. *MYCN* geninde meydana gelen genetik değişiklik, kopya sayısı artışı şeklinde olmaktadır ve NB hastalarının yaklaşık % 20-25'inde gözlenen *MYCN* geni yüksek kopya sayısı artışı (amplifikasyon), ileri hastalık evresi, hızlı tümör progresyonu ve kötü prognozla birliktelik göstermektedir. *MYCN* amplifikasyonu dışında, nöroblastom prognozunda etkili olduğu düşünülen diğer kromozomal aberasyonlar; 1 no'lu kromozomun kısa kolunun (1p) kaybı, 17 no'lu kromozomun uzun kolunun (17q) kazanımı, kromozom 14q kaybı ve kromozom 11q'nun kaybıdır. Nöroblastom'da sıklıkla delesyona uğrayan bölgelerde yer alan aday genler üzerinde yapılan çalışmalarda da *Knudson*'ın çift vuruş (*double hit*) hipoteziyle uyumlu bir gen tanımlanamamıştır.

MYCN geni dışında, son zamanlarda ortaya atılan kanıtlar iki yeni aday genin, *ALK* (Anaplastik Lenfoma Kinaz) ve *PHOX2B* genlerinin NB gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir. Çalışmalarda ailesel ve sporadik nöroblastom olgularında *ALK* geninin germinal ve somatik mutasyonları saptanmış ve *ALK* gen mutasyonlarının *MYCN* geni amplifikasyonu ile birliktelik gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca *ALK* kopya sayısındaki değişimlerinde saldırgan klinik fenotiple ve nöroblastomun mortalitesi ile yüksek derecede ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinin son aşamalarında görev alan genlerde meydana gelen mutasyonların, Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu (CCHS) ve Hirschsprung sendromu (HSCR) gibi konjenital hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir. Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu olguları üzerinde yapılan çalışmalarda *paired-like homeobox 2B (PHOX2B)* geninde mutasyonların saptanması ve bazı CCHS hastalarında nöroblastom gözlenmesi, *PHOX2B*'nin nöroblastom patogenezinde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda ailesel nöroblastom olgularının yaklaşık %6'sında, *PHOX2B*'nin *germline* mutasyonları tanımlanmış ve ailesel nöroblastom olguları için ilk aday gen olarak öne sürülmüştür. Aynı zamanda, *PHOX2B*'nin çeşitli çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları çok nadir olarak (~%2) sporadik nöroblastom olgularında gözlenmesine karşın, *PHOX2B*'nin nöroblastomun onkogenез sürecinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, NB patogenezinde rol oynadığı bilinen *MYCN* ve bu süreçte etkili olabilecekleri düşünülen *ALK* ve *PHOX2B* genleri dışında, hastalığın prognozu ile ilgili herhangi bir gen tanımlanamamıştır. Bu durum NB'un karsinogenез sürecinde epigenetik mekanizmaların etkili olabileceğini düşündürmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Nöroblastomda delesyona uğrayan bölgelerde, çift vuruş (*double hit*) hipoteziyle uyumlu bir genin tanımlanamaması ve nöroblastom genetiğinde sıklıkla yapısal ve sayısal kromozomal aberasyonların gözlenmesine rağmen, gen mutasyonlarının çok nadir olarak görülmesi; son zamanlarda epigenetik değişimlerin özellikle tümör baskılayıcı genler üzerindeki etkisinin araştırılmasına neden olmuştur. Epigenetik mekanizmalar ile genlerin susturulması; temel olarak Transkripsiyonel ve post- transkripsiyonel mekanizmalar olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Transkripsiyonel mekanizmalar, Histon proteinlerinin modifikasyonları ve DNA metilasyonu (hipermetilasyon ya da hipometilasyon) ile gerçekleşebilirken, post-transkripsiyonel mekanizmalar RNA interferans aracılığıyla gerçekleşir. RNA interferans yöntemi ile genlerin susturulmasında rol alan temel elemanlardan birisi de mikroRNA'lardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, nöroblastomda etkisi olabilecekleri düşünülen; *CASP8*, *RASSF1A*, *CD44*, *TSP-1*, *PTGER2* gibi genlerin promotör sekanslarının hipermetile olarak susturulduğu bulunmuştur. Bu durumun aksine, nöroblastom örneklerinde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinde rol oynayan genlerde herhangi bir mutasyonun (*PHOX 2B* hariç) ve transkripsiyonel epigenetik bir değişimin saptanmaması, bu genlerin, post-transkripsiyonel epigenetik mekanizmalarla susturulabileceğini düşündürmektedir.

Biz çalışmamızı üç amaç çerçevesinde gerçekleştirdik. Bunlar;

- Nöroblastom hücre hatlarının (CHP-126, IMR-32, KELLY, MHH-NB-11, SH-SY5Y, SIMA) MLPA yöntemiyle kromozomal aberasyonlarını saptamak,
- MLPA sonuçlarına göre, nöroblastomun prognozunda etkili olduğu düşünülen, 11q veya 1p delesyonuna sahip olan hücre hatları ile delesyonun gözlenmediği hücre hatları arasındaki miRNA ekspresyon profillerini belirlemek,
- Nöral krest hücrelerinin farklılaşma yolağında rol alan genlerin, istatistiksel olarak ekspresyon değişikliği gözlenen miRNA'ların hedefi olup olmadıklarını belirlemek.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Hipotez 1: 1p ve 11q delesyonlarının nöroblastom'un prognozunu etkilediği birçok çalışma ile göstermekle birlikte, *MYCN* amplifikasyonu sıklıkla birliktelik gösteren 1p veya *MYCN* amplifikasyonu sıklıkla birliktelik göstermeyen 11q delesyonuna sahip hücre hatları ile delesyonun gözlenmediği hücre hatları arasında miRNA ekspresyon profilleri farklı olabilir.

Hipotez 2: Nöroblastom'un genetik yapısında çok sınırlı sayıda gende mutasyon gözlenmektedir. Bu nedenle patolojik süreçte rol oynayabilecek bazı önemli genler miRNA'lar aracılığı ile epigenetik olarak susturulmuş olabilir.

Hipotez 3: 1p delesyonunun nöroblastomun farklılaşma süreci ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bununla birlikte, nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinde rol alan genler üzerinde günümüze kadar yapılan çalışmalarda (*PHOX2B* geni hariç) mutasyon ve epigenetik olarak metilasyon saptanmamıştır. Bu nedenle farklılaşma sürecinde rol alan genler miRNA'ların hedefi olabilir.

2.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroblastom'un Tarihçesi ve Epidemiyolojisi

Malign bir çocukluk çağı hastalığı olarak nöroblastomun tarihi Alman patolog R.L.K Virchow' un 1864 yılında yayınlamış olduğu "Beyin epifizi ve böbrek üstü bezlerinin hiperplazisi" isimli makalesine dayanmaktadır. Virchow makalesinde adrenal medullada meydana gelen, böbrek üstü bezlerindeki nodüllere dikkat çekmiş, adrenal medullanın olağan bileşenlerinin dışında, bazı durumlarda yüksek miktarda sempatik hücrelerin bulunmasını tanımlamak üzere çalışmalarda bulunmuştur. "Nöroblastom" terimini ilk olarak 1910 yılında kullanan J.H. Wright, embriyo oluşumu sırasında primitif sinir hücrelerinin göç etmesiyle, vücudun değişik bölgelerinde tümöral bir oluşumun meydana gelebileceğine dair çalışmalarda bulundu [1].

Pediyatrik kanserlerde en sık görülen kanser türleri lösemi (%30-35) ve merkezi sinir sistemi tümörleri (%30) olup, diğer kanser türlerinin büyük çoğunluğu ise lenfomalar, sarkomlar ve nöroblastom gibi embriyonal tümörler grubundandır [2]. Nöroblastom, merkezi sinir sistemi tümörlerinden sonra en yaygın ikinci solid tümördür ve 15 yaş altındaki tanı almış tüm çocukluk çağı kanserlerin %7.2 sinden sorumludur. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nün hazırlamış olduğu rapora göre, nöroblastomun yıllık insidansı 15 yaş altındaki çocuklar için milyonda 10.2 olarak hesaplanmıştır. Erkekler için bu oran milyonda 10.3 iken kızlarda 10.1'dir. Yaşa göre gruplama yapıldığında insidans oranları; 0-4 yaş için milyonda 19.6, 5-9 yaş için 2.9 ve 10-14 yaş için 0.7 olarak bulunmuştur [3]. Türkiye'deki 2002-2005 pediyatrik tümör kayıtlarına göre, 1435 çocukluk çağı tümörlerinin % 10.6 'sının sempatik sinir sistemi kökenli olduğu saptanmıştır [4].

2.2. Nöroblastom'un Biyolojik Özellikleri

Nöroblastom (NB), nöral krestten köken alıp adrenal medulla ve sempatik sinir sistemine hedeflenen ve sıklıkla (%99) sporadik olarak ortaya çıkan nöroektodermal hücrelerin oluşturduğu embriyonel bir tümördür. Tümör sempatik sinir sisteminin herhangi bir yerinde gelişebildiği gibi, çoğunlukla %65'i abdomende gözlenir, bu oranın büyük bir bölümünü ise adrenal medulla oluşturur. Diğer yaygın bölgeler ise boyun ve göğüştür [5-7]. Nöroblastom klinik ve biyolojik özellikler bakımından oldukça heterojen bir yapıya sahip olan gizemli bir tümördür. Metastatik özellik kazanmamış, bölgesel olan tümörler sıklıkla asemptomatik özelliklere sahip olup, herhangi bir tedavi süreci gerektirmeksizin benign

histolojik davranış sergileyerek kendiliğinden gerileyebilir yada farklılaşabilir. Diğer yandan özellikle 18 aydan büyük çocuklardaki metastatik nöroblastom olguları ise tüm tedavi çabalarına rağmen şiddetli sistemik bir hastalığa neden olarak agresif özellikler gösterebilmektedir [8-12]. Spontan regresyon özelliği diğer kanser türlerine göre nöroblastomda çok daha sıklıkla görülmesine rağmen bunun nedeni günümüzde anlaşılmış değildir [13]. Histolojik olarak farklılaşmış nöroblastik tümörlerde Schwann hücresi stroması yaygın olarak gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda Schwann hücrelerinin nöronal hücrelerin diferansiyasyonunu indüklediği ve proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [14]. Ancak, stromal bileşenin kaynağı ve stroma varlığının bir sonuç mu yoksa neden mi olduğu henüz bilinmemektedir [15].

2.3. Nöroblastom'un Genetik Özellikleri

Nöroblastom, biolojik özelliklerinde olduğu gibi genetik açıdan da son derece kompleks bir yapıya sahiptir. Segmental kromozom aberasyonları, *MYCN* geni amplifikasyonu ve sayısal kromozomal değişiklikleri gibi bazıları hastalığın prognozunu ve tümör biyolojisini etkileyen somatik genetik değişiklikler içermektedir [16,17]. Yapılan çalışmalarda nöroblastom da saptanan ilk kromozomal aberasyon 1p delesyonudur, 1p delesyonu gösteren olgular üzerinde daha sonra yapılan dizin çalışmalarında 1p36 bandının delesyona uğrayan en küçük ortak bölge olduğu saptanmıştır [18-20]. Riley ve arkadaşlarının nöroblastomda prognostik faktörleri saptamak için yaptıkları literatür çalışması sonucunda 31 prognostik faktör rapor etmişleridir. Prognostik faktörlerden altısı genetik aberasyonlardan oluşmaktadır. Bunlar ploidy, *MYCN* geninin amplifikasyonu, 1 no'lu kromozomun kısa kolunun (1p) kaybı, 17 no'lu kromozomun uzun kolunun (17q) kazanımı, kromozom 14q kaybı ve kromozom 11q'nun kaybıdır [21].

2.3.1. DNA ploidi:

Nöroblastom DNA içeriği açısından, *near-diploidi* (%45) ve *near triploid-hiperdiploid* (%55) olarak ikiye ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *near triploid* tümör hücrelerinin mitoz defektlerine sahip olduğu ve yapısal genetik aberasyonlar olmaksızın tam bir kromozom kazanımı veya kaybı ile karakterize olduğu ve hastalarının uzun dönem yaşam ile ilişkili olduğu gösterilmiş iken, *near-diploidi* tümörlerin *MYCN* amplifikasyonu gibi daha çok yapısal kromozom anomalileriyle karakterize olan genomik kararsızlığa sahip olduğu ve hastalarının yaşam süresinin kısa olduğu tanımlanmıştır [22-24].

2.3.2.1p allelik kaybı:

1p delesyonları yalnızca NB tümörlerinde değil, aynı zamanda hematolojik maliniteler ve solid tümörler de dahil çok sayıda neoplastik hücrelerde gözlenmektedir [22]. 1p delesyonu tüm nöroblastom olgularının yaklaşık %35'inde görülmektedir [25,26]. Nöroblastomda 1p delesyonunun bağımsız prognostik faktör olarak önemi konusunda çalışmalar tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda 1p kaybının sağkalım üzerindeki olumsuz etkisinin *MYCN* amplifikasyonu gözlenen tümörlerle sınırlı olduğu saptanmıştır [22,25-27]. Diğer yandan başka çalışmalarda, 1p delesyonunun bağımsız olarak düşük sağ kalımla ilişkili olduğu ve *MYCN* amplifikasyonu olmaksızın 1p delesyonunun varlığı gösterilmiştir [28-29]. Yapılan bir diğer çalışmada *intakt* kromozom 1p'nin, 1p delesyonuna sahip nöroblastom hücre hattına transfer edildiğinde hücresel diferansiyasyonun ve apoptozun indüklendiği gösterilmiş ve nöroblast diferansiyasyonunun kromozom 1p ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür [30].

2.3.3.MYCN Geni amplifikasyonu:

MYCN onkogeni amplifikasyonu nöroblastom tümörlerinin yaklaşık %20-25'inde gözlenen bir özelliktir. Bu anomalinin hastalığın ilerlemiş evresiyle birliktelik gösterdiği bilinmektedir [31,32]. *MYCN* amplifikasyonu evre 3 ve 4 tümörlerinde %30-40 oranında bulunurken daha düşük evrelerdeki (evre 1, evre 2 ve evre 4S) tümörlerde %4-8 oranında meydana gelmektedir [22,27]. *MYCN* amplifikasyonunun neden agresif tümör biyolojisi ile ilişkili olduğu tam olarak bilinmemesine rağmen, normalde çok sınırlı olarak embriyonik gelişim sırasında eksprese olan *MYCN* geninin, transgenik farelerde yapılan çalışmalarda aşırı eksprese olmasıyla nöroblastomun geliştiği saptanmıştır [33,34]. Bu durumun, amplifikasyona bağlı olarak meydana gelen ve bir transkripsiyon faktörü olan N-myc proteinindeki artışın hücre proliferasyonu ve büyümesini sağlayan genlerin ekspresyonundaki artışa neden olmasıyla meydana geldiği gösterilmiştir[35].

2.3.4.11q allelik kaybı ve 17q kazanımı:

Nöroblastom olgularının % 60'dan daha fazlasında 17. kromozomun tamamının veya 17q kolunun kısmi bir parçasının kazanımı gözlenirken, kromozom 11q kaybı olguların yaklaşık %40'ında gösterilmiştir. 11. kromozomun tamamının kaybı düşük evreli tümörlerde görülürken, dengesiz 11q kaybı sıklıkla *MYCN* amplifikasyonu olmayan ileri evre tümörlerde gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda 11q delesyonu ile olumsuz klinik parametreler arasında güçlü bir ilişki bulunmuş ve kromozom 11q kaybı *MYCN* amplifikasyonu ile ters yönde korelasyon gösterdiği vurgulanmıştır [22,36-40]. Buna ilaveten, 11q kaybının, 7q ve 3p kazanımı ve 4p kaybı ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 17q kazanımı, 11q olgularında sıklıkla t(11q;17q) dengesiz translokasyonuna neden olurken, *MYCN* amplifiye olgularda ise t(1p;17q) dengesiz translokasyonuna neden olmaktadır [41-42]. Diğer yandan, 17q kazanımı daha çok ileri evre tümörlerle ve *MYCN* amplifikasyonu ile ilişkili iken, 17. kromozomun tamamının kazanımı ise daha çok düşük evre tümörlerle ilişkilidir [41].

Nöroblastom yukarıda belirtilen kromozomal değişimlerin yanı sıra, 3p,4p,9p ve 14q delesyonu ve 1q, 7q ve 12p kazanımı gibi birçok yapısal kromozom anomalileri de içerebilmektedir. Bu değişimlerin hastalığın klinik davranışı ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur [43-47]. Son zamanlarda geniş ölçekli genom çalışmaları (MLPA, SNP-dizin ve dizin-CGH gibi) ile yapılan tümör analizlerinde, nöroblastomda tanımlı olan genetik aberasyonların hastalığın prognozunda soliter olarak değerlendirilmesinden ziyade, birlikteliklerinin göz önüne alınmasıyla ve klinik parametreler ile ilişkisi dikkate alınarak yeniden risk gruplamaları yapılmaya başlanmıştır [48-50].

2.3.5. Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) ve paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gen Mutasyonları:

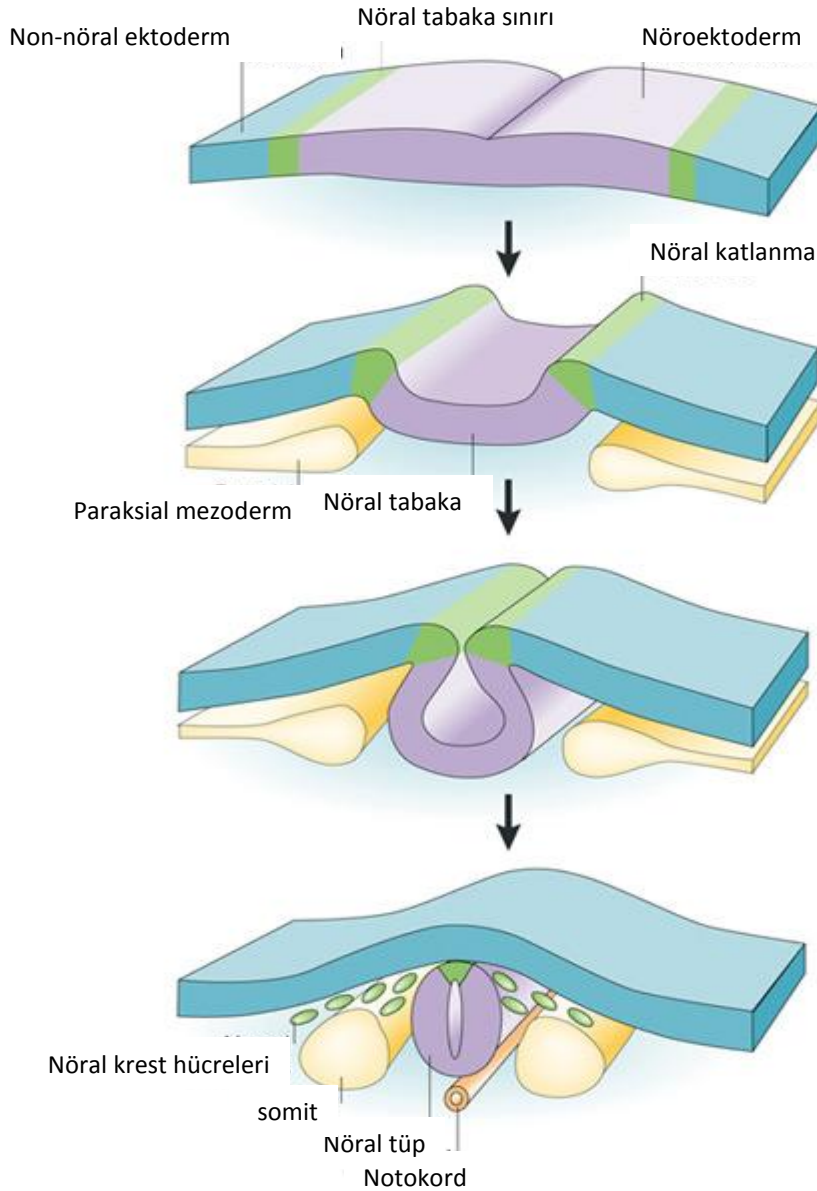
Nöroblastomda yapısal ve sayısal kromozomal değişimler sıklıkla gözlenmesine rağmen, gen mutasyonları çok nadir olarak görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ailesel ve sporadik nöroblastom olgularında *ALK* geninin germline ve somatik mutasyonları saptanmış ve *ALK* gen mutasyonlarının *MYCN* gen amplifikasyonu ile birliktelik gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca *ALK* kopya sayısındaki değişimlerinde agresif klinik fenotiple ve nöroblastomun mortalitesi ile yüksek derecede ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Nöroblastom hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda da RNA interferans yöntemiyle, *ALK* 'nın kısmi susturulmasının, mutant *ALK* açısından pozitif olan nöroblastom

hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum *ALK*'nin tirozin-kinaz bölgesinin potansiyel bir terapötik hedef olabileceği öngörüsünü ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla NVP-TAE684, PF-02341066 gibi ALK inhibitörleri geliştirilmiş ve erken faz denemeleri klinik öncesi modellerde çalışılmaktadır [36,51-57]. Nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinin son aşamalarında görev alan genlerde meydana gelen mutasyonların, Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu (CCHS) ve *Hirschsprung* sendromu (HSCR) gibi konjenital hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir. Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu olan olgular üzerinde yapılan çalışmalarda *paired-like homeobox 2B (PHOX2B)* geninde mutasyonların saptanması ve bazı CCHS hastalarında nöroblastom gözlenmesi, *PHOX2B*'nin nöroblastom patogenezinde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda ailesel nöroblastom olgularının yaklaşık %6'sında, *PHOX2B*'nin germline mutasyonları tanımlanmış ve ailesel nöroblastom olguları için ilk aday gen olarak öne sürülmüştür. Aynı zamanda, *PHOX2B*'nin çeşitli çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları çok nadir olarak (%2.3) sporadik nöroblastom olgularında gözlenmesine karşın, *PHOX2B*'nin nöroblastomun onkogenез sürecinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür [58-62].

2.4. Nöral Krest Gelişimi ve Nöroblastom

Nöroblastom, embriyonel gelişim sırasında sempatik sinir sistemi ve adrenal medullada bulunan kromaffin hücrelerine farklılaşacak olan nöral krest hücrelerinin farklılaşmasının engellenmesi sonucunda oluşan embriyonel bir tümördür [63,64]. Nöral tüpün dorsalinden ayrılan nöral krest hücreleri, göç ettikleri bölgelerde periferik sinir sisteminden, *schwann* hücreleri, melanosit ve yüze ait iskelet hücrelerine kadar farklı hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent hücrelerdir. Nöral krest hücrelerinin indüklenmesinden farklılaşma aşamasına kadar olan süreçte rol alan genlerin birlikte hiyerarşik bir etkileşimi nöral krest gen düzenleyici ağı (NC -GRN) olarak tanımlanmaktadır [65]. Embriyonik gelişim sırasında nöral krest hücrelerinin nihai karakteristik özelliklerini kazanması gastrulasyon evresinde meydana gelmektedir. Bu evrede nöral krest hücrelerini oluşturacak olan nöral tabaka sınırı, kenarlardan nöro-ektoderm ve non-nöral ektoderm, alttan ise *Paraxial* mesoderm ile kuşatılmıştır. Nöral tabaka sınırında non-nöral ektoderm ve mezodermden sentezlenen FGF ve WNT ailesi sinyal molekülleri, nöral tabaka sınırındaki hücrelerin nöral krest öncüllerine farklılaşmasını indükler. Bu süreç nöral tabaka sınırındaki hücrelerin *Msx1*,

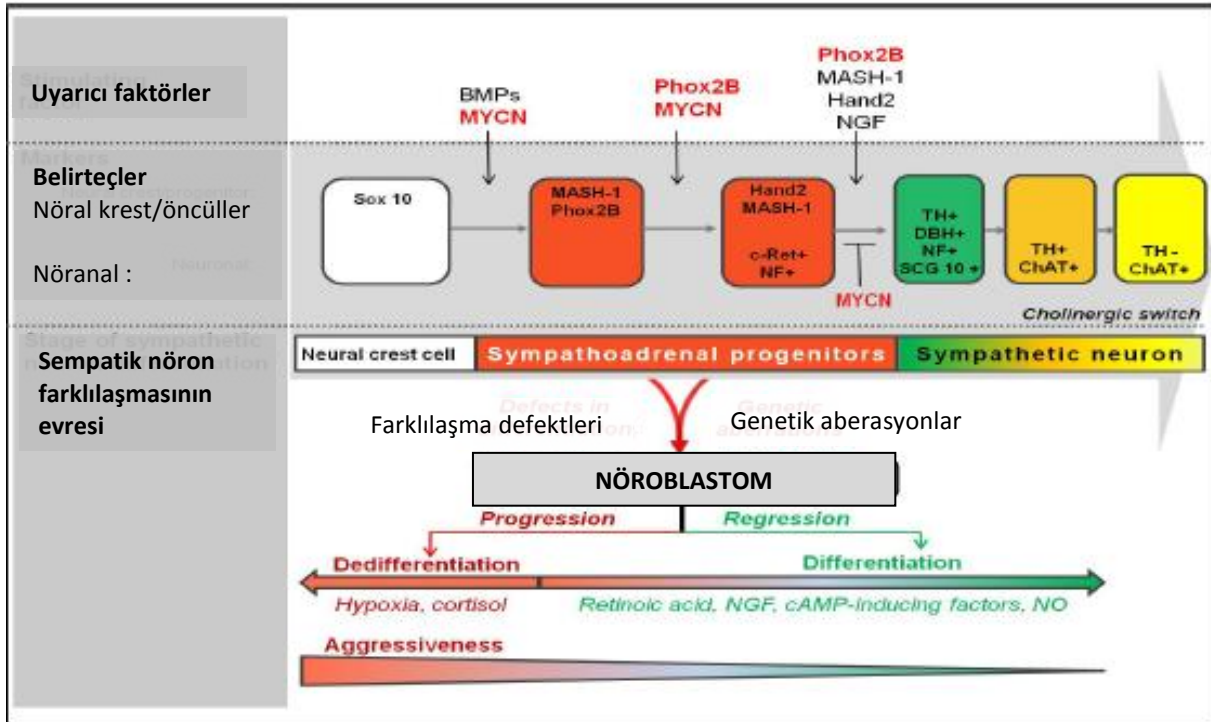
Msx2, *Pax3*, *Pax7*, *Zic1* transkripsiyon faktörlerinin sentezine neden olarak, nöral krest hücrelerinin dorsale doğru göç ederek nöral tüpü oluşturmaya neden olur. Bu transkripsiyon faktörlerinin ifade edilmesi aynı zamanda nöral krest belirteçleri olarak da bilinen *Sox9*, *Sox10*, *Snail*, *Snai2* ve *FoxD3* genlerinin transkripsiyonuna neden olur. Bu genler temel olarak nöral krest hücrelerinin göç etmesinden sorumludur (şekil-1). Sonuç olarak göç eden nöral krest hücreleri sempatik ganglia ve adrenal bezlere yerleşerek sempatik nöronlara ve nöronal özelliklerini kaybederek tirozin hidroksilaz ve dopamin beta-hidroksilaz sentezinden sorumlu adrenal kromaffin hücrelerine farklılaşır [66-71].



Şekil -1: Nöral krest hücrelerinin oluşumu ve göç etmesi [68].

2.5. Sempatik Nöronların Farklılaşması ve Nöroblastom Gelişimi

Sempatik sinir sistemi, ganglia’da organize olmuş sempatik nöronlar ve böbrek üstü bezlerinde oluşan nöroendokrin kromaffin hücrelerinden oluşur. Bu sempatonöral fenotipin gelişmesi, Phox2B, MASH-1, GATA3, Hand2 ve MYCN gibi çoklu transkripsiyon faktörlerinin indüklemesi yoluyla meydana gelmektedir. Bu süreç esnasında henüz olgunlaşmasını tamamlamamış sempatik nöronlar, ligandı sinir büyüme faktörü olan (NGF)’ye bağlı olarak TrkA reseptörünün ekspresyonunu başlatarak hayatta kalmalarını sağlarlar. Ve olgunlaşmış sempatik nöronlar sinir uçlarından nörotransmitter-nöroepinefrin (katekolamin) maddelerin salınımı ve sentezini gerçekleştirecek şekilde adrenerjik bir özellik kazanırlar. Bu süreçte karakteristik sempatik belirteçler olarak bilinen tirozin hidroksilaz (TH) ve dopamin β -hidroksilaz(DBH) enzimleri önemli roller üstlenirler. Bu farklılaşma sürecinin son aşamalarında adrenerjik özelliğe sahip nöronlar asetilkolin senteziyle ilgili bir enzim olan kolin asetiltransferazın (ChAT), ekspresyonuyla asetil kolin’in hem sentezlenmesi hem de salınması yetisine sahip olarak kolinerjik özellik kazanırlar. Sempatik nöronların tüm bu farklılaşma sürecindeki sapmalar nöroblastomun farklı fenotiplerinin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir (şekil-2). Çalışmalar Nöroblastomun gelişmesi için, normal sempatik diferansiyasyon regülasyonunun bozulmuş olmasının zorunlu olduğunu göstermiştir [72].



Şekil-2: Sempatik nöronların farklılaşması ve nöroblastomun gelişimi [64].

Tümör dokusundaki nöronal farklılaşmanın derecesi, hastalığın klinik özellikleri ile yakından ilişkilidir. *Undiferansiye* nöroblastomlar en agresif tümör özelliği sergilerler, bu tümörlerde olgunlaşmış nöronların morfolojik özellikleri ve katekolaminlerin sentezinde görevli enzimler olan Tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz'ın ekspresyonları gözlenmez ve dolayısıyla adrenerjik özelliklere sahip değildirler. Bunun aksine kötü diferansiye nöroblastomlar, bazı nöronal morfolojik özelliklere ve TH ve DBH ekspresyonlarını sahip olup adrenerjik karakterizasyonuna sahiptirler. En az *malign* klinik özelliklere sahip *diferansiye* tümörler ise, adrenerjik özelliklerin ortadan kalkması/azalması ve kolinerjik fenotipin artmış olması ile karakterizedir [72].

2.6. Sempatik Nöronların Farklılaşma Sürecinde Rol Alan Genler

Nöral krest hücrelerinin göç etmesini ve farklılaşmasını başlatan ilk sinyal molekülleri kemik morfojenik proteinler (BMP2-BMP4) ve onların reseptörleridir (BMPR1A, BMPR1B, BMPR2). BMP'ler nöroblastomun farklılaşmasını indükleyen retinoik asidin direkt bir transkripsiyonel hedefidir. Nöroblastom olgularında ekspresyon artışı gözlenen DAN domain ailesi üyeleri, BMP nin inhibitörleridir. Sempatik nöronların terminal farklılaşma sürecine neden olan nörogenik programın regülasyonun da bazı helix-loop-helix transkripsiyon faktörleri (ASCL1, Phox2A, Phox2B) önemli rol üstlenirler. Ayrıca *BMP2* ve *BMP4*'ün *ASCL1* ve *PHOX2B* genlerinin ekspresyonu için gerekli olduğu saptanmıştır. *PHOX2A* ve *PHOX2B* genleri, spesifik olarak adrenerjik özelliklere sahip nöronlarda eksprese olarak tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz genlerini aktive ettikleri rapor edilmiştir [64,73-75].

Nöroblastom hücrelerinin farklılaşmasında en iyi karakterize edilen faktörler arasında, tirozin kinaz reseptörü (*TRK*) ve onun ligandları olan; sinir büyüme faktörü (*NGF*), nörotrofin-3 (*NT-3*) ve nörotrofin-4/5 (*NT-5*) olduğu belirtilmiştir. Nöroblastom olgularında *TRKA* ve *TRKC*' nin ekspresyon eksikliğinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Nöroblastom hücre hatlarının da genellikle TRK gen ailesinin nörotrofin reseptörlerinin fonksiyonel olmadığı ve NGF, NT-3 ve NT-5 gibi nörotrofinlerle uyarıldığı zaman farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlenmiştir. Farklılaşma sürecinde glial-hücre hattı- kökenli nörotrofik faktör'ün (*GDNF*) *RET* proto-onkogenini aktive etmesiyle nöroblastların diferansiyasyonuna neden olmaktadır. Buna ilaveten GDNF, kirpiksi nörotrofik faktör

(CNTF) ile birlikte *TRKA*'nın ekspresyonunu artırmada işlev görmektedir. *MYCN* onkogeni nöroblastomda hücre farklılaşmasını bloke eden en güçlü endojen olup, *TRKA* geninin ekspresyonunu baskılamaktadır. Farklılaşmanın bloke edilmesi, *MYCN*'in *TRKA* geninin promotör bölgesine histon deasetilaz 1 (HDAC1)'i toplaması yoluyla transkripsiyonu baskılayarak gerçekleştirmektedir. Buna ilaveten *MYCN*'in GDNF'nin sinyal mekanizmasını düşürdüğü gösterilmiştir.

Fyn non- reseptör kinase, nöroblastom hücre farklılaşmasında rol oynayan diğer önemli bir oyuncu olup, Fyn'nin yüksek ekspresyonu ve yüksek Fyn kinaz aktivitesinin sadece düşük evre nöroblastom olguları ile sınırlıdır. Doku transglutaminaz geninde nöroblastom ve lösemi hücre farklılaşmasında gerekli olduğu gösterilmiş olup, bu genin baskılanması N-Myc indüklenmiş nöroblastom hücre farklılaşmasının baskılanması için gerekli olduğu gösterilmiştir [76]. Buna ilaveten Vermeulen ve arkadaşlarının, yaklaşık 700 NB hastasının *mikro-dizin* gen ekspresyonu verisini içeren yedi farklı yayınlanmış çalışma üzerinde yaptıkları analizde, *PTN*, *NRCAM*, *DPYSL3*, *MTSS1*, *DDC*, *NTRK1* ve *MAPT* genlerinin nöronal farklılaşma ile ilişkili olduğu ve düşük evre tümörlerde, ileri evre tümörlere göre daha yüksek düzeyde eksprese olduklarını rapor etmişlerdir [77]. NB'un oluşum sürecinde etkisi olduğu düşünülen, nöral krest hücrelerinin farklılaşma yolağında rol alan genler üzerinde günümüze kadar yapılan çalışmalarda (PHOX2B geni hariç) mutasyon saptanmamakla birlikte, promotör bölgelerinde metilasyon gösterilmemiştir [60,78-82]. Nöral krest hücrelerinin sempatoadrenal sisteme farklılaşmasında rol alan genler Tablo-1'de verilmiştir.

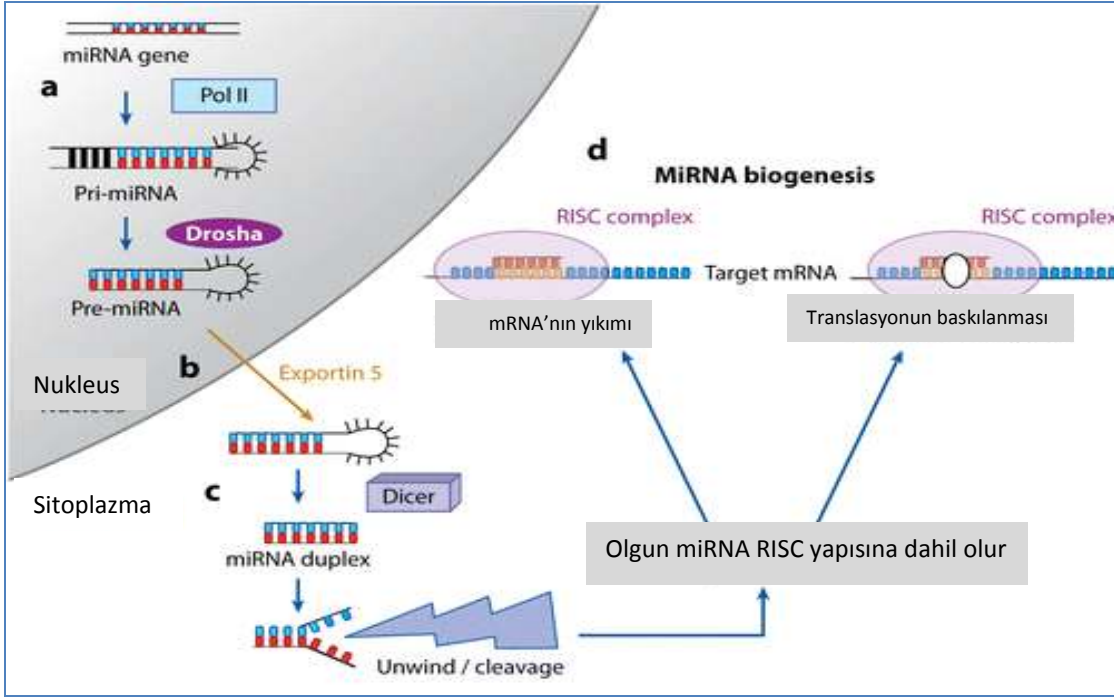
Tablo -1: Nöral Krest Hücrelerinin Farklılaşma Sürecinde Rol Alan Genler

Genin sembolü	Genin adı	Gene ID
<i>BMP2</i>	Bone morphogenetic protein 2	ENSG00000125845
<i>BMP4</i>	Bone morphogenetic protein 4	ENSG00000125378
<i>BMPRI1A</i>	Bone morphogenetic protein receptor, type IA	ENSG00000107779
<i>BMPRI1B</i>	Bone morphogenetic protein receptor, type IB	ENSG00000138696
<i>BMPRI2</i>	Bone morphogenetic protein receptor, type II	ENSG00000204217
<i>GNDF</i>	Glial cell derived neurotrophic factor	ENSG00000168621
<i>PHOX2A</i>	Paired-like homeobox 2a	ENSG00000165462
<i>PHOX2B</i>	Paired-like homeobox 2b	ENSG00000109132
<i>TRKA/NTRK1</i>	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	ENSG00000198400
<i>TRKC/NTRK3</i>	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	ENSG00000140538
<i>NT3/NTF3</i>	Neurotrophin 3	ENSG00000185652
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	ENSG00000107485
<i>ZFPM2/FOG2</i>	Zinc finger protein, multitype 2	ENSG00000169946
<i>NGF</i>	Nerve growth factor	ENSG00000134259
<i>RARA</i>	Alpha retinoic acid receptor,	ENSG00000131759
<i>PTN</i>	Pleiotrophin	ENSG00000105894
<i>NRCAM</i>	Neuronal cell adhesion molecule	ENSG00000091129
<i>DPYSL3</i>	Dihydropyrimidinase-like 3	ENSG00000113657
<i>MTSS1</i>	Metastasis suppressor 1	ENSG00000170873
<i>DDC</i>	Dopa decarboxylase	ENSG00000132437
<i>MAPT</i>	Microtubule-associated protein tau	ENSG00000257437

2.7.MikroRNA'lar (miRNA) ve Genel Özellikleri

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve gen ifadesini transkripsiyon sonrası negatif olarak regüle eden kısa RNA'lardır. İlk defa *C.elegans*'ın gelişimini çalışan Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında tanımlanmıştır. İlk tanımlanan miRNA, lin-4' dür [83-86]. Hali hazırda *miRBase release* 18 veri tabanında kayıtlı 1.921 olgun insan miRNA sekansı tanımlanmıştır. Mikro RNA'lar gen ifadesinin post-transkripsiyonel olarak düzenlemesinin yanı sıra, organizmanın gelişimsel sürecinde, farklılaşma, apoptoz, hücre proliferasyonu ve kanser gibi birçok geniş biyolojik süreçlerde rol oynayabilmektedirler [87-89].

mikro RNA ların biyolojik oluşum süreci, hücre çekirdeğinde başlayıp sitoplazmada son bulan bir dizi işlemler sonucunda meydana gelmektedir [90]. Çoğu miRNA RNA polimeraz II tarafından yaklaşık 1kb uzunluğunda pri-mirna olarak transkribe olur. Oluşan bu pri-mirna'lar mRNA 'lara benzer şekilde 5' uçlarında 7metil guanozin ve 3' uçlarında ise poli adenozin taşır. Pri miRNA daki *hairpin* yapısı Rnaz 3 enzimi olan *Drosha* tarafından tanınır ve kesilir. Sonuçta 70 nükleotit uzunluğunda olan premiRNA oluşur. Bu yapı nükleer transport kompleksi olan eksportin- 5 ve RAN GTP aracılığıyla nükleus porlarından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya gelen pre miRNA bir başka Rnaz 3 enzimi olan *Dicer* tarafından yaklaşık 22 nükleotitlik çift iplikli miRNA lara kesilir, termodinamik özelliklere göre çift iplikten biri seçilerek *Argonaute* (Ago) proteini ile birlikte RISC kompleksinde (**RNA-Induced Silencing Complex**) dahil olmasıyla komplementer mRNA'nın 3'UTR bölgesi üzerinden transkripsiyon sürecini inhibe ederler (Şekil-3)[91].



Şekil-3: miRNA oluşumu ve etki mekanizması

Olgun mikro RNA 'lar, hedef mRNA 'lara 5' uçlarında bulunan 2 ve 7. nükleotitler arasındaki altı nükleotitlik komplementer sekansları aracılığı ile bağlanırlar. Bu bölgeye *seed* adı verilir. Hedef mRNA 'yı baskılamak için *seed* bölgesindeki komplementer sekansın yeterli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Altı nükleotitten oluşan *seed* bölgesinin, mRNA ile komplementer olma durumuna göre 4 farklı tipi bulunmaktadır (şekil-4).

- 6mer site: sadece *seed* bölgesindeki 6 nükleotitlik eşleşme ile karakterizedir
- 7mer-A1 site: *seed* bölgesinde nükleotit eşleşmesi ve miRNA'nın 1.nükleotitinin karşısında A nükleotitin olması,
- 7mer-m8 site: *seed* bölgesindeki nükleotit eşleşmesine ek olarak miRNA'nın 8. nükleotitinde de eşleşmenin olması,
- 8mer site: : *seed* bölgesindeki nükleotit eşleşmesi ile miRNA'nın 8. nükleotitinde de eşleşmenin olması ve miRNA'nın 1.nükleotitinin karşısında A nükleotitin olması ile karakterizedir [84,92].

olmaya adaydır. Bu hipotezi destekleyen ilk rapor, kronik lenfositik lösemi’de (KLL) sıklıkla delete olan 13q14 bölgesini çalışan Calin ve arkadaşlarından gelmiştir. KLL hastalarında genellikle yitime uğrayan bu bölgede mir-15a ve mir-16-1 adlı iki miRNA geninin yerleşim gösterdiği bulunmuştur. mir-15a ve mir-16-1 genlerinin öngörülen tümör baskılayıcı rolü, iki KLL hastasında bu genlerin germ hattı nokta mutasyonlarının bulunmasıyla desteklenmiştir [95]. Yapılan bir başka çalışma, miR-15/16 transkriptlerinin hedef genlerini tanımlayarak tümör baskılayıcı mekanizmayı aydınlatmıştır [96]. Her iki miRNA ürünü, anti-apoptotik bir gen olan *BCL2*’nin 3’UTR bölgesini hedeflemektedir. Yapılan diğer çalışmalar da miRNA’ların onkogen veya tümör baskılayıcı işlevleri olabileceğini göstermiştir. İlk tanımlanan onkojenik miRNA, mir-155 dir. miR-155’in ekspresyon düzeyinin lenfomalarda arttığı rapor edilmiştir [86,97,98]. İnsan miRNA’ların %50’den fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde ve kırılma noktalarına yakın bölgelerde lokalize olduğu gösterilmiştir [99]. Bununla birlikte, tüm insan genlerinin de yaklaşık %30-60’nın miRNA’lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir [100].

2.7.2.miRNA Genlerinin Nöroblastom ile İlişkisi

Son zamanlarda, *MYCN* geninin amplifikasyonu gözlenen ve gözlenmeyen primer tümör grupları üzerinde yapılan çalışmalarda her iki grupta farklı miRNA’ların eksprese olduğu ve *MYCN* geninin miRNA ekspresyonu için düzenleyici bir fonksiyon gördüğü tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, *MYCN* amplifiye tümörlerde 15 miRNA’nın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu miRNA’lar arasında onkojenik özellik gösteren mir-17-92 grubunun (miRNA-17, miRNA-18, miRNA-19, miRNA-20, miRNA-92) varlığı gösterilmiştir [101-103]. Diğer yandan araştırmacılar; tümör supresör olarak işlev gösteren p21’in miRNA-17’nin hedefi olduğunu göstermiş ve miRNA-17’nin inhibe edildiği durumlarda p21 ekspresyonunun arttığı, hücre proliferasyonunun ise azaldığını göstermiş olup, N-Myc’in mir-17-92 grubunun promotör bölgesine direkt olarak bağlandığını, *MYCN* ve mir-17-92 grup üyelerinin primer tümör ve hücre hatlarında ekspresyon artışlarının pozitif korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir [103-107]. Buna ilaveten, N-Myc’in onkojenik mir17-92 grubunun promotör bölgesine bağlanarak ekspresyonlarını artırması sonucunda mir-17 nin p21’i hedef almasının yanı sıra, mir17-92 grubunun tümörleşme sürecine katkı yapacak şekilde apoptotik süreçte rol oynayan genleri hedef aldıkları gösterilmiştir [108].

Yapılan bir başka çalışmada da N-Myc'in mir-9'u direkt olarak aktive ettiği ve mir-9'unda E-kaderin'i hedef aldığı ve bunun sonucunda nöroblastomda metastatik sürece katkı yaptığı gösterilmiştir [109].

Nöroblastomda, 1p veya 11q allelik kaybı agresif tümör özellikleri ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiş olup, yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda tümör baskılayıcı olarak önerilen mir-34a'nın kromozom 1p36.22 bölgesinde, mir34b/c'nin 11q23.1 bölgesinde lokalize olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda mir34 ailesinin p53 yolağı ile ilişkili olduğu ve mir 34a/bc'nin p53 ün direkt hedefi olduğu gösterilmiştir. mir34a'nın *Cdk 4*, *Cdk 6*, *Siklin E* gibi genleri hedef aldığı ve böylece mir34 ailesinin p53 aktivasyonu üzerinden apoptoza ve hücre siklusunun durdurulmasına katkıda bulundukları gösterilmiş olup, mir34a'nın *knock-down* edildiği durumlarda p53 indüklenmiş hücre ölümünün azaldığı saptanmıştır [110-114]. Bu veriyle ilişkili olarak aynı zamanda *MYCN*'nin, direkt olarak mir34a'nın hedefi olduğu gösterilmiştir [115]. Spesifik olarak miRNA genlerinin nöroblastom ile ilişkisinin gösterilmesine karşın, miRNA'ların oluşum sürecinde anahtar rollere sahip olan *Dicer* ve *Drosha* enzimleri üzerinde yapılan bir çalışmada, bu enzimlerin evre-4 nöroblastom olgularında, evre-4s nöroblastom olgularına göre daha düşük seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, miRNA genlerinin dışında, miRNA oluşum sürecindeki anahtar moleküllerinde tümör oluşumuyla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir [116].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma, mevcut bulunan altı nöroblastom hücre hattında kromozomal aberasyonları, miRNA ekspresyon profilleri ve miRNA'ların hedeflerini tanımlamaya yönelik deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında 2009- 2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma evrenini, KELLY (DSMZ no: ACC355), SIMA (DSMZ no: ACC164), CHP-126 (DSMZ no: ACC304), IMR-32 (DSMZ no: ACC165), MHH-NB-11 (DSMZ no: ACC157), SH-SY5Y DSMZ no: ACC209) nöroblastom hücre hatları oluşturmaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmada kullanılan nöroblastom hücre hatları, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2005.KB.SAG.077 sayı ile desteklenen Doç.Dr. Oğuz Altungöz'ün yürütücülüğünde gerçekleştirilen “Nöroblastom MYCN Amplifikasyonunda C-Myb Protein Kümesi ile Cdt1/Geminin, p53, Siklin A/Cdk2, P21 ve P27'nin Rolü” isimli çalışmadan sağlandı. Çalışmamızda, MLPA ve miRNA dizin çalışmaları için en küçük pasaj numaralı hücre hatları kullanıldı. miRNA dizin çalışması sonucunda istatistiksel olarak ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'ların, doğrulanması için yapılan Real Time PCR çalışmalarında ise farklı pasaj numaralı hücre hatları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

- MLPA çalışmaları sonucunda hücre hatlarında saptanan 1p ve 11q delesyonları,
- miRNA dizin çalışması sonucunda istatistiksel olarak ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'lar,
- Nöral-krest hücrelerinin farklılaşma sürecinde rol oynayan genler

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Hatlarını Çözme, Besleme ve Dondurma Protokolü

MLPA ve miRNA dizin çalışmaları için, KELLY (Pasaj 3) ve SIMA (Pasaj 3), IMR-32 (Pasaj 3), MHH-NB-11 (Pasaj 2), SH-SY5Y (Pasaj 4), CHP-126 (Pasaj 2) nöroblastom hücre hatları kullanıldı. Her bir hücre için hattı *data sheet* bilgileri doğrultusunda; % 10-20 FBS (Biochrom, S0613), % 1 L-glutamin (Biochrom, K0282) ve % 1 Penisillin-streptomisin (Biological Industries 03-031-1B) antikorlu içerecek şekilde RPMI 1640/DMEM (Biochrom, FG1235) ortamı kullanıldı. Deneyin uygulanabilmesi için ekilen hücrelerin flasksın % 75-80'ini kaplaması beklendi. Her bir hücre hattı, yapılan ilk pasaj uygulamasından sonra, DNA izolasyonu, RNA izolasyonu ve dondurulmak üzere üç flaska ayrıldı. Tüm hücreler %5'lik CO₂ düzeyine sahip 37 °C'deki inkübatörde (Sanyo, MCO-SAC 10060119) inkübe edildi.

a.Hücre Çözme

1. Su banyosu 37°C'ye ayarlandı
2. Bir behere 37°C'deki sudan alındı
3. -85°C'de bulunan hücrelerin 37°C su bulunan beherde çözülmesi sağlandı
4. Önceden hazırlanmış 7 ml ortam içerisine çözünen hücreler aktarılıp süspanse edildi
5. 600 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst faz atılıp, dipte kalan hücreler yeni ortam ile süspanse edilerek flaska ekildi

b.Hücre Pasajlama

1. Flasktaki tüm ortam çekildi
2. Hank's denge solüsyonu ile (Ca, Mg free) 2x2 ml yıkama yapıldı
3. Tüm solüsyonlar flasktan çekildi
4. Önceden 37 °C'ye getirilmiş Tripsin'den 1 ml flaska konuldu
5. 37°C'deki CO₂'li etüvde 3-4 dakika bekletildi
6. Hücrelerin kalkıp kalkmadığına ters bakışlı mikroskopta bakıldı. Hücrelerin yeterince kalkmaması durumunda mekanik olarak kaldırılması sağlandı
7. Flasksın içerisine 2 ml ortam eklenerek kalkan hücreler steril tüpe alındı. 1.5 ml ortam ile ikinci kez flask yıkanarak ve aynı tüpe konuldu
8. Steril tüpe alınan tripsinli ortamdaki hücreler 600g'de 5 dakika santrifüjlendi

9. Santrifüjden sonra üst faz atıldı, üzerine 5 ml ortam konulup, süspanse edildi
10. Hücreler yeni flasklara aktarıldı. Ve üzerlerine ortam ilave edildi

c.Hücre Sayma (Trypan Blue)

1. Hücre pasajlama protokolünde 9. Maddeye kadarki işlemler yapıldı
2. Steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 100 µl süspanse edilen hücre, 200 µl % 0.5 lik' Trypan Blue çözeltisi (Biological Industries, 03-102-1B) ve 200 µl PBS (Biological Industries, 02-023-1A) konuldu
3. *Neuber* lamı ile 10 alan sayılıp ortalama hücre sayısı belirlendi
4. Dilüsyon faktörü (5) x 10⁴x ortalama hücre sayısı ile 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı

d.Hücre Dondurma

1. Hücre sayma işleminde 4. Maddeye kadarki işlemler yapıldı. Her bir hücre hattının *data sheet*' lerinde önerilen hücre sayısı dikkate alınarak hücreler, %70 RPMI/DMEM, %20 FBS ve %10 DMSO(AppliChem 8U004675) içeren dondurma ortamına aktarıldı
2. Hücreler öncelikle, -20⁰C'de 3-6 saat bekletildikten sonra -80⁰C'ye kaldırıldı

3.6.2. Hücre Hatlarından DNA İzolasyonu

Hücre hatlarından DNA izolasyonları, "High Pure PCR Template Preparaiton Kit" (Roche, 11796828001) kullanılarak yapıldı. "High Pure PCR Template Preparation Kit" ile DNA izolasyonunda, firmanın önerdiği protokol uygulandı.

1. Flaskdaki hücreler kazıyıcı yardımıyla kazındı ve steril 10 ml'lik tüpe aktarıldı. Flask 2ml PBS ile yıkanarak tekrar tüpe aktarıldı.
2. 600g'de 5 dakika santrifüj yapılarak, üst faz uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 200 µl PBS eklenerek hücreler resüspanse edildi.
3. Steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µl örnek materyali, 200 µl "*Binding Buffer*" ve 40 µl Proteinaz-K eklenip karıştırıcıda iyice karıştırıldı.
4. Ağzı sıkıca parafilm ile kaplanan tüpler 70°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Aynı zamanda "*Elution Buffer*" 70°C' deki su banyosuna konuldu.
5. Oda sıcaklığında bulunan 2-propanolden (Merck, K36103495-623) 100 µl tüp içerisine eklendi ve karıştırıcıda karıştırıldı.

6. Toplama tüpünün içine filtreli tüp yerleştirildi. Örnek filtreli tüpün üst rezervuarına boşaltılarak 1 dakika 8000g'de santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonrası toplama tüpünden filtreli tüp çıkartıldı ve toplama tüpü atıldı
8. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konuldu. Filtreli tüpün üst rezervuarına 500 µl "*Inhibitor Removal Buffer*" eklendi ve bir dakika 8000g'de santrifüj yapıldı
9. Santrifüj sonrası toplama tüpünden filtreli tüp çıkartıldı ve toplama tüpü atıldı
10. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konuldu. Filtreli tüpün üst rezervuarına 500 µl "*Wash Buffer*" eklendi ve bir dakika 8000g'de santrifüj yapıldı.
11. Santrifüj sonrası toplama tüpünden filtreli tüp çıkartıldı ve toplama tüpü atıldı. İkinci kez 500 µl "*Wash Buffer*" eklendi ve bir dakika 8000g'de santrifüj yapıldı.
12. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak filtreli tüp 10 saniye maksimum hızda santrifüj yapıldı.
13. Filtreli tüp, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Tüpün üst rezervuarına 70°C'deki su banyosunda ısıtılmış "*Elution Buffer*" dan 200 µl tüpün ortasından yavaşça eklendi ve 1 dakika 8000g'de santrifüj yapıldı.
14. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA'nın saflık ve konsantrasyonu NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) cihazında ölçülerek saptandıktan sonra -20°C'ye kaldırıldı.

3.6.3.Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

Çalışmada protokollere uygun şekilde üretilen hücre hatlarından miRNA ekspresyon analizi için total RNA izolasyonu yapılır. RNA izolasyonu için 18 nükleotidin üzerindeki bütün RNA'ları saflaştırabilen *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen - 433140937) kullanıldı. RNA izolasyonu öncesi çalışma alanı ve deneyde kullanılacak materyaller RNaz inhibitörü olan dietilpirokarbonatlı (DEPC) su ile muamele edildi. Kullanılan protokol;

1. Hücrelerin protokolde önerilen sayıda (en az 100, en fazla 1×10^7 hücre) üretilmesi sağlandı.
2. Flask'daki tüm ortam çekilip uzaklaştırıldıktan sonra, flask içine 700 µl *QIAzol Lysis Reagent* eklendi ve bir kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktararak, 1 dk vortekslendi ve 5 dk oda sıcaklığında (15–25°C) inkübe edildi.

4. Örnek üzerine 140 µl kloroform eklenerek bir sonraki aşamadaki faz ayrımı için 15 sn. kuvvetlice çalkalandı. Homojenatların bulunduğu tüpler tekrar oda sıcaklığında (15–25°C) 2-3 dakika inkübe edildi.
5. 4°C’de 15 dakika 12,000 x g ‘de santrifüj edilerek örneklerin 3’lü faza ayrışması sağlandı.
6. Santrifüj sonrası üstte RNA içeren renksiz sulu faz (yaklaşık 350 µl) yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra hacminin 1,5 katı kadar %100’lük etanolden 525 µl eklendi ve pipetaj ile iyice karıştırılması sağlandı.
7. Örnek karışımı, kit içeriğindeki 2ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında (15–25°C) $\geq 8000 \times g$ 15 sn. santrifüjlendi. Elüsyon döküldükten sonra filtreli tüp aynı toplama tüpüne yerleştirilerek ve kalan karışım tekrar filtrelerin üzerine eklenip oda sıcaklığında 15 sn $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) ‘de santrifüjlendi.
8. Elüsyon atılarak, kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 700µl Buffer RWT tamponu eklendikten sonra 15 sn $\geq 8000 \times g$ ‘de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi.
9. Kolon üzerine 500 µl Buffer RPE yıkama tampon eklendikten sonra 15 sn $\geq 8000 \times g$ ‘de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilerek yıkandı. Elüsyon atılarak, kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildikten sonra yıkama işlemi aynı şekilde 500 µl Buffer RPE yıkama tampon ile aynı hızda 2 dk. santrifüj edilerek tekrarlandı.
10. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve en yüksek hızda 1 dk. santrifüj edildi.
11. miRNA gibi *small* RNA’ları da içeren total RNA’nın elüsyonu için, kolon 1.5 ml’lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 40 µl RNase-free su membran üzerine eklenerek 1 dk. $\geq 8000 \times g$ ‘de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi.
12. Elde edilen total RNA’nın saflık ve konsantrasyonu NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) cihazında ölçülerek saptandıktan sonra -80°C’de saklandı.

3.6.4.miRNA Dizin Çalışması için RNA’nın Stabilize Edilmesi

1. Total RNA izolasyonundan elde edilen 40 µl’lik örnek vida kapaklı tüpe alındı.
2. Örnek üzerine 60 µl RNase free su ilave edilerek 100 µl ‘ye tamamlandı.
3. 4 µl (10-20 µg) *Molecular Biology Grade Glycogen* ilave edildi.
4. 10 µl 3M sodyum asetat (pH: 5.2) eklendi. Karıştırıcıda karıştırılarak, kısa süreli santrifüj yapıldı.
5. 250 µl %100 etanol eklendi. Karıştırıcıda karıştırılarak, kısa süreli santrifüj yapıldı.
6. Tüp kapakları parafilm ile sıkıca kapatıldı.

3.6.5.Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)

Son yıllarda kanser genetiğindeki kromozomal aberasyonların karakteristiklerini belirlemeye yönelik olarak kullanılan en etkili yöntemlerden birisi MLPA'dır. MLPA yöntemi, özgül olarak ilgili genomdaki hedef lokuslara bağlanan problemlerin, evrensel primer çiftleri kullanarak PCR'la çoğaltılıp kapiller elektroforezinde nicel olarak ölçülmesine dayalı bir yöntemdir [117,118]. SALSA MLPA P251, 252 ve 253 prob karışımları NB'a özgül olarak geliştirilmiş olup çok sayıda aday gen ve kromozom bölgesini kapsayan bir delesyon, duplikasyon ve amplifikasyonu saptayabilmektedir. NB'da çeşitli kromozom bölgelerinin dengesizlikleri saptanmakla birlikte, bu bölgelerde yerleşim gösteren çok sayıda genin hangilerinin tümör oluşumunda ve davranışında rol oynadığı henüz bilinmemektedir. Bu açıdan, MLPA analizinde kullanılan prob sistemi, ilgili bölgelerde yerleşim gösteren çok sayıda aday genide içeren yeni bir metodolojik yaklaşımdır. Tablo 2'de her bir prob setinde hedef alınan genler ve lokusları gösterilmiştir.

Tablo-2: MLPA Çalışmalarında Kullanılan Prob Setinde Hedef Alınan Genler, Bulundukları Lokuslar ve PCR Sonrası Baz Çifti Uzunlukları

Prop Setleri								
P251-B1			P252-B1			P253-B1		
Gen	Lokus	bp	Gen	Lokus	bp	Gen	Lokus	bp
<i>GABRD</i>	1p36.33	166	<i>TMEM18</i>	2p25.3	130	<i>SPON2</i>	4p16.3	130
<i>TP73</i>	1p36.32	328	<i>NAG</i>	2p24.3	190	<i>WFS1</i>	4p16.1	229
<i>CHD5</i>	1p36.31	490	<i>NAG</i>	2p24.3	211	<i>KCNIP4</i>	4p15.31	257
<i>PARK7</i>	1p36.23	436	<i>DDX1</i>	2p24.3	274	<i>OCIAD1</i>	4p11	363
<i>KIF1B</i>	1p36.22	219	<i>DDX1</i>	2p24.3	319	<i>GNRHR</i>	4q13.2	196
<i>PTAFR</i>	1p35.3	355	<i>MYCN</i>	2p24.3	354	<i>IL2</i>	4q27	445
<i>PPAP2B</i>	1p32.2	160	<i>MYCN</i>	2p24.3	436	<i>GLRB</i>	4q32.1	329
<i>NTNG1</i>	1p13.3	463	<i>ALK</i>	2p23.2	328	<i>KLKB1</i>	4q35.2	382
<i>PDE4DIP</i>	1q21.1	130	<i>RTN4</i>	2p16.1	408	<i>GHRHR</i>	7p15.1	419
<i>LHX4</i>	1q25.2	274	<i>DYSF</i>	2p13.3	419	<i>EGFR</i>	7p11.2	301
<i>LIN9</i>	1q42.12	319	<i>RPIA</i>	2p11.2	282	<i>ELN</i>	7q11.23	355
<i>AKT3</i>	1q44	382	<i>SCN1A</i>	2q24.3	238	<i>KRIT1</i>	7q21.2	400
<i>VHL</i>	3p25.3	418	<i>CFLAR</i>	2q33.1	142	<i>IMPDH1</i>	7q32.1	190
<i>TGFBR2</i>	3p24.1	196	<i>CASP8</i>	2q33.1	265	<i>SHH</i>	7q36.3	136
<i>CTNNB1</i>	3p22.1	454	<i>BMPR2</i>	2q33.1	195	<i>PTPRD</i>	9p24.1	172
<i>SEMA3B</i>	3p21.31	364	<i>BMPR2</i>	2q33.1	301	<i>PTPRD</i>	9p24.1	463
<i>RASSF1</i>	3p21.3	400	<i>PAFAH1B1</i>	17p13.3	232	<i>CDKN2A</i>	9p21.3	274
<i>ZMYND10</i>	3p21.3	445	<i>TP53</i>	17p13.1	454	<i>CDKN2A</i>	9p21.3	266
<i>ROBO2</i>	3p12.3	283	<i>TP53</i>	17p13.1	136	<i>DNAI1</i>	9p13.3	454
<i>CASR</i>	3q21.1	481	<i>TP53</i>	17p13.1	463	<i>TJP2</i>	9q21.11	211
<i>ZIC1</i>	3q24	392	<i>WSB1</i>	17q11.1	364	<i>TGFBR1</i>	9q22.33	409
<i>PIK3CA</i>	3q26.3	211	<i>WSB1</i>	17q11.1	226	<i>POMT1</i>	9q34.13	436
<i>ST5</i>	11p15.4	142	<i>WSB1</i>	17q11.1	442	<i>TSC1</i>	9q34.2	427
<i>ABCC8</i>	11p15.1	256	<i>NF1</i>	17q11.2	337	<i>ERC1</i>	12p13.33	283
<i>CD44</i>	11p13	265	<i>NF1</i>	17q11.2	166	<i>CDKN1B</i>	12p13.1	320
<i>PTPRJ</i>	11p11.2	190	<i>ERBB2</i>	17q12	184	<i>PKP2</i>	12p11.1	142
<i>GSTP1</i>	11q13	172	<i>TOP2A</i>	17q21.2	256	<i>COL2A1</i>	12q13.11	220
<i>CNTN5</i>	11q22.1	301	<i>SGCA</i>	17q21.33	172	<i>MDM2</i>	12q15	337
<i>CASP1</i>	11q22.3	184	<i>TOB1</i>	17q21.33	391	<i>TBX5</i>	12q24.21	184
<i>ATM</i>	11q22.3	337	<i>RECQL5</i>	17q25.1	220	<i>NFKBIA</i>	14q13.2	240
<i>CADM1</i>	11q23.2	238	<i>BIRC5</i>	17q25.3	382	<i>SPG3A</i>	14q22.1	166
<i>MLL</i>	11q23.3	427	<i>SECTM1</i>	17q25.3	400	<i>TGFB3</i>	14q24.3	160
<i>HMBS</i>	11q23.3	136	<i>TBCD</i>	17q25.3	160	<i>MOAP1</i>	14q32.12	391
<i>THY1</i>	11q23.3	409						

MLPA Protokolü

Birinci Gün

1. Stok DNA, son konsantrasyonu 40 ng/μl olacak şekilde steril su ile seyreltildi.
2. 0.2 ml'lik tüplere örnek ve prop karışımının (251, 252, 253) numaraları yazılarak kodlama yapıldı.
3. 5 μl seyreltilmiş DNA'dan 0.2 μl'lik PCR tüpüne eklendi.
4. DNA'ın tüp dibine inmesi için, kısa süreli santrifüj işlemi yapıldı.
5. Tüpler Termal Döngü cihazına yerleştirildi ve 15 dakika 98°C'de inkübe edildi.
6. Prop karışımı ve MLPA tamponu -20°C'den çıkartıldı. Çözöldükten sonra karıştırıcıda karıştırıldı.
7. Her bir reaksiyon için aşağıdaki bileşenler kullanılarak karışım hazırlandı,
 - a. 1.5 μl MLPA tamponu
 - b. 1.5 μl Prop karışımı
8. Termal döngü cihazı 25°C'ye geldiğinde, yedinci basamakta hazırlanan karışım, 3 μl olacak şekilde tüm tüplere dağıtıldı. Tüp içeriği birkaç kez çekip bırakılarak pipetaj yapıldı.
9. Termal döngü cihazında hibridizasyon programına devam edildi. Örnekler, 1 dakika 95°C'de, sonrasında 60°C'de 16 saat inkübe edildi.

İkinci Gün

10. Ligase-65 Buffer A ve Ligase-65 Buffer B çözöltöleri -20°C'den çıkartıldı. Çözöldükten sonra kısaca karıştırıcıda karıştırıldı ve buz üzerine alındı
11. Ligaz tampon karışımını her reaksiyon için hazırlandı
 - a. 3.0 μl Ligase-65 Buffer A
 - b. 3.0 μl Ligase-65 Buffer B
 - c. 25.0 μl dH₂O
 - d. 1.0 μl Ligase-65

İyice karıştırıcıda karıştırıldı ve buza gömüldü.

*Bu aşamada 16. basamağa atlayarak 19. basamağa kadar olan işlemleri yapıp PCR tüpleri +4°C' ye kaldırıldı.

*İkinci olarak 23. basamaktaki PCR karışım içeriğini hazırlanıp buz üzerinde bekletildi. Taq polimerazı ilgili basamağa gelince karışıma ilave edildi ve iyice pipetaj yapıldı.

12. Termal döngü cihazında Ligasyon programı seçildi 54°C’de bekleme pozisyonunda beklemeye alındı.
13. Örnekler 54°C’de iken termal döngü cihazından çıkarılmadan 32.0 µl ligaz tampon karışımını her reaksiyona ilave edildi ve tüp içeriği birkaç kez çekip bırakılarak pipetaj yapıldı.
14. Termal döngü cihazında programa kaldığı yerden devam edildi. 15 dakika 54°C’de sonrasında 5 dakika 98°C’de bekletip, süre sonunda 4°C’de beklemeye alındı.
15. Ligasyon ürünlerini 4°C’de bir haftadan fazla saklanabilir. Eğer uzun süre bekletilecekse, -20°C’de dondurarak saklanmalıdır.

PCR Reaksiyonunun Kurulması

16. PCR işlemleri için, PCR Buffer, SALSA PCR-primerleri ve SALSA enzim dilüsyon tamponunu -20°C’den çıkartıldı. Çözüldükten sonra kısaca karıştırıcıda karıştırılır ve buza gömüldü.
17. Yeni bir PCR tüpüne ligasyon tüpündeki kodları ve prob karışım numarasını yazıldı.
18. Her bir reaksiyon için PCR tampon karışımını hazırlandı ve iyice pipetaj yapıldı.
 - a. 4.0 µl SALSA PCR Buffer
 - b. 26.0 µl dH₂O
19. 30 µl PCR Buffer karışımını her yeni tüpe dağıtıldı ve iyice pipetaj yaparak karıştırıldı.
20. 10 µl ligasyon ürününden PCR Buffer karışımı konan tüplere aktarıldı.
21. Ligasyon karışımının tüp dibine çökmesi için kısa süreli santrifüj yapıldı.
22. Tüpler Termal Döngü cihazına yerleştirildi.
23. Buz içinde her bir reaksiyon için PCR karışımı hazırlandı ve iyice pipetaj yapıldı.
 - a. 2.0 µl SALSA primerleri
 - b. 2.0 µl SALSA enzim dilüsyon tamponu
 - c. 5.5 µl dH₂O
 - d. 0.5 µl SALSA Polimeraz
24. Termal döngü cihazında PCR programı seçildi.
25. Her bir reaksiyona 10 µl PCR karışımı tüpler Termal döngü cihazında ve döngü cihazının ısıt tablası 60°C’de iken eklendi (Bu aşamada termal döngü cihazının programı “Pause” modu ile durdurulabilir). Pipetle içerik en az 5 kez karıştırıldı.

26. Termal döngü cihazında programa devam edildi. (35 döngü olacak şekilde; 1 döngü [95°C 30 saniye, 60°C 30 saniye, 72°C 60 saniye], son uzama 72°C 20 dakika, sonlandırma 4°C).

27. Süre sonunda ürünler ışık görmeyecek şekilde ve -20°C’de saklandı.

Termal profiller

A) Hibridizasyon Reaksiyonu

-98°C 5 dakika, 25°C Bekletilecek, 95°C 1 dakika, 60°C Bekletilecek

B) Ligasyon Reaksiyonu

-54°C Bekletilecek, 54°C 15 dakika, 98°C 5 dakika, 4°C Bekletilecek

C) PCR Reaksiyonu

-60°C Bekletilecek [35 Döngü: 95°C 30 saniye (Denatürasyon), 60°C 30 saniye (Primer Bağlanma), 72°C 60 saniye (Uzama)], 72°C 20 dakika (Son uzama 35. Döngüde), 4°C Bekletilecek

Örneklerin Elektroforezde Yürütülmesi ve Analizi

Örnekler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, BİYOMER’de bulunan “ABI-Prism 3130XL 16 Capillaries Genetic Analyzer” (Applied Biosystems) cihazında yürütüldü. Cihazda yürütülürken 36 cm kapiller ve POP-7 (Applied Biosystems, 4352759) polimeri kullanıldı. Örnekler referans boyut standardı olarak ROX500 (Cat no: 401734, Applied Biosystems) ile birlikte yürütüldü. ROX500 standarttan her bir örnek için 0.3 µl, 9.0 µl deiyonize Formamid (Applied Biosystems, 4311320) içerisine MLPA PCR ürününden 1.0 µl mikro tüplere eklendi. Karışım termal döngü cihazında 2 dakika 80°C’de, 5 dakika 4°C’de bekletildi. Örnekler süre sonunda cihaza yüklenerek yürütüldü. MLPA PCR reaksiyonunda FAM işaretli primer ve standart için ROX500 kullanıldığı için elektroforez sırasında iki farklı eğri rengi (flourokrom işaretine göre FAM; mavi ve ROX500 kırmızı) oluştu. Veriler cihazın yazılımı olan GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) kullanılarak verilerin ön değerlendirmeleri yapıldı ve sonuçlar txt formatında sistemden alındı. Referans olarak çalışılan örnekler ayrı bir dosya olarak sistemden alındı. Eğri grafikleri gözlenmeyen olgular tekrar yürütüldü.

Yürütülen örneklerin analizi “Coffalyzer MLPA-DAT software v.9” (MRC Holland) ile yapıldı. GeneMapper programından txt formatında alınan dosyalar Coffalyzer programında “Import GENEMAPPER TXT FILE (multiple runs)” kısmından programa yüklendi. Örnekler

“Data Filtering” kısmından referans ve örnekler ayrıldı ve “Filter with default binset (P)” sekmesi tıklanarak eğri değerlerinin prob karışımı içerisinde yer alan beklenen eğri değerlerine göre analizi yapıldı. Çıkan sayfada kontrol ve çalışılan prob setlerinin sayılarının tam olması, ligasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, olguların cinsiyetleri ve DNA Denatürasyon (DD) eğrilerinin varlığı kontrol edildi. Problem olmaması durumunda “Data analysis” sekmesinden “Control Probe Analysis (LMS)” tıklanarak verilerin analizi yapıldı.

Bu tip analizlerde (Control Probe Analysis (LMS)) Coffalyzer programı, referans örneği içerisindeki hedef gen probu ile kontrol lokus probun oranını üç ayrı referans DNA için hesaplar ve ortalamasını almaktadır. Aynı şekilde her bir hasta örneğinin kendi içindeki hedef gen probu ile kontrol lokus probunu oranlamaktadır. Prob oran değeri hastanın değerinin referans değerine bölümü ile hesaplanmaktadır. MLPA’dan elde edilen prob oranlarının değerlendirilmesi, Ambros ve arkadaşlarının belirlediği kriterlere göre yapılmıştır [119]. Buna göre;

- I. İki bitişik ve aynı kromozom kolundaki problarda aberasyon varsa bu bölgedeki aberasyon değerlendirmeye alındı.
- II. Prob oran değer aralıkları;
 - a. Normal; 0.75-1.25
 - b. Delesyon; 0.00-0.74 (0.70-0.74 arası *borderline*).
 - c. Kazanım; 1.26-3.00 (1.26-1.30 arası *borderline*).
 - i. Tip 1 kazanım (2p için); Tüm 2p problemleri ya da *TMEM18-ALK* genleri arası kazanım olması durumu.
 - ii. Tip 2 kazanım (2p için); *NAG-ALK* arası herhangi bir bölgede kazanım olması durumu.
 - d. Amplifikasyon; 3.01 ve üzeri (sadece MYCN geni için).
- III. SCA (segmental kromozom kolu artışları) için 1. kural geçerlidir.

3.6.6. miRNA Ekspresyon Profillerinin Mikro-dizin Yöntemi ile Belirlenmesi

Hücre hatlarından elde edilen RNA örnekleri mikro-dizin çalışması için, Ocean Ridge Biosciences (ORB, Palm Beach Gardens, FL) firmasına gönderildi. Çalışmada miRBase 16.0 veritabanından yer alan 1221 olgun insan mikro RNA'sını kapsayan 1209 prob kullanılmıştır. Kullanılan dizin sistemi her örnek ile birlikte hibridize olan 20 mol'e kadar düşük sentetik mikroRNA'ları tespit edebilecek kadar hassaslığa sahiptir. İşlem başlıca dört aşamadan oluşmaktadır. Dizin çalışması firma tarafından cam platform üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hücre hatları, nöroblastomda en sık gözlenen delesyonlar olan 1p ve 11q delesyonları dikkate alınarak, 1p delesyonuna sahip olanlar ile olmayanlar ve 11q delesyonuna sahip olanlar ile bu delesyona sahip olmayanlar şeklinde ikili gruplara ayrılarak miRNA ekspresyon profillerinin çıkarılması planlandı.

3.6.6.1. Örneklerin Hazırlanması

- Örneklerden elde edilen total RNA'ların kalitesinin UV spektrofotometre ve agaroz gel elektroforezi ile değerlendirildi.
- Total RNA dan düşük moleköl ağırlıklı RNA'ların (20-200 nükleotit), Nanosep 100K ultra-filtration kolonları (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI) ile büyüklüklerine göre ayrılır ve RNeasy MinElute Clean-Up Kiti (Qiagen, Inc., Valencia, CA) kullanılarak purifiye edildi.
- Küçük moleköl ağırlıklı RNA ların 3' uçlarının Flash Tag RNA labeling Kiti (Genisphere Inc., Hatfield, PA) ile Oyster-550 flöresan boyasıyla etiketlendi.
- İşaretlenmiş düşük moleköl ağırlıklı RNA ların Flash Tag RNA labeling Kitinde önerilen koşullar altında, microRNA mikro-dizin'e hibridize edildi ve yıkama işlemleri gerçekleştirildi.
- Mikro-dizin'in "Axon Genepix 4000B Scanner" ile taranır ve "GenePix V4.1" yazılımı kullanılarak data elde edildi.

3.6.6.2. Verilerin İşlenmesi

- Her mikrodizin'den, sinyal intensiteleri elde edilir ve negatif kontrol sinyal intensitelerinin ortalamasının %10'u kırılır ve sinyal olmayan (*non spot area*) arka planın standart hatası eklenir ile treshhold değerleri belirlendi.
- Sinyal intensiteleri ve treshhold değerleri (T) hesaplanır ve log2 tabanına transforme edildi.
- Tüm örneklerin treshhold değerinin üzerindeki prob intensitelerinin ortalamasının %20'lik dilimi kırılır ile normalizasyon faktörü (N) saptanır ve log2 tabanına transforme edilen sinyal intensiteleri normalize edildi.
- 1209 insan probunun her birinin ortalama prob intensitesi, *triplicate* sinyal intensitesinin ortalaması ile elde edildi.

3.6.6.3. Mikro-dizin'in Kalite Kontrolü

Genel olarak dizin çalışmalarının kalite ve kontrolünü belirlemede üç faktör göz önüne alınmaktadır. Bunlar; mikrodizin'in sensitivitesi, spesifitesi ve tekrarlanabilirliğidir.

- Her dizin, etiketleme ve hibridizasyondan önce her bir RNA örneğine ilave edilen 11 sentetik RNA yı hedefleyen prob içermektedir.
- Mikrodizin hibridizasyonunun sensitivitesi, 11 sentetik probun hibridizasyonunun tespitiyle doğrulandı.
- Mikrodizin'in spesifitesini kontrol etmek için, dizin üç farklı miRNA'ya komplementer (miR-93, mir-27a, mir-152) spesifite kontrol problemleri içerir. Her spesifite kontrol probu; *perfect match*, *single mismatch*, *double mismatch* ve *shuffled version* olmak üzere üç farklı seti içerir. Buna göre mikrodizin'in spesifitesi kontrol edildi.
- Hibridizasyon spesifitesinin, mikrodizin üzerinde *perfect match* problemlerinin hibridizasyonun tespiti, *double mismatch* ve *shuffled version* problemlerinin ise hibridizasyonunun tespit edilmemesi yoluyla doğrulandı.
- Dizinin tekrarlanabilirliği, her dizin'de *triplicate* insan prob sinyallerinin hibridizasyon intensitelerinin gözlenmesiyle belirlendi.

3.6.6.4. Ekspresyon Farkının Analizi

Çalışmada saptanan problemler için, Log2 tabanına transforme ve normalize edilen sinyal intensiteleri, “National Institute of Ageing” (NIA) tarafından geliştirilen dizin analiz yazılımı ile ANOVA istatistiksel analiz metodu kullanılarak gruplar arasındaki ekspresyon farkı belirlenir. İstatistiksel anlamlılık, Benjamini and Hochberg tarafından önerilen hata bulma metodu (FDR) kullanılarak belirlenir [120]. FDR P değeri 0.05’e eşit ve daha küçük olan tüm problemler arasındaki pozitif hatanın oranıdır. Buna göre, istatistiksel anlamlılık iki parametreye göre belirlendi. Buna göre hem ANOVA analizi sonucunda *P* değeri 0.05’e eşit ve daha küçük olanlar hem de pozitif hata oranı (FDR) 0.05’e eşit ve küçük olan problemler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. FDR eşitliği aşağıda gösterilmiştir.

$$FDR_r = \min_{i \geq r} \left[\frac{p_i N}{i} \right]$$

r: Problemlerin *P* değerleri artarak sıralandığında, problemin *rank* (sıra) değeri

i: Anlamlı *P* değerine sahip problemin *rank* değeri

P_i: *i* sırasında bulunan problemin *P* değeri

N: Test edilen problemlerin toplam sayısı

min: Koşulları sağlayan en küçük değer

3.6.7. MikroRNA’ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi

miRNA’ların hedefleri olan mRNA’ları belirlemek için, son yıllarda birçok web tabanlı bioinformatik algoritmalar geliştirildi. Geliştirilen algoritmalar, genomda miRNA’nın hedefini tanımlamak için miRNA’ların hedef bölgelerinin özellikleri üzerine kurulmuştur. miRNA’ların hedefine bağlanmalarında altı özellik belirlenmiştir [92].

Bu özellikler;

1- *miRNA-mRNA Baz Eşleşmesi*: *Seed site* olarak adlandırılan bölgedeki baz eşleşmesi (8mer, 7mer-m8, 7mer-A1 ve 6mer) esasına dayanan bu özellik, hedef tanımda en önemli parametredir.

2-*Bölge Lokasyonu*: Sıklıkla miRNA’lar hedef genlerinin mRNA’larına 3’UTR bölgelerinden bağlanmalarına rağmen, RISC kompleksine yüklü olan miRNA’ mRNA’nın

herhangi bir segmentine bağlanabilir. Aynı zamanda bazı genlerin 3'UTR bölgelerinin kısa olması da miRNA'ların hedef bölgeye bağlanmasını etkilemektedir.

3-miRNA'ların ve Hedeflerinin İlişkili Türler Arasında Korunmuş Olması: miRNA aileleri ilişkili türler arasında iyi derecede korunmuş ve aynı *seed* bölgesine sahip miRNA'lardan oluşmaktadır. Buna ilaveten miRNA'ların hedefleri de ilişkili türler arasında korunmuştur. Hedef sekans taramasında hedef bölgenin korunmuş olmasını içeren bir filtrenin uygulanması, hatalı- pozitif oranını düşürebilmektedir.

4-Bölge Ulaşılabilirliği: mRNA'ların sekonder yapısı miRNA'ların hedef bölgelerine ulaşılabilirliğini etkilemektedir. Termodinamik yasaları çerçevesinde minimum serbest enerji, hedef bölgenin sekonder yapısını ve RNA'nın etkileşimi hesaplamak için kullanılmaktadır. Etkili hedef bölgeler sıklıkla, *seed site* bölgesinin yaklaşık 30 nükleotitik yukarı ve aşağı bölgelerinde zengin A:U nükleotitleri içerir.

5-Çoklu Bölgeler: Aynı 3'UTR bölgesinde birden fazla hedef bölgelerin varlığı miRNA-mRNA etkileşimini etkilemektedir. Güçlü miRNA hedefleri, tek bir hedef bölgenin yerine çoklu hedef bölgelere sahiptirler. Bu durum hedef öngörüsünü anlamlı olarak artırmaktadır.

6- Ekspresyon Profili: miRNA'lar hedef olarak mRNA'yı aldıklarından dolayı, mRNA'ların ekspresyon düzeyleri büyük ölçüde miRNA'ların ekspresyon düzeylerine bağlı olarak değişebilmektedir. Sonuç olarak miRNA-mRNA' baz eşleşmesi, ekspresyon düzeyleri ile negatif korelasyon göstermektedir. miRNA-mRNA ekspresyon profilleri arasındaki negatif korelasyon temeli üzerine kurulan bu yaklaşım, hatalı-pozitif oranını düşürmektedir.

Çalışmamızda miRNA dizin sonuçlarına göre ekspresyon profilinde değişim gözlenen miRNA'lar için, nöral krest yolağının farklılaşma sürecinde rol oynayan anahtar genlerin hedef olup olmadığının analizi yapılmıştır. Buna göre çalışmamızda miRNA'ların öngörülen hedeflerine spesifiteyi artırmak için, farklı özellikleri olan ve literatürde sıklıkla kullanılan birden fazla program kullandık. Buna göre çalışmada, *DIANA-microT* ve *miRanda web* tabanlı yazılımları kullanıldı [121,122].

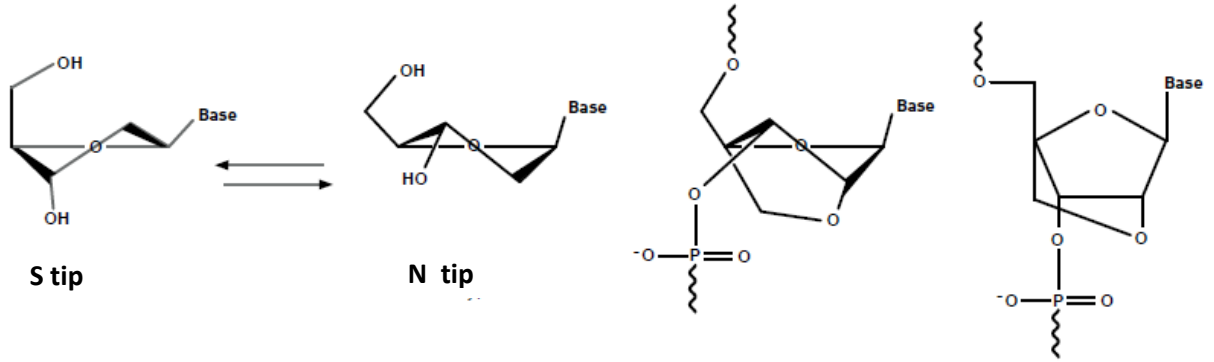
3.6.8. miRNA'ların Eş Zamanlı (Real Time) PCR ile Doğrulanması

miRNA dizin sonuçlarına göre ekspresyon profilinde değişim gözlenen miRNA'lar arasından, nöral krest yolağının farklılaşma sürecinde rol oynayan anahtar genleri hedef alan miRNA'lar seçilerek eş zamanlı PCR yöntemi ile ekspresyon değişimi doğrulandı. Çalışma için hücre hatları sayfa 23,24'de belirtilen protokoller çerçevesinde yeniden açılarak, sayfa 25,26'daki protokol aşamaları takip edilerek total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışmada, miRNA dizin çalışmasında kullanılan hücre hatlarından farklı pasaj numaralı olanları seçildi. Buna göre Real Time PCR çalışması için; KELLY (Pasaj 5) ve SIMA (Pasaj 5), IMR-32 (Pasaj 5), MHH-NB-11 (Pasaj 3), SH-SY5Y (Pasaj 6), CHP-126 (Pasaj 4) hücre hatları seçildi. Çalışmamızda Real Time PCR çalışmaları, Exiqon firmasının geliştirmiş olduğu “ miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR” sistemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntem nükleik asitler üzerinde firmanın geliştirmiş olduğu *Locked Nucleic Acid* (LNA) teknolojisi temeline dayanmaktadır.

Locked Nucleic Acid (LNA) Yapısı:

Nükleik asitler tek bir nükleotidin uzaysal şeklinin içe doğru bulunmasıyla iki farklı konformasyonel tip içinde bulunurlar. Bunlar; A ve B tipleridir. Nükleosid yapısındaki beş karbonlu şeker halkasının üçüncü karbonunun içe doğru bulunmasıyla A tipi ve N konformasyonu oluşurken, ikinci karbonun içe doğru bulunmasıyla B tipi ve S konformasyonu oluşur. A tipi, genomda çift iplikli RNA yapılarının olduğu bölgelerde bulunurken, B tipi, çift iplikli DNA yapılarında bulunur. Özellikle N konformasyonel yapısında oluşturulabilecek sınırlı bir konformasyonel değişikliğin, DNA ve RNA'yı hedeflemede yüksek afinitenin meydana getirilebileceği öngörülmüştür. Bu amaçla LNA yapısında, nükleotidin ikinci karbon atomundaki oksijen ile dördüncü karbon atomu arasında, bir metilen grubu aracılığı ile kurulan bir bağ sonucunda nükleotid, en iyi derecede N konformasyonu içinde kilitli olacağı bir molekül konformasyonuna dönüştürülür (Şekil-5).

Sonuç olarak LNA, bir veya daha fazla 2'-O,4'-C-metilen-β-D-ribofuranzill nükleosid'leri içeren oligonükleotidlerden oluşmaktadır.



Şekil-5: Nükleosidlerin konformasyonu ve LNA yapısı

LNA temelli primerler, hedefe yüksek afiniteyle bağlanması ve hibridize olmuş yapının stabilitesini artırması gibi özelliklerin yanı sıra termal stabiliteyi de artırmaktadır. Bu sayede yaklaşık 25 nükleotit uzunluğunda olan miRNA'lar için bağlanma (annealing) sıcaklığı 55-60 °C' ye kadar artırılabilir.

3.6.8.1. Deneyin Aşamaları

Gerçek zamanlı PCR ile miRNA'ların ekspresyonlarının belirlenmesi temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır.

a. Tek Sarmal cDNA Sentezi

Tek sarmal cDNA sentezi için “*miRCURY LNA Universal RT microRNA system*” kitinin önerisi doğrultusunda “*Universal cDNA synthesis*” (*miRCURY*, #138111, Denmark) kiti kullanıldı. Kit protokolü 20-25ng RNA başlangıç materyali ve kontrol amaçlı RNA spike-in (sentetik RNA) için 10⁹/µl kullanımını önermektedir. Bu amaçla RNA izolasyonu yapılan örnekler, $C_1V_1 = C_2V_2$ formülü kullanılarak 5ng olacak şekilde seyreltildi. Çalışmada RNA spike-in kullanılması, çalışmanın kalite ve kontrolü tespit etme açısından önemlidir. Her 20ng RNA örneği içine 1 µl RNA spike-in eklenerek, RNA spike-in cDNA sentezlenmesi gerçekleştirilir. *Reverse transkriptaz* reaksiyonu için, kit içeriğindeki bütün reaktifler buz üstünde çözölmeye bırakıldı. Çözölme sonrası bütün reaktifler, belirtilen uygun koşullarda karıştırılarak kısa süreli olarak santrifüjlendi. Reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar aşağıdaki gibidir.

Komponent	Hacim (µl)/reaksiyon başına	6.5x Reaksiyon hacmi
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl	26 µl
Nükleazsız su	9 µl	58.5 µl
Enzim karışımı	2 µl	13 µl
RNA “spike-in”	1 µl	6.5 µl

Hazırlanan karışımdan, hücre hatlarının isimlerinin yazılı olduğu her bir tüpe 16 µl dağıtıldı. Beş ng olacak şekilde seyreltilen hücre hatlarının RNA’larından 4 µl kendi tüplerine ilave edilerek toplam hacim 20 µl’ ye çıkarıldı. Örnekler pipetleme yöntemi ile karıştırıldıktan sonra, cDNA eldesi için aşağıdaki termal profil uygulandı.

Sıcaklık	Zaman
42 °C	60 dk
95 °C	5 dk
4 °C	-

b. Gerçek Zamanlı PCR

Bu aşamada, ekspresyon değişimi gözlenen miRNA’lara özgü LNA primerler, nicel miktar tayini için karşılaştırılabilecekleri ve verilerin normalizasyonu için gerekli olan referans gene özgü primerler ve “SYBR Green” (114059) kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile miRNA’ların ifadeleri ve karşılaştırmaları gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR’ın analizinin ve yorumunun doğruluğu için oldukça önemli olan, normalizasyon tekniği, incelenen değişkenin dışındaki biyolojik varyasyonların sonuçlar üzerindeki etkisini ortadan kaldıran bir yöntemdir. Genellikle normalizasyon için, incelenen bütün örnek aralığında istikrarlı olarak ifade edildiği bilinen gen/ler seçilmektedir. Bu amaçla miRNA’lar için küçük kodlamayan RNA’ların (sRNAs veya sncRNAs) seçilmesi önerilmektedir. Çalışmamızda referans gen olarak, *snord48* kullanılmıştır.

Öncelikle çalışmada *snord48* primerlerinin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek ve cDNA sentez aşamasının sorunsuz bir şekilde gerçekleştiğini görmek için ön çalışma yapıldı. Çalışma için üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde; cDNA ‘ lar 1:80 oranında seyreltildi. Bu amaçla 5 µl cDNA 395 µl ile su ile karıştırıldı. Ayrıca liyofilize halde gelen

snord48 primerleri de 220 µl su ile çözülüp karıştırıldı. Hem snord48 hem de RNA spike-in için ayrı karışımlar hazırlandı. Reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar aşağıdaki gibidir.

Komponent	Hacim (µl)/reaksiyon	6.5x Reaksiyon
	başına	hacmi
<i>SYBER Green Mix</i>	5 µl	32.5 µl
<i>Primer mix (snord48/RNA spike in)</i>	1 µl	6.5 µl

Hazırlanan karışım PCR platelerindeki kuyucuklara 6 µl olarak dağıtılıp, üzerlerine seyreltilen cDNA örneklerinden 4 µl konuldu. Plate kısa süreli santrifüj edilerek, Real Time PCR cihazına (Light Cycler 480 ,ROCHE) yerleştirildi. Örneklerin kuyucuklara dağıtımı aşağıdaki şekilde verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	spike-in + 1.örnek	spike-in + 2.örnek	spike-in + 3.örnek	spike-in + 4.örnek	spike-in + 5.örnek	spike-in + 6.örnek	spike-in + N.K					
B	U48 + 1.örnek	U48 + 2.örnek	U48 + 3.örnek	U48 + 4.örnek	U48 + 5.örnek	U48 + 6.örnek	U48 + N.K					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Copyright © 2009 Editia Aksamitiene

İlgili termal profil:

	Sıcaklık	Zaman
<i>Denatürasyon</i>	95 °C	10 dk
<i>Amplifikasyon (40)</i>	95 °C	10 sn
	60 °C	1 dk
<i>Optik okuma</i>		

cDNA sentez aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi ve snor48 primerlerinin çalıştığının tespitinden sonra, miRNA'lara spesifik çalışmaya geçildi. Bu amaçla, seçilen miRNA'lara özgü liyofilize halde bulunan ileri ve geri LNA primerleri öncelikle 110 µl su ile çözüldü, ardından karıştırılarak çöktürüldü. Seçilen her bir miRNA için gerçekleştirilen reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar aşağıdaki gibidir.

Komponent	Hacim (µl)/reaksiyon başına	6.5x Reaksiyon hacmi
<i>SYBER Green Mix</i>	5 µl	32.5 µl
<i>Primer mix (miRNA primer)</i>	1 µl	6.5 µl

Reaksiyonda kullanılan 6.5 µl primer karışımı, 3.25 µl *forward* primer, 3.25 µl *reverse* primer den oluşmaktadır. Hazırlanan karışım PCR platelerindeki kuyucuklara 6 µl olarak dağıtılıp, üzerlerine hücre hatlarından elde edilen ve seyreltilen cDNA örneklerinden 4 µl konulur. Plate kısa süreli santrifüj edilerek, Real Time PCR cihazına (Light Cycler 480 ,ROCHE) yerleştirildi. Örneklerin kuyucuklara dağıtımını aşağıdaki şekilde verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	mir 410 + 1.örnek	mir494 + 1.örnek	mir495 + 1.örnek	mir543 + 1.örnek	U48 + 1.örnek							
B	mir 410 + 2.örnek	mir494 + 2.örnek	mir495 + 2.örnek	mir543 + 2.örnek	U48 + 2.örnek							
C	mir 410 + 3.örnek	mir494 + 3.örnek	mir495 + 3.örnek	mir543 + 3.örnek	U48 + 3.örnek							
D	mir 410 + 4.örnek	mir494 + 4.örnek	mir495 + 4.örnek	mir543 + 4.örnek	U48 + 4.örnek							
E	mir 410 + 5.örnek	mir494 + 5.örnek	mir495 + 5.örnek	mir543 + 5.örnek	U48 + 5.örnek							
F	mir 410 + 6.örnek	mir494 + 6.örnek	mir495 + 6.örnek	mir543 + 6.örnek	U48 + 6.örnek							
G	mir 410 + su	mir494 + su	mir495 + su	mir543 + su	U48 + su							
H												

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

İlgili termal profil:

	Sıcaklık	Zaman
<i>Denatürasyon</i>	95 °C	10 dk
<i>Amplifikasyon (40)</i>	95 °C	10 sn
	60 °C	1 dk
<i>Optik okuma</i>		

c. Data Analizi

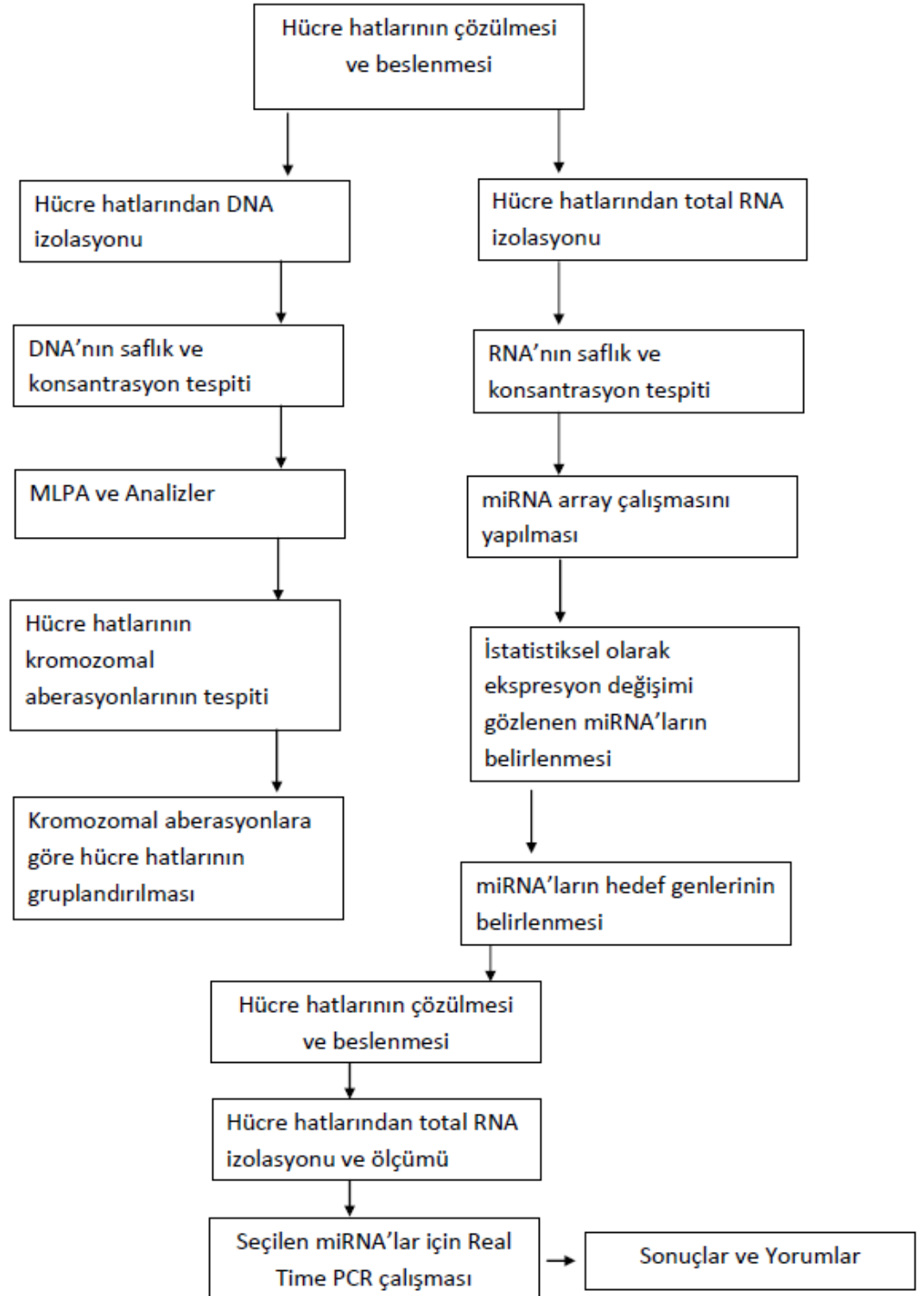
Verilerin analizi “Light Cycler 480 Quantification Software” olarak isimlendirilen bilgisayar yazılımı kullanılarak, $\Delta\Delta CT$ metodu ile yapıldı [123].

- Kullanılan bu metotta, her bir hücre hattı ve referans gen (snord48) için seçilen miRNA’ların Ct değerleri elde edildikten sonra öncelikle normalizasyon işlemi yapıldı. Bunun için aşağıdaki formül uygulandı:

Normalizasyon: $2^{-(\text{target ct} - \text{referans ct})}$

- Gruplar arasındaki ekspresyon değişimi saptamak için öncelikle, gruptaki her bir örnek için normalizasyon metodu uygulandıktan sonra, grubu oluşturan örneklerin Ct değerlerinin geometrik ortalamaları alınarak her bir grubun Ct değeri bulundu.
- Her bir gruba ait miRNA nın ekspresyon değeri saptandıktan sonra grupların oranlanması ile gruplar arasındaki ekspresyon değişimi saptandı.

3.7. Araştırma Planı



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada MLPA sonuçlarının değerlendirilmesi, Ambros ve arkadaşlarının belirlediği kriterlere göre gerçekleştirildi [119]. miRNA dizin çalışması sonucunda gruplar arasında ekspresyonel değişim gözlenen miRNA'ların istatistiksel analizi için, ANOVA analiz metodu ve FDR metodu kullanıldı. Real-Time PCR çalışmasındaki ekspresyonel değişim $\Delta\Delta CT$ metodu ile belirlendi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıklar

Çalışmada kullandığımız hücre hatlarının sınırlı sayıda olması ve araştırmanın sınırlılıkları arasında yer almaktadır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 22.05.2008 tarih ve 213 protokol numarası onayıyla onam formu alınarak gerçekleştirildi (EK-1).

4. BULGULAR

4.1. Hücre Hatlarının DNA Ölçüm Sonuçları

DNA izolasyonu yapılan örneklerin, DNA saflık ve konsantrasyon ölçümleri NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazında gerçekleştirildi. Her bir örnek için birbirini takip eden üç ölçüm yapıldı ve ortalaması alınarak DNA miktarı ng/µl olarak belirlendi. DNA'nın saflığının belirlenmesinde 260/280 absorbans oranının 1.80-2.0 değerleri arasında olma kriteri dikkate alındı.

Tablo-3: Hücre Hatlarının Genomik DNA'larının Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

Hücre hattı	Abs260/280	Abs260/230	Konsantrasyon(ng/µl)
KELLY	1.96	2.24	1240.4
SIMA	1.95	2.12	275.0
CHP-126	1.87	2.10	60.3
IMR-32	1.94	2.25	540.1
MHH-NB-11	1.82	1.90	91.1
SH-SY5Y	1.80	1.93	47.0

4.2. MLPA Sonuçları

MLPA çalışmaları için hücre hattı DNA'larından 40 ng lık çalışma solüsyonu hazırlandı. MLPA çalışmalarında MRC-Holland firmasının nöroblastom için üretmiş olduğu Salsa MLPA Kit P251-B1/P252-B1/P253-B1 problemleri kullanıldı. Çalışmanın bu basamağında günümüze kadar NB olguları özelinde yapılan araştırmalarda, anomalileri saptanan lokusların tamamı analiz edildi. Analiz sonuçları Tablo 4,5 ve 6'da gösterilmiştir.

Tablo-4: P251-B1 Prob Çalışmaları ve Sonuçları

Genler	Chr pos	CHP	IMR	KLY	MHH	SHY	SMA
GABRD	01p36.33	0,6	0,6	1,6	1,1	1,1	0,6
TP73	01p36.32	0,5	0,5	1,2	0,7	1	0,6
CHD5	01p36.31	0,4	0,3	0,8	0,5	0,9	0,6
PARK7	01p36.23	0,6	0,4	0,9	0,7	1	0,5
KIF1B	01p36.22	0,6	0,6	1	1,1	1,1	0,5
PTAFR	01p35.3	0,8	0,7	0,8	1	1,1	0,7
PPAP2B	01p32.2	1,1	1,5	1,1	1,8	1,1	1,1
NTNG1	01p13.3	1,1	1,1	1	1	1	1,3
PDE4DIP	01q21.1	1,2	1,4	1,8	1,8	1,2	0,9
LHX4	01q25.2	1,5	1,2	1,3	1,6	1,5	1,2
LIN9	01q42.12	1,6	1,2	1,4	1,6	1,3	1
AKT3	01q44	1,3	0,9	1,1	1,1	1,1	1,2
VHL	03p25.3	1,2	0,9	1,1	0,9	1,1	1
TGFBR2	03p24.1	1	0,9	1	1,2	1	1,1
CTNNB1	03p22.1	1	0,7	0,8	0,7	1	1,1
SEMA3B	03p21.31	1,2	0,9	0,8	1	1	1,2
RASSF1	03p21.3	1,2	0,9	0,6	0,8	1,1	1,2
ZMYND	03p21.3	1,3	0,9	0,7	0,8	1,1	1,2
ROBO2	03p12.3	0,9	0,8	1	0,9	0,9	1,1
CASR	03q21.1	1,1	0,7	1,1	0,7	0,9	1,1
ZIC1	03q24	0,8	0,6	1,1	0,7	0,8	1,1
PIK3CA	03q26.3	1,1	0,8	1,2	1,2	1	1,1
ST5	11p15.4	1,1	1,2	0,5	1,4	1,1	0,8
ABCC8	11p15.1	1,2	0,9	0,5	1	0,9	0,8
CD44	11p13	1	0,8	0,8	1	1,1	0,8
PTPRJ	11p11.2	1	1	1,1	1,2	1	0,8
GSTP1	11q13	1,1	1,1	0,9	1,3	1,1	0,8
CNTN5	11q22.1	0,5	0,8	1	0,9	0,9	0,7
CASP1	11q22.3	0,5	0,9	0,8	1,2	1	0,8
ATM	11q22.3	0,5	0,8	0,9	0,9	1	0,8
CADM1	11q23.2	0,6	0,9	0,5	1	1,1	0,9
MLL	11q23.3	0,5	0,9	0,5	0,8	1	0,8
HMBS	11q23.3	0,7	1	0,6	1,4	1,1	0,8
THY1	11q23.3	0,6	0,9	0,4	0,9	1,1	0,8

P251-B1 prob çalışmalarına göre, CHP-126, IMR-32, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarında 1p delesyonu, CHP-126,KELLY, MHH-NB-11 ve SH-SY5Y hücre hatlarında 1q kazanımı, KELLY hücre hattında 11p delesyonu, KELLY ve CHP-126 hücre hatlarında 11q delesyonu saptanmıştır.

Tablo-5: P252-B1 Prob Çalışmaları ve Sonuçları

Genler	Krom.poz.	ACHP	APCHP	AIMR	APIMR	AKLY	APKLY	AMHH	APMHH	ASHY	ASMA	AP SMA
TMEM18	02p25.3	1,1	1,09	0,79	0,89	0,71	0,63	1,1	1,4	1,42	0,94	0,9
NAG	02p24.3	1,45	0,13	9,63	0,06	1,01	0,12	1,1	0,05	1,43	0,99	0,04
NAG	02p24.3	34,5	0,04	10,9	0,02	1,15	0,06	1,21	0	1,47	0,94	0,04
DDX1	02p24.3	55,8	0,11	13,6	0,06	1,83	0,07	1,15	0	1,32	6,06	0,05
DDX1	02p24.3	84,9	0,36	13,7	0,1	1,63	0,22	1,22	0,05	1,36	7,2	0,1
MYCN	02p24.3	114	0,08	17,6	0	28,7	0,11	11,9	0,04	1,41	9,31	0,01
MYCN	02p24.3	183	0	19	0	35,8	0	11,1	0	1,33	9,9	0
ALK	02p23.2	2,64	0,29	0,75	0	1,23	0,06	1,38	0	1,51	0,97	0,03
RTN4	02p16.1	3,22	1,44	0,95	0,71	0,95	0,63	1,34	0,87	1,03	0,98	0,98
DYSF	02p13.3	3,61	1,03	0,88	0,44	0,94	0,6	1,1	0,51	1,01	0,93	0,76
RPIA	02p11.2	1,85	1,68	0,64	0,9	0,53	0,59	1,17	1,21	0,93	0,81	1,01
SCN1A	02q24.3	1,71	1,36	0,65	0,86	0,78	0,86	1,19	1,3	0,95	1,03	0,98
CFLAR	02q33.1	1,3	1,25	0,76	0,97	0,81	0,77	1,24	1,38	1,04	0,87	0,69
CASP8	02q33.1	1,36	1,7	0,63	0,95	1	1,22	1,41	1,45	1,03	0,73	0,94
BMP2	02q33.1	18,4	1,97	3,25	1,19	1,04	1,43	1,2	1,53	0,97	0,96	0,94
BMP2	02q33.1	3,54	2,08	0,96	0,81	1,04	0,82	1,35	1,34	0,98	0,86	0,87
PAFAH1B1	17p13.3	1,28	1,22	0,82	0,97	1	0,97	0,94	0,95	1,04	0,67	0,68
TP53	17p13.1	4,28	1,01	1,16	0,66	1,3	1	0,9	0,54	0,98	0,92	0,62
TP53	17p13.1	0,91	1,08	0,86	1,2	0,91	1,14	0,87	1,16	0,99	0,61	0,63
TP53	17p13.1	1,8	0,79	0,52	0,35	0,51	0,58	0,52	0,35	1,02	0,42	0,39
WSB1	17q11.1	1,86	1,22	0,7	0,75	0,95	0,82	0,65	0,64	0,97	0,7	0,67
WSB1	17q11.1	1,35	1,02	0,97	0,97	1,03	1,14	0,74	0,81	0,99	0,63	0,64
WSB1	17q11.1	2,81	0,69	0,54	0,65	1,08	0,65	0,87	0,42	0,9	0,61	0,5
NF1	17q11.2	1,31	1,06	0,77	0,74	0,78	1,02	0	0	0,95	0,64	0,82
NF1	17q11.2	1,1	1,35	0,82	1,27	0,86	1,23	0,02	0,12	1,07	0,69	0,81
ERBB2	17q12	1,11	0,99	0,89	1,11	0,83	1,06	0,85	0,91	1,05	1,09	1,04
TOP2A	17q21.2	26,5	1,42	4,96	0,99	1,03	1,28	0,87	0,9	1,04	2,35	1,36
SGCA	17q21.33	2,48	2,36	1,71	2,45	1,26	1,78	1,68	2,46	1,57	1,7	1,64
TOB1	17q21.33	5,26	2,4	1,71	1,56	1,79	1,49	1,4	1,08	1,46	1,83	1,67
RECQL5	17q25.1	2,36	2,2	1,55	2,02	1,38	1,55	1,49	1,82	1,6	1,65	1,56
BIRC5	17q25.3	5,52	2,18	1,44	1,36	2,21	1,28	1,4	1,2	1,48	1,42	1,42
SECTM1	17q25.3	5,41	3	2,63	1,65	14,5	1,37	1,51	1,34	1,57	1,57	1,89
TBCD	17q25.3	2,09	2,15	1,52	2,07	1,27	1,48	1,59	2,13	1,49	1,59	1,54

P252-B1 prob çalışmalarına göre, CHP-126, IMR-32, MHH-NB-11, SIMA ve KELLY hücre hatlarında *MYCN* geni amplifikasyonu, CHP-126, IMR-32, MHH-NB-11, SIMA, KELLY ve SH-SY5Y hücre hatlarında 17q kazanımı, CHP-126 ve MHH-NB-11 hücre hatlarında 2q kazanımı saptanmıştır.

Tablo-6: P253-B1 Prob Çalışmaları ve Sonuçları

Genler	Krom.poz.	BCHP	BIMR	BKLY	BMHH	BSHY	BSMA
SPON2	04p16.3	1,02	1,32	0,46	1,42	1,05	1,12
WFS1	04p16.1	0,99	1,1	0,5	1,08	0,97	1,04
KCNIP4	04p15.31	1,05	0,96	1,18	1,13	0,99	0,91
OCIAD1	04p11	1,08	0,68	1,02	0,94	1,1	0,92
GNRHR	04q13.2	0,79	1,02	0,93	1,04	0,86	0,94
IL2	04q27	1,08	0,53	1,21	0,82	1,12	0,81
GLRB	04q32.1	1,04	0,62	0,9	0,91	0,96	0,93
KLKB1	04q35.2	0,89	0,62	0,98	0,73	1	0,96
GHRHR	07p15.1	1,23	0,74	1,93	1,13	1,63	1
EGFR	07p11.2	1	0,92	1,62	1,22	1,4	1,06
ELN	07q11.23	1,21	0,85	1,85	1,36	1,58	0,92
KRIT1	07q21.2	0,99	0,64	1,33	1,03	1,51	0,84
IMPDH1	07q32.1	1,82	1,4	1,71	1,64	1,37	1,3
SHH	07q36.3	1,48	1,18	1,11	1,5	1,3	1,04
PTPRD	09p24.1	0,84	1,05	0,81	1,08	0,92	1,02
PTPRD	09p24.1	1,05	0,52	1,05	0,67	1,06	0,9
CDKN2A	09p21.3	0,93	0,81	0,94	0,93	0,88	0,93
CDKN2A	09p21.3	0,92	0,96	1,1	0,86	0,8	0,94
DNAI1	09p13.3	1,39	0,72	1,37	0,75	1,14	1
TJP2	09q21.11	0,96	1,12	0,55	1,17	0,97	0,89
TGFBR1	09q22.33	1,06	0,72	0,67	0,92	1,07	0,98
POMT1	09q34.13	1,31	0,68	1,19	0,94	1,19	0,95
TSC1	09q34.2	1,29	0,63	1,25	0,89	1,21	1,07
ERC1	12p13.33	1,12	1,29	1,2	1,17	0,99	1,09
CDKN1B	12p13.1	1,05	1,07	1,23	0,82	0,92	1,02
PKP2	12p11.1	0,87	1,54	0,95	1,26	0,91	0,98
COL2A1	12q13.11	0,96	1,16	0,85	1,1	1	1,11
MDM2	12q15	1,07	0,89	0,97	0,83	0,97	0,93
TBX5	12q24.21	0,99	1,31	0,96	1,35	0,99	1,06
NFKBIA	14q13.2	1,28	1,03	1,02	1,41	1,17	1,05
SPG3A	14q22.1	0,83	1,48	1,05	1,27	0,91	0,96
TGFB3	14q24.3	0,96	1,32	0,98	1,3	0,95	1,13
MOAP1	14q32.12	1,16	0,72	1,24	0,94	1,06	0,96

P253-B1 prob çalışmalarına göre, CHP-126 hücre hattında 7q kazanımı, IMR-32 hücre hattında 4q ve 9q delesyonu ve 14 q kazanımı, KELLY hücre hattında 4p delesyonu, 7p ve 7q kazanımı, 9q delesyonu, MHH-NB-11 hücre hattında 7q ve 14 q kazanımı, SH-SY5Y hücre hattında 7p ve 7q kazanımı saptanmıştır.

4.2.1. Hücre Hatlarının MLPA Sonuçlarına Göre Gruplandırılması

MLPA sonuçlarına göre nöroblastomda tanımlı kromozomal aberasyonlar göz önüne alındığında ve gruplar arasındaki ekspresyon farkının ANOVA istatistiksel metodu ile analiz edilebilmesi için 4 grup oluşmuştur. **Grup1**; 1p delesyonu saptanan hücre hatları (CHP-126, IMR-32, MHH-NB-11, SIMA). **Grup2**; 1p delesyonu gözlenmeyen hücre hatları (KELLY, SH-SY5Y) **Grup3**; 11q delesyonu saptanan hücre hatları (KELLY, CHP-126). **Grup4**; 11q delesyonu gözlenmeyen hücre hatları (IMR-32, MHH-NB-11, SIMA, SH-SY5Y). Oluşturulan bu gruplar çerçevesinde Grup1 ile Grup2 ve Grup3 ile Grup4 arasındaki mikro RNA'ların ekspresyon farklılıkları analiz edilmiştir.

4.3. Hücre Hatlarının RNA Ölçüm Sonuçları

Çalışmanın miRNA dizin ve Real Time PCR basamaklarının gerçekleştirilebilmesi için hücre hatlarından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup, RNA izolasyonu yapılan örneklerin, RNA saflık ve konsantrasyon ölçümleri NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazında gerçekleştirildi. Her bir örnek için birbirini takip eden 3 ölçüm yapıldı ve ortalaması alınarak RNA miktarı ng/μl olarak belirlendi. RNA'nın saflığının belirlenmesinde 260/280 absorbans oranının 1.90-2.1 değerleri arasında olma kriteri dikkate alındı.

Tablo-7: Hücre Hatlarının Total RNA'larının Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

Çalışmanın Adı	Hücre Hattı	Abs260/280	Abs260/230	Konsantrasyon(ng/μl)
miRNA dizin	KELLY-P4	2.06	1.25	1204.2
	SIMA-P4	2.05	2.05	1260.1
	CHP-126 –P3	2.02	1.33	363.2
	IMR-32 –P4	2.01	1.01	1122.4
	MHH-NB-11 –P3	2.04	2.18	649.4
	SH-SY5Y –P5	2.03	2.08	836.4
Real Time PCR-1	KELLY-P6	2.03	1.82	1331.6
	SIMA-P6	2.05	2.01	1262.8
	CHP-126 –P5	2.02	1.76	371.1
	IMR-32 –P6	2.03	1.68	1523
	MHH-NB-11 –P4	2.05	2.10	610.9
	SH-SY5Y –P7	2.03	1.98	741.2
Real Time PCR-2	KELLY-P7	2.02	1.78	1078.4
	SIMA-P5	2.01	2.03	1167
	CHP-126 –P4	2.03	1.83	380.2
	IMR-32 –P7	2.05	1.71	980.4
	MHH-NB-11 –P4	2.03	2.08	630
	SH-SY5Y –P7	2.02	2.01	765.8

4.4. miRNA Mikro-dizin Sonuçları

MLPA sonuçlarına göre nöroblastomda tanımlı kromozomal aberasyonlar açısından oluşturulan dört grup üzerinden yapılan mikro-dizin analiz sonuçlarına göre; Grup3 (11q delesyonu saptanan hücre hatları) ve Grup4 (11q delesyonu gözlenmeyen hücre hatları) arasında ANOVA analizi ve FDR sonuçlarına göre ekspresyonel düzeyde değişim gözlenen miRNA saptanmamıştır. Buna karşılık, Grup1'de (1p delesyonu saptanan hücre hatları) Grup2'ye göre (1p delesyonu gözlenmeyen hücre hatları) ANOVA analizi ve FDR sonuçlarına göre ekspresyonel düzeydeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu 33 miRNA saptanmıştır. Saptanan miRNA'lar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo-8: Grup2'ye Göre Grup1'de İstatistiksel Olarak Anlamlı Artış Saptanan miRNA'lar

miRNA	1p del(+) / 1p del(-)	FDR	P Değeri	Kromozom lokasyonu
hsa-miR-127-3p	157.92	0,02	7,00E-05	14q32.2
hsa-miR-337-5p	152.31	0,02	1,00E-04	14q32.2
hsa-miR-377	149.38	0,02	1,30E-04	14q32.31
hsa-miR-376c	72.21	0,02	2,00E-04	14q32.31
hsa-miR-379	119.72	0,02	1,60E-04	14q32.31
hsa-miR-154	71.64	0,02	2,10E-04	14q32.31
hsa-miR-329	80.35	0,02	2,10E-04	14q32.31
hsa-miR-487b	103.37	0,02	3,30E-04	14q32.31
hsa-miR-376a	90.59	0,02	5,60E-04	14q32.31
hsa-miR-410	75.80	0,02	6,40E-04	14q32.31
hsa-miR-381	119.74	0,02	3,20E-04	14q32.31
hsa-miR-299-3p	67.78	0,02	3,60E-04	14q32.31
hsa-miR-411	72.70	0,02	2,90E-04	14q32.31
hsa-miR-382	50.84	0,02	4,40E-04	14q32.31
hsa-miR-323-3p	55.61	0,02	6,30E-04	14q32.31
hsa-miR-409-3p	45.10	0,02	6,60E-04	14q32.31
hsa-miR-299-5p	54.60	0,02	4,70E-04	14q32.31
hsa-miR-495	48.66	0,02	4,60E-04	14q32.31
hsa-miR-654-3p	51.11	0,02	6,40E-04	14q32.31
hsa-miR-134	30.08	0,02	6,50E-04	14q32.31
hsa-miR-758	44.41	0,02	4,10E-04	14q32.31
hsa-miR-411*	46.35	0,02	6,10E-04	14q32.31
hsa-miR-543	35.01	0,02	4,70E-04	14q32.31
hsa-miR-370	41.97	0,03	8,90E-04	14q32.2
hsa-miR-539	47.16	0,03	8,90E-04	14q32.31
hsa-miR-493*	29.22	0,03	9,80E-04	14q32.2
hsa-miR-433	46.84	0,03	9,50E-04	14q32.2
hsa-miR-376b	66.97	0,03	1,13E-03	14q32.31
hsa-miR-127-5p	21.88	0,03	1,23E-03	14q32.2
hsa-miR-494	33.03	0,03	1,20E-03	14q32.31
hsa-miR-493	23,03	0,03	1,35E-03	14q32.2
hsa-miR-379*	29.81	0,04	1,43E-03	14q32.31
hsa-miR-409-5p	25.90	0,04	1,65E-03	14q32.31

4.5. miRNA'ların Saptanan Hedef Genleri

miRNA dizin çalışması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyonu artmış miRNA'ların, Tablo-1'de verilen nöral krest hücrelerinin farklılaşmasında rol alan genleri hedef alıp almadıkları <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/?sec=databases> ve <http://www.microrna.org> web tabanlı yazılımlar kullanılarak belirlenmiş olup, sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo-9: Diana microT 4.0 ve miRanda web Tabanlı Yazılımı ile Saptanan Hedef Genler

miRNA	Diana microT 4.0	Precision Score*	miRanda	mirSVR Score **
hsa-miR-127-3p				
hsa-miR-337-5p				
hsa-miR-377				
hsa-miR-376c	<i>NTRK3</i>	0.3		
hsa-miR-379				
hsa-miR-154				
	<i>BMPR2</i>	0.3	<i>BMPR2</i>	-0.1220
hsa-miR-329	<i>GDNF</i>	0.3	<i>DPYSL3</i>	-0.2085
	<i>DPYSL3</i>	0.3		
	<i>MAPT</i>	0.3		
hsa-miR-487b				
hsa-miR-376a	<i>BMPR2</i>	0.1	<i>BMPR2</i>	-0.6400
	<i>MAPT</i>	0.1		
	<i>BMP2</i>	0.7	<i>BMPR2</i>	-0.1183
	<i>BMPR1A</i>	0.5	<i>BMP2</i>	-0.3548
	<i>BMPR2</i>	0.9	<i>NTF3</i>	-0.9408
	<i>NTRK1</i>	0.6	<i>NTRK1</i>	-0.1011
hsa-miR-410	<i>NTRK3</i>	0.8	<i>GATA3</i>	-0.1257
	<i>NTF3</i>	0.7	<i>ZFPM2</i>	
	<i>GATA3</i>	0.7		
	<i>ZFPM2</i>	0.8		
	<i>BMPR2</i>	0.9	<i>GATA3</i>	-0.3857
hsa-miR-381	<i>NTRK3</i>	0.8	<i>MTSS1</i>	-1.2795
	<i>GATA3</i>	0.7		
	<i>ZFPM2</i>	0.9		
	<i>MTSS1</i>	0.8		
hsa-miR-299-3p				
hsa-miR-411				
hsa-miR-382	<i>BMPR2</i>	0.3		
hsa-miR-323-3p	<i>ZFPM2</i>	0.7		
hsa-miR-409-3p				

Tablo 9'un devamı

hsa-miR-299-5p	<i>NTRK3</i>	0.4		
	<i>DPYSL3</i>	0.4		
hsa-miR-495	<i>BMPR2</i>	0.9	<i>BMPR2</i>	-0.0732
	<i>NTRK3</i>	0.9	<i>GATA3</i>	-0.9391
	<i>GATA3</i>	0.8	<i>RARA</i>	-0.3016
	<i>RARA</i>	0.8	<i>PTN</i>	-0.0215
	<i>PTN</i>	0.7	<i>NRCAM</i>	-0.3307
	<i>NRCAM</i>	0.7	<i>MTSS1</i>	-0.4952
	<i>DPYSL3</i>	0.8		
	<i>MTSS1</i>	0.8		
hsa-miR-134	<i>ZFPM2</i>	0.0		
hsa-miR-654-3p	<i>BMP2</i>	0.0		
	<i>BMPR2</i>	0.0		
	<i>GNDF</i>	0.0		
hsa-miR-758				
hsa-miR-411*	<i>GNDF</i>	0.2		
	<i>MTSS1</i>	0.0		
hsa-miR-543	<i>BMP2</i>	0.6	<i>BMP2</i>	-0.7167
	<i>BMP4</i>	0.7	<i>BMP4</i>	-0.0951
	<i>BMPR2</i>	0.7	<i>BMPR2</i>	-0.002
	<i>GNDF</i>	0.6	<i>PHOX2B</i>	-1.0544
	<i>PHOX2B</i>	0.7	<i>NTF3</i>	-0.5648
	<i>NTRK3</i>	0.5	<i>NRCAM</i>	-1.1851
	<i>NTF3</i>	0.7		
	<i>NRCAM</i>	0.7		
hsa-miR-370	<i>NTRK3</i>	0.1	<i>MTSS1</i>	-0.2254
	<i>DPYSL3</i>	0.1		
	<i>MTSS1</i>	0.1		
hsa-miR-539	<i>BMP2</i>	0.3	<i>BMP2</i>	-0.8289
	<i>GNDF</i>	0.3	<i>ZFPM2</i>	-1.3339
	<i>ZFPM2</i>	0.3	<i>NRCAM</i>	-1.1693
	<i>NRCAM</i>	0.3		
	<i>DPYSL3</i>	0.3		
	<i>MTSS1</i>	0.3		
hsa-miR-493*	<i>BMPR1A</i>	0.4		
	<i>NTRK3</i>	0.7		
	<i>GATA3</i>	0.5		
	<i>MTSS1</i>	0.6		
hsa-miR-433	<i>BMPR2</i>	0.1	<i>DPYSL3</i>	-0.6040
	<i>DPYSL3</i>	0.1		
	<i>MAPT</i>	0.1		
hsa-miR-376b	<i>MAPT</i>	0.2		
hsa-miR-127-5p				
hsa-miR-494	<i>BMPR2</i>	0.6	<i>BMPR2</i>	-0.2105
	<i>GNDF</i>	0.5	<i>PHOX2B</i>	-1.2349
	<i>PHOX2B</i>	0.6	<i>ZFPM2</i>	-0.8845
	<i>ZFPM2</i>	0.5		
hsa-miR-493				

Tablo 9'un devamı

hsa-miR-379*	<i>BMPR2</i>	0.0
	<i>GDNF</i>	0.2
hsa-miR-409-5p	<i>BMPR2</i>	0.7

* Diana microT 4.0 yazılımından elde edilmiş olup, *Precision* skoru 0.0-1.0 arasındadır ve 1.0 değerine doğru kesinlik artmaktadır.

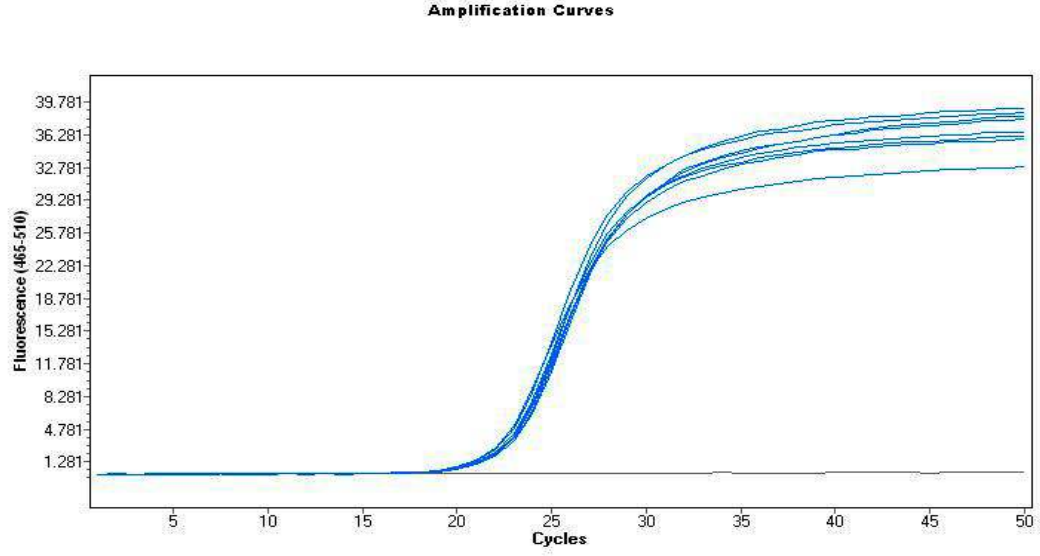
** miRanda yazılımından elde edilmiş olup, mirSVR skorunun ≥ -0.10 olması önerilmektedir [124].

4.6. miRNA'ların Seçimi

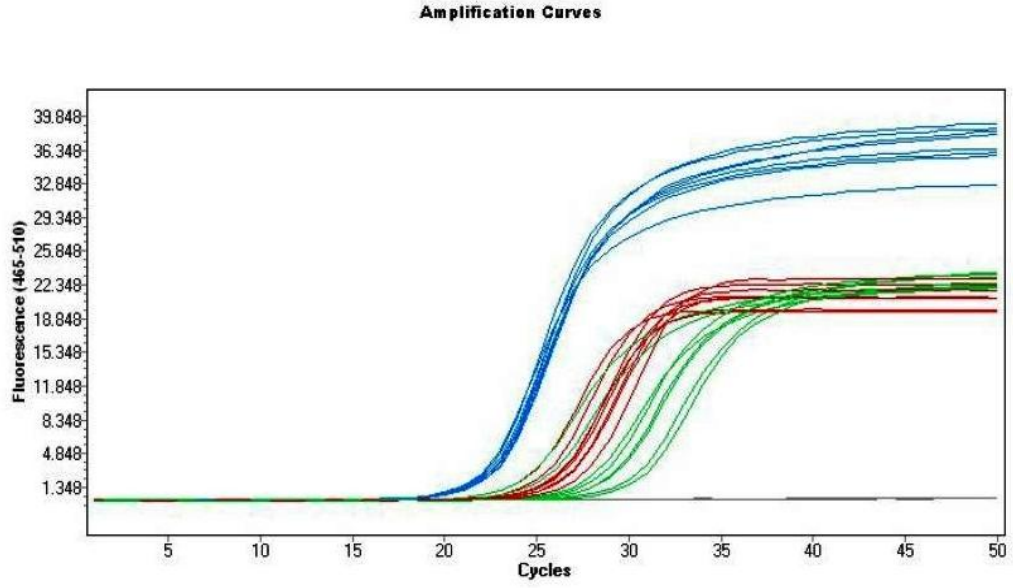
miRNA dizin çalışmasında istatistiksel olarak ekspresyon artışı saptanan ve nöral krest hücrelerinin farklılaşmasında rol alan genlerden birden fazlasını, hem <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/?sec=databases> hem de <http://www.microrna.org> web tabanlı yazılımları ile hedef alan miRNA'lar gerçek zamanlı PCR reaksiyonu için seçilmiştir. Buna göre seçilen miRNA'lar; hsa-miR-410, hsa-miR-494, hsa-miR-495 ve hsa-miR-543'dür.

4.6.1. Seçilen miRNA'ların Real Time PCR sonuçları

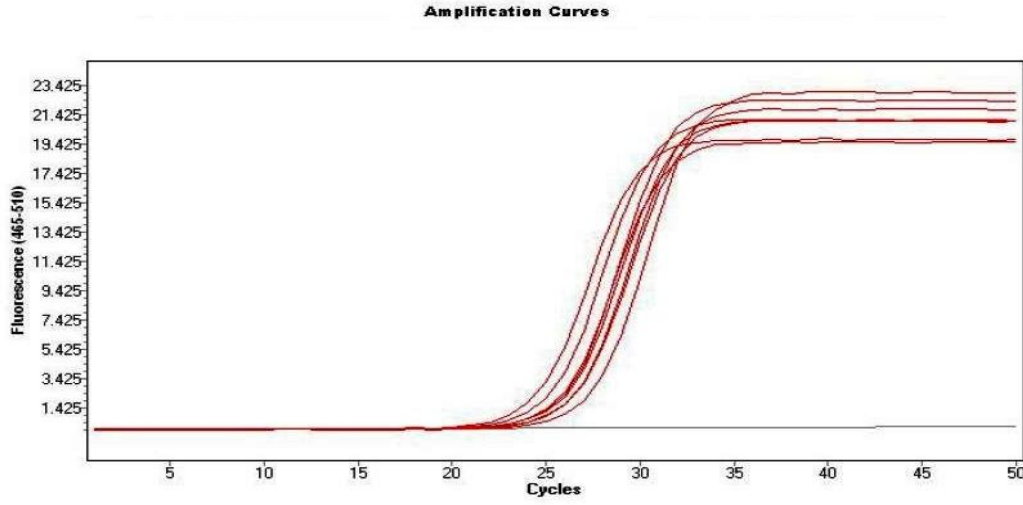
Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu aracılığıyla, seçilen miRNA'lara özgü primerler ile miRNA'ların ekspresyonlarının belirlenmesinden önce, çalışmanın birinci aşamasından elde edilen veride; tek sarmal cDNA sentezinin gerçekleştiği ve snord48 primerlerinin çalıştığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmanın kalite ve kontrolü firmanın kit içerisinde göndermiş olduğu sentetik bir RNA olan RNA spike-in ile yapılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen veriler aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibidir.



Şekil-6: RNA spike-in'den Elde Edilen Amplifikasyon eğrisi.



Şekil-7: RNA spike-in ve Hücre Hatlarına Ait Amplifikasyon Eğrisi



Şekil-8: Snord 48'e Ait Amplifikasyon Eğrisi

Seçilen her bir miRNA için gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR reaksiyonu *triplicate* olarak yapılmıştır. Her reaksiyon sonunda miRNA'lara özgü Ct değerleri, snord48'in Ct değerleri ile normalize edilmiştir. Çalışmada 1p delesyonu olmayan hücre hatları (KELLY, SH-SY5Y) G1, 1p delesyonu olan hücre hatları ise (SIMA, CHP-126, IMR-32, MHH-NB-11) G2 olarak gruplandırılmıştır. Her bir grubun ekspresyon değeri, gruptaki hücre hatlarının her bir miRNA için normalize edilmiş değerlerinin geometrik ortalaması alınarak bulunmuştur. Her bir gruba ait miRNA'nın ekspresyon değeri saptandıktan sonra, grupların oranlanması ile gruplar arasındaki ekspresyon değişimi saptanmıştır. Yapılan üç çalışmaya ait veriler aşağıdaki tablolarda sunulmuştur.

1.Çalışma:

Tablo-10: Birinci Gerçek Zamanlı PCR Çalışması ile Seçilmiş miRNA'ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Değişimi

	Hücre Hattı	miRNA Ct	Snord48 Ct	Normalize edilmiş değer	Grupların ekspresyon değeri	Grup2/Grup1
hsa-miR-543	SIMA	26,03	24,85	0,4413	0,1396	49,85
	CHP-126	30,06	27,30	0,1476		
	IMR-32	31,24	26,15	2,93E-02	2,80E-03	
	MHH-NB-11	28,02	25,69	0,1989		
	SH-SY5Y	35,88	26,75	1,78E-03		
	KELLY	33,95	26,12	4,39E-03		
hsa-miR-495	SIMA	25,59	24,85	0,598	0,1276	45,51
	CHP-126	30,69	27,30	9,53E-02		
	IMR-32	31,76	26,15	2,05E-02	2,79E-03	
	MHH-NB-11	27,83	25,69	0,2269		
	SH-SY5Y	36,16	26,75	1,47E-03		
	KELLY	33,68	26,12	5,29E-03		
hsa-miR-494	SIMA	31,81	24,85	8,03214E-03	1,475E-03	44,22
	CHP-126	36,22	27,30	2,0645E-03		
	IMR-32	40,00	26,15	6,773E-05	3,3352E-05	
	MHH-NB-11	33,58	25,69	4,216E-03		
	SH-SY5Y	41,83	26,75	2,887E-05		
	KELLY	40,81	26,12	3,7833E-05		
hsa-miR-410	SIMA	29,77	24,85	3,30E-02	3,76E-03	-
	CHP-126	35,98	27,30	2,44E-03		
	IMR-32	37,27	26,15	4,48E-04	-	
	MHH-NB-11	33,19	25,69	5,51E-03		
	SH-SY5Y	40,00	26,75	1,03E-04		
	KELLY	-	26,12	-		

2. ve 3. Çalışma:

Yapılan ilk çalışmada hsa-miR-410 için Kelly hücre hattından Ct değerinin elde edilememesi nedeniyle Tablo-7’de gösterildiği gibi farklı pasaj numaralarına sahip yeni hücre hatlarından ikinci ve üçüncü gerçek zamanlı PCR çalışması gerçekleştirildi. Çalışmada her bir miRNA için ayrı bir gerçek zamanlı PCR çalışması gerçekleştirilmiş olup sonuçlar aşağıdaki tablolarda sunulmuştur.

Tablo-11: ikinci Gerçek Zamanlı PCR çalışması ile Seçilmiş miRNA' ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Değişimi

	Hücre Hattı	miRNA Ct	Snord48 Ct	Normalize edilmiş değer	Grupların ekspresyon değeri	Grup2/Grup1
hsa-miR-543	SIMA	28,61	24,94	7,83E-02	4,5144E-02	33,68
	CHP-126	28,09	26,07	0,2457		
	IMR-32	33,13	25,55	5,24E-03		
	MHH-NB-11	29,43	24,83	4,12E-02		
	SH-SY5Y	38,98	25,51	8,89E-05	1,34E-03	
	KELLY	29,51	23,89	2,03E-02		
hsa-miR-495	SIMA	28,78	24,94	6,96E-02	8,0205E-02	56,04
	CHP-126	28,33	26,07	0,2092		
	IMR-32	30,74	23,89	8,71E-03		
	MHH-NB-11	27,93	26,32	0,3263		
	SH-SY5Y	35,83	25,52	7,88E-04	1,431E-03	
	KELLY	34,14	25,55	2,60E-03		
hsa-miR-494	SIMA	34,21	24,94	1,62E-03	9,77E-04	38,16
	CHP-126	33,85	26,07	4,54E-03		
	IMR-32	41,62	25,55	1,46E-05		
	MHH-NB-11	33,20	26,32	8,48E-03		
	SH-SY5Y	45,00	25,52	1,37E-06	2,56E-05	
	KELLY	35,86	24,83	4,80E-04		
hsa-miR-410	SIMA	32,46	26,32	1,41E-02	1,45E-03	-
	CHP-126	34,26	26,72	5,38E-03		
	IMR-32	45,00	27,84	6,84E-06		
	MHH-NB-11	31,79	24,94	8,67E-03		
	SH-SY5Y	36,04	23,89	2,21E-04	-	
	KELLY	-	25,55	-		

Tablo-12: Üçüncü Gerçek Zamanlı PCR çalışması ile Seçilmiş miRNA' ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Değişimi

	Hücre Hattı	miRNA Ct	Snord48 Ct	Normalize edilmiş değer	Grupların ekspresyon değeri	Grup2/Grup1
hsa-miR-543	SIMA	28,13	25,96	0,222221	5,701558E-02	27,04
	CHP-126	28,07	26,66	0,376312		
	IMR-32	34,95	26,59	3,044E-03		
	MHH-NB-11	30,45	25,86	4,1521E-02	2,107868E-03	
	SH-SY5Y	37,31	24,53	1,42E-04		
	KELLY	30,13	25,13	3,125E-02		
hsa-miR-495	SIMA	28,30	25,13	0,111105	0,108067	45,88
	CHP-126	28,45	26,66	0,289172		
	IMR-32	30,47	24,53	1,62E-02		
	MHH-NB-11	27,90	25,96	0,260616	2,355E-03	
	SH-SY5Y	35,59	25,88	1,19E-03		
	KELLY	33,61	25,86	4,64E-03		
hsa-miR-494	SIMA	33,68	25,13	2,67E-03	1,32252E-03	31,39
	CHP-126	33,56	26,66	8,37E-03		
	IMR-32	41,03	25,86	2,71E-05		
	MHH-NB-11	33,59	25,96	5,04E-03	4,21239E-05	
	SH-SY5Y	45,00	24,53	6,89E-07		
	KELLY	35,19	26,59	2,57E-03		

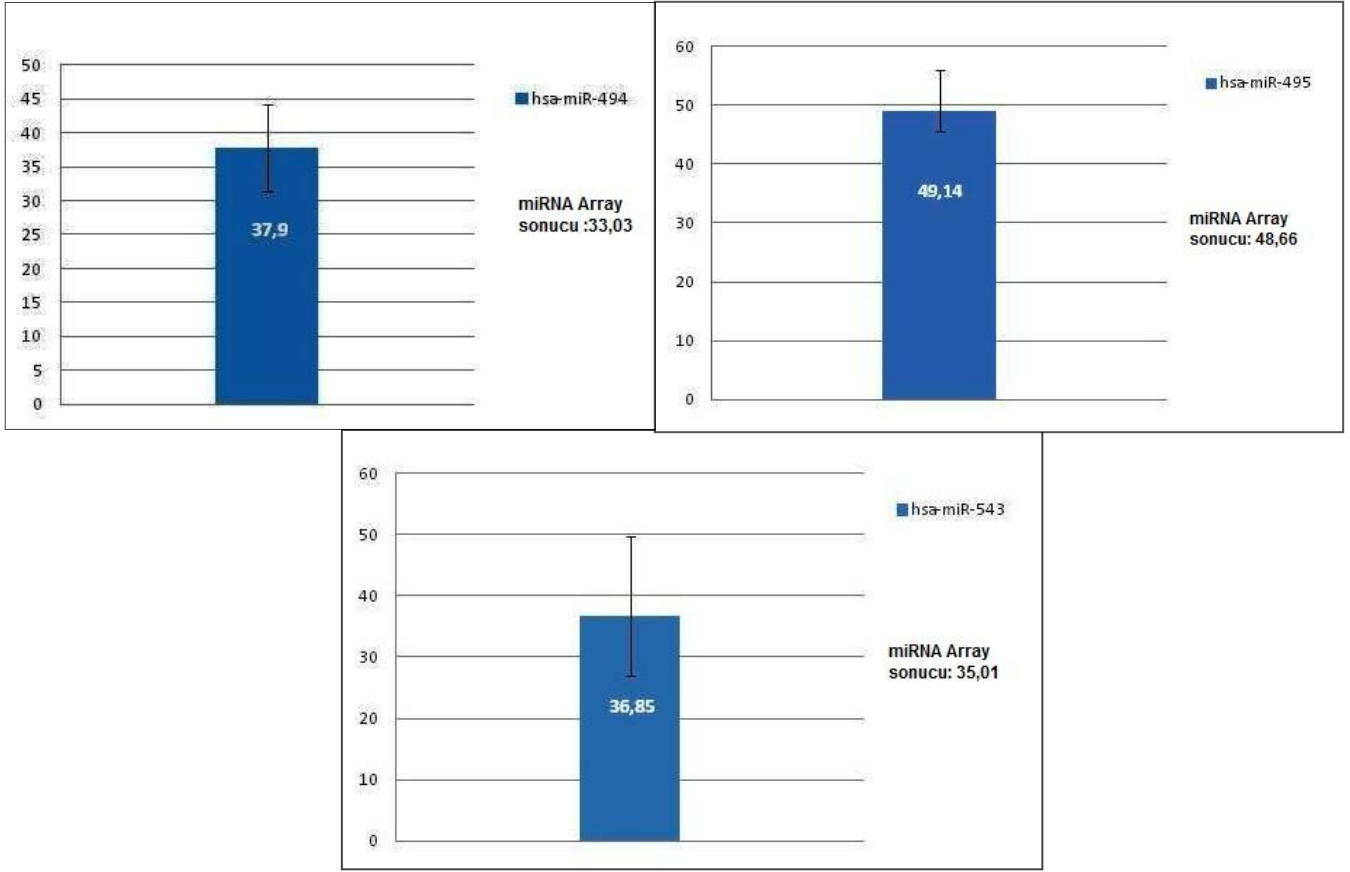
4.6.2. Seçilen miRNA’ların Gruplar Arasındaki Ekspresyon Farklılıkları
Açısından Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları ile miRNA dizin Sonuçlarının
Karşılaştırılması

Her bir gruba ait miRNA’nın ekspresyon değerleri saptandıktan sonra grupların oranlanması ile gruplar arasındaki ekspresyon değişimi saptanmıştır. Bu değerlerin miRNA dizin çalışması ile karşılaştırılması aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo-13: Seçilen miRNA’lar için Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları ile miRNA dizin Sonuçlarının Karşılaştırılması

Seçilen miRNA’lar	Gerçek zamanlı PCR (Grup-2/Grup-1)			miRNA Dizin (Ekspresyon Değişimi)
	1.çalışma	2.çalışma	3.çalışma	
hsa-miR-494	44,22	38,16	31,39	33,03
hsa-miR-495	45,51	56,04	45,88	48,66
hsa-miR-543	49,85	33,68	27,04	35,01

Her bir miRNA için gerçekleştirilen üç gerçek zamanlı PCR çalışmasından elde edilen ekspresyon değişimi oranlarının ortalamasının, miRNA dizin çalışmasından elde edilen ekspresyon değişim oranına yakın olduğu aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil-9: Gerçek zamanlı PCR çalışmasından elde edilen ekspresyon değişimi oranlarının ortalaması ile miRNA dizin çalışmasının sonuçlarının karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Nöroblastom (NB), diğer solid tümörler de gözlenebilen, kromozom düzeyindeki kazanım, kayıp veya yeniden düzenlemeler gibi kendini gösteren genetik aberasyonlarla karakterize bir tümör olmasına rağmen, diğer kanser türlerinde mutasyona uğradığı bilinen ve proliferasyon, apoptoz ve DNA onarım mekanizmaları gibi karsinogenez sürecinde önemli rolleri olduğu bilinen genlerin mutasyonları NB tümör hücrelerinde saptanmamıştır [5]. Hali hazırda NB patogenezinde nedensel bir role sahip olduğu bilinen tek gen, primer NB olgularının yaklaşık % 18-20'sinde amplifikasyonu saptanan MYCN onkogenidir [43].

NB'da genellikle hastalığın histolojik olarak farklılaşma sürecini tamamlamamış olmasıyla ve MYCN amplifikasyonu ile birlikte, 1p kromozom kolunun farklı bölgelerindeki heterozigosite kayıpları (LOH) çeşitli çalışmalarda gösterilmekle birlikte, 1p bölgesindeki en küçük ortak delesyon alanında günümüze kadar yapılan çalışmalarda, bu bölgede yerleşim gösteren ve Knudson "çift vuruş" hipoteziyle uyumlu bir tümör baskılayıcı gen bulunamamıştır [18,20,39,40,125-134].

Bir no'lu kromozomun NB patogenezinde rolünü araştırmak için, Bader ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 11 ve 17. kromozomların normal olduğu fare mikrohücre hibrid NB hücre hatlarına, t(X;1q) ve t (X;1p) kromozomlarının transfer edilmesi neticesinde, kromozom t(X;1q)'nun aktarıldığı NB hücre hattında herhangi bir değişimin gözlenmediği, t (X;1p) kromozomunun aktarıldığı NB hücre hattında ise, hücrelerin morfolojik olarak değişimin gözlemlendiği ve nöronal farklılaşmanın indüklendiği gözlenmiştir [30]. Bu durum kromozom 1p'nin NB'un farklılaşma sürecinde etkili olabileceğini göstermektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da kromozom 1p kaybı olan hücre hatlarında, 1p delesyonu olmayan hücre hatlarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış sağlayan miRNA'ların NB'un oluşumunda etkisi olduğu düşünülen, farklılaşma sürecinde rol alan genleri hedef aldığı saptanmıştır.

NB, nöral krest hücrelerinden köken almaktadır ve bu hücreler bir takım spesifik genler aracılığı ile nihai karakterlerini alabilecekleri hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler. Bu genlerin ifadelerinde meydana gelebilecek değişiklikler NB'un ortaya çıkışıyla sonuçlanabileceği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [65,135-137]. NB'da gözlenen kromozomal delesyon bölgelerindeki aday tümör baskılayıcı genlerde günümüze

kadar yapılan çalışmalarda mutasyon saptanmaması üzerine, son yıllarda epigenetik çalışmalara ağırlık verilmesine neden olmuştur. Bu amaçla, 22 nöroblastom hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada 1p36 bölgesinde yer alan 23 aday tümör baskılayıcı genin promotör bölgesinde herhangi bir metilasyon saptanmamıştır [138, 139].

Yaptığımız literatür çalışmasında, nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinde rol alan ve çalışmamıza konu olan 21 genden *PHOX2B* geni hariç hiçbir genin promotör bölgelerinin hipermetile olarak susturulduğuna dair çalışma bulunmamaktadır. L.pontual ve arkadaşlarının 13 NB hücre hattı ve 45 tümör üzerinde yapmış oldukları çalışmada *PHOX2B* geninin promotör bölgesinin metilasyona uğradığı rapor edilmiştir [140] . Buna ilaveten çalışmamıza konu olan genlerden yine *PHOX2B* geni hariç hiçbir genin NB da mutasyonları rapor edilmemiştir. Yapılan çalışmalarda ailesel NB olgularında *PHOX2B* geninin mutasyonu gösterilmekle birlikte, günümüze kadar yapılan çalışmalarda sporadik NB olgularında *PHOX2B* gen mutasyonlarının düşük oranda gözleendiği ortaya konulmuştur [60,78-82]. Ayrıca *PHOX2B* geninin yerleşim gösterdiği 4 no'lu kromozomun kısa kolunda, allelik kayıplar (LOH) ve delesyonlar da bildirilmiştir [44, 141-144]. Bu durum, NB patogeneğinde *MYCN* geni dışında nedensel bir role sahip olabilecek gen ya da genlerin diğeri bir epigenetik düzenleme mekanizması olan miRNA'larla kontrol edilebileceğini düşündürmektedir.

Welch ve arkadaşlarının primer NB tümörleri ve hücre hatları üzerinde yapmış oldukları çalışmada 1p36.23 bölgesinde lokalize olan hsa-mir-34a'nın klinik seyri kötü örneklerde ekspresyonunun daha düşük olduğu ve p53 aktivasyonu üzerinden apoptoza ve hücre siklusunun durdurulmasına katkıda bulunduğu ve NB 'un tümöröenez sürecinde baskılayıcı bir rol oynayabileceği ileri sürölmüştür. Aynı zamanda p53'ün indüklenmiş olduğu ve mir34a'nın ise baskılandığı çalışmalarda hücre ölümlünün azaldığı saptanmıştır [110]. Buna ilaveten 70 primer tümör örneği üzerinde yapılan bir çalışmada miR-542-5p ve miR-628'in klinik seyri iyi NB olgularında eksprese edilirken, *unfavorable* NB olgularında eksprese edilmediği saptanmıştır. Aynı zamanda miR-542-5p'nin NB hücrelerinin invaziv potansiyelini azalttığı rapor edilmiştir [105].Diğeri yandan *MYCN* amplifikasyonu olan ve olmayan hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada mir17-92 grubunu da içeren bazı miRNA'ların *MYCN* yoluyla indüklendiği ve *MYCN* amplifiye örneklerde işlevinin arttığı gözlenmiştir [102]. Yapılan bir diğeri çalışmada ise mir17-92 grubunun NB da işlevinin artışıyla TGF-beta sinyal yolağının durdurulmasıyla ve bunun sonucu olarak apoptozun engellenmesiyle korele olduğu rapor edilmiştir [108]. *MYCN* geninin hücre çoğalmasını

baskılayan bazı miRNA'ların işlevini engelleyerek, anti-apoptotik bir işlev gösterdiği de saptanmıştır. Bununla birlikte *MYCN*'nin bazı miRNA'ların ifadesini etkilediği gibi, bazı miRNA'larında *MYCN* geninin translasyon sürecini baskılayabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda miR-10a, miR-10b, let-7 ve miR-101'in *MYCN* genini hedef alarak *MYCN* amplifiye NB hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı rapor edilmiştir [145, 146]. Son zamanlarda yapılan diğer çalışmalarda, miR-92'nin, çoğunlukla E-kaderinlerin degrede edilmesiyle metastatik süreci indükleyen Wnt sinyal yolağını baskılayarak tümör baskılayıcı rol üstelenen *DKK3* geninin işlevini ortadan kaldırdığı bulunmuştur [147, 148]. Zhang ve arkadaşlarının 42 NB tümörü üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada miR-9'un matriks metalloproteinaz 14'ü hedef aldığı ve bu yolla, NB hücrelerinin anjiogenezini, metastazını ve invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir [149].

Yakın geçmişte 227 primer NB tümör üzerinde yapılan bir diğer çalışmada miR-487b ve miR-410'un NB un yüksek riskli grubunda, düşük riskli grubuna göre daha düşük düzeyde eksprese olduğu saptanmıştır [150]. Altı NB hücre hattı üzerinde bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise, miR-487b ve miR-410'un 1p delesyonu olan hücre hatlarında, 1p delesyonu olmayanlara göre yüksek düzeyde eksprese olduğunu saptadık. Bu durum, hücre hatlarının klonal bir seçiminden kaynaklanabilir, ayrıca yapılmış olan diğer araştırma, salt tümör örnekleri üzerinde yapılmış olup hücre hattı üzerinde bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmada risk grubu değerlendirilmesine göre bir sınıflandırma yapılmıştır. Risk grubu sınıflaması; yaş, *MYCN* amplifikasyonu ve evre durumuna göre yapılmış olup, 1p ve 11q delesyonu gibi diğer genetik parametreler göz ardı edilmiştir. Bunlara ilaveten, yapmış olduğumuz çalışmada bahsedilen çalışmanın aksine ekspresyon artışı saptadığımız miR-487b'nin farklılaşma sürecinde rol alan genlerden hiçbirisini hedef almadığı ve ayrıca miR-410'daki ekspresyon artışının gerçek zamanlı PCR çalışması ile doğrulanamadığı görülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmada NB un yüksek riskli grubunda, düşük riskli grubuna göre, miR-494'ün ekspresyon artışı saptanmış olup, bizim çalışmamızda da miR-494'ün ekspresyon artışı doğrulanmış olup, farklılaşma sürecinde rol alan genleri hedef aldığı gösterilmiştir. Buna ilaveten yapılan çalışmada, kromozom 14q32 lokusunda yer alan yüksek riskli olan grupta miR-487b ve miR-410'un düşük ekspresyonu belirtilmiş olmasına karşılık, diğer araştırmalarda kromozom 14q23-q32 ve D14S588 - 14q telomer kaybının *MYCN* amplifikasyonu ile ters korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir [151]. Bu durum yapmış olduğumuz çalışma ile uyumluluk göstermektedir, ekspresyon artışı saptadığımız miRNA'lar

kromozom 14q32 bölgesinde lokalize olup, ekspresyon artışı saptadığımız gruptaki IMR-32 hücre hattında kromozom 14q kazanımı saptanmıştır.

Araştırmacılar tarafından insan miRNA'larının %50 den fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde ve kırılma noktalarına yakın bölgelerde lokalize olduğu gösterilmiştir [152]. Çalışmamızda saptamış olduğumuz miRNA'larında, NB'da kromozom 14q kaybının kırılma noktası olan 14q23-q32 bölgesine yakın yerde (14q32.2 ve 14q32.31) lokalize olduğu gösterilmiştir. NB özelinde, oligonükleotit dizin CGH ve miRNA ekspresyon profili analizleri birlikte değerlendirildiğinde, NB tümörlerinde geniş ölçüde kromozomal imbalans görülen 3p, 11q ve 14 q kaybının ve 1q ve 17q kazanımının, miRNA ekspresyon bölgeleriyle yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir [106, 145, 150, 153-158].

Çalışmamızda ekspresyon artışı saptadığımız miR-543 üzerinde yapılan farklı bir çalışmada, miRNA ekspresyon profilleri açısından, dört meme kanseri hücre hattının farklılaşmış üç meme kanseri olgusuyla karşılaştırılmasında, miR-543'ün farklılaşmış meme kanseri olgularında ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır [159]. Bu durum miRNA'ların farklı kanser türlerinde farklı görevler üstlenebileceğini göstermektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda, miR17-92 grubunda yer alan, miR-17-5p'nin çeşitli kanser türlerinde pro-onkojenik bir özellik gösterirken, E2F1 onkojenini hedef almasıyla da tümör baskılayıcı bir rol üstlenebildiği de rapor edilmiştir [160-164].

Çocuklarda en sık görülen malign beyin tümörü olan medullablastom (MB) üzerinde yapılan çalışmalarda primer MB tümörleri ve hücre hatları ile nöral kök hücrelerinin miRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılmasında, çalışmamızda da ekspresyon artışları doğrulanan miR-494 ve miR-495'in ekspresyonunun MB tümörlerinde ve hücre hatlarında anlamlı olarak artış gösterdiği rapor edilmiştir [165]. Buna ilaveten meme kanseri kök hücrelerinde yapılan çalışmada da miR-495'in ekspresyonunun arttığı ve E-kaderin ekspresyonunu direkt olarak baskılayarak onkojenik sürecin gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [166].

Nöral krest hücrelerinin farklılaşma basamaklarında rol alan genlerin NB ile ilişkisi gerek spesifik gen düzeyinde yapılan çalışmalarla gerekse klinik açıdan farklı özelliklere sahip geniş ölçekli NB tümörlerinin gen ekspresyonu analizlerinin karşılaştırılması ile ortaya konulmuştur. Fare NB hücreleri (Neuro2a) üzerinde yapılan bir çalışmada kültüre edilmiş Neuro2a hücrelerinin, kemik morfojenik protein-2 (BMP2) ile muamele edilmesiyle, NB hücrelerinin nöronal fenotipe doğru farklılaştığı gözlenmiştir [167]. Yapılan diğer

Çalışmalarda da özellikle sinir sistemi gelişimi aşamasında eksprese olan *BMP2* ve *BMP4*'n nöronal farklılaşmanın başlaması için gerekli olduğu ve hücre farklılaşmasının ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır [168-170]. DePreter ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise *BMP4*'n normal adrenal korteks hücrelerinde, düşük ve yüksek evreli NB olgularına göre daha yüksek düzeyde eksprese olduğu saptanmıştır [171]. Yapmış olduğumuz çalışmada ise, *BMP2* ve onun reseptörü olan *BMPR2*'nin her iki *web* tabanlı yazılım ile doğrulanıp en çok hedef alınan genler olduğu görülmektedir. Bu genleri hedef alan miRNA'lar arasında ekspresyon artışını doğruladığımız miR-543, miR-495 ve miR-494'de bulunmaktadır. Aynı zamanda nöronal farklılaşmada rolü olan diğer bir protein olan BMP4'nde miR-543 tarafından hedef alındığını saptadık. Bu sonuçlar; 1p delesyonu olan hücre hatlarında ekspresyon artışını doğruladığımız miRNA'ların nöronal farklılaşma sürecindeki genleri hedef alması sonucunun, kromozom 1p'nin NB hücrelerinin farklılaşması için gerekli olduğunu saptayan Bader ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyumlu olduğu görülmektedir.

Birer transkripsiyon faktörü olan *PHOX2A* ve *PHOX2B* genlerinin nöral krest hücrelerinin kromaffin hücrelerine farklılaşmasında rol aldıkları gösterilmiştir [172] . Yapılan diğer bir çalışmada ise *PHOX2B* mutant farelerde periferel sinir sisteminin farklılaşmasında major defektlerin ortaya çıktığı gösterilmiştir [173]. Bununla birlikte araştırmacılar düşük evre NB olgularında, yüksek evre NB olgularına göre *PHOX2A* ve *PHOX2B*'nin daha yüksek düzeyde eksprese olduğunu rapor etmişlerdir [171]. Bizim alışmamızda ise; *PHOX2A*'yı hedef alan miRNA saptanmamış olmakla birlikte, miR-543 ve miR-494'n her iki *web* tabanlı yazılımda *PHOX2B* yi hedef aldığı ve ekspresyon artışlarının doğrulandığı gösterilmiştir.

Çalışmalarda nöroblast hücrelerinin stromal çevresinde bulunan Schwann hücrelerinin, beyin büyüme faktörü (NGF) ve nörotrofin-3(NTF3) gibi nörotrofinlerin kaynağı olduğu ve bu komponentlerin Trk tirozin kinaz reseptörleri olan TrkA, TrkB ve TrkC'ye bağlanarak NB tümörlerinde hücresel farklılaşmayla ilişkili olduğu saptanmıştır [174,175]. Ayrıca araştırmacılar TrkC ve TrkA'nın düşük evre NB olgularında, yüksek evre NB olgularına göre daha yüksek düzeyde eksprese olduklarını, NGF'in ise yüksek evre NB olgularında daha yüksek düzeyde eksprese olduklarını rapor etmişlerdir [171]. Yapmış olduğumuz çalışmada *NTF3* ve *TrkA*'yı miR-410'un hedef aldığını saptadık ancak ekspresyon artışını gerçek zamanlı PCR alışması ile doğrulayamadık. Buna ilaveten miR-543'nde *NTF3*' hedef aldığını belirledik. Nakagawara ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, *TrkA*

ekspresyonunun anlamlı bir şekilde 1p36 delesyonu ve *MYCN* amplifikasyonuna sahip NB tümörlerinde azaldığı gösterilmiştir [176]. Buna ilaveten çalışmalarda gelişimsel süreçte sınırlı miktarda eksprese olan NGF'in ileri evre NB olgularında ekspresyon artışının gösterilmesi ve yapmış olduğumuz çalışmada her iki *web* tabanlı yazılımda da NGF'in miRNA'ların hedefinin olmaması, çalışmamızdaki 1p delesyonu olan hücre hatlarının NB da ileri evre ile ilişkilendirilen *MYCN* amplifikasyonunu da bulundurması açısından oldukça anlamlıdır. Yine yüksek evre NB olgularında ekspresyon artışı saptanan *NTF-4/5*' in hedef alınmadıkları saptanmıştır.

Vermeulen ve arkadaşlarının, yaklaşık 700 NB hastasının mikro-dizin gen ekspresyonu verisini içeren yedi farklı yayınlanmış çalışma üzerinden, *data-mining* stratejisiyle yaptıkları çalışmada *Gene Ontology* analiziyle de doğrulanmış olarak; *PTN*, *NRCAM*, *DPYSL3*, *MTSS1*, *DDC*, *NTRK1* ve *MAPT* genlerinin nöronal farklılaşma ile ilişkili olduğu ve düşük evre tümörlerde, ileri evre tümörlere göre daha yüksek düzeyde eksprese olduklarını rapor etmişlerdir [77]. Çalışmamızın sonuçları bu veriyle paralellik göstermektedir. İleri evre NB ile ilişkilendirilen 1p delesyonu ile birlikte *MYCN* amplifikasyonu gözlenen hücre hatlarında ekspresyon artışı saptadığımız miRNA'lardan miR-329, miR-410, miR-381, miR-495, miR-543, miR-370, miR-539, miR-433'ün bahsedilen genlerden en az birini hedef aldıkları her iki *web* tabanlı yazılımla doğrulanmıştır. Bahsedilen genlerden *DDC*'nin ise hiçbir miRNA tarafından hedef alınmadığı saptanmıştır.

Sempatik sinir sisteminin gelişmesinde önemli bir rolü olduğu, yapılan çalışmalarla vurgulanan proteinlerden biri olan, *GATA-3* transkripsiyon faktörünün ve kofaktörü olan *ZFPM2*'nin, ileri evre NB tümörlerinde ekspresyon düzeyinin, düşük evre NB tümörlerine göre düşük olduğu rapor edilmiştir. Buna karşılık, *GATA-4* transkripsiyon faktörünün *MYCN* amplifiye NB tümörlerinde yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir [177]. Bu veriler çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda; *GATA-3* ve *ZFPM2*'nin miRNA'larca hedef alındığı gösterilmiştir. Buna karşılık, *GATA4*'ün ise her iki *web* tabanlı yazılımda, çalışmamızdaki hiçbir miRNA tarafından hedef alınmadığı saptanmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalarda Retionik asidin (RA) NB hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan en önemli ajanlardan biri olduğu gösterilmiştir. NB hücrelerinin RA ile muamele edildiğinde, RA'ın reseptörlerine bağlanması sonucunda heterodimer bir yapı ile birlikte konformasyonel bir değişikliğin meydana geldiği ve bu yapının nükleusa geçerek, farklılaşmayı indükleyen ve hücre büyümesinin durdurulmasıyla ilgili genlerin promotör bölgelerine bağlandıkları ve sonuç olarak nöronal farklılaşmanın meydana geldiği ve hücre çoğalmasının ise durduğu gösterilmiştir [178-181]. Yapmış olduğumuz çalışmada RA'ın bağlandığı retionik asit reseptörünün (RARA) miRNA'larca hedef alınıp alınmadığını da araştırdık. Çalışmamızda RARA reseptörünün, ekspresyon artışı doğrulanmış miR-495 tarafından hedef alındığını saptadık. Bu sonuç NB açısından farklılaşma özelliği göstermemiş olan hücre hatlarımızda gösterildiğinden önemlidir.

Sonuç olarak; literatürde yapılan çalışmalarda nöral krest hücrelerinin farklılaşmasında rol oynadığı düşünülen 21 genin ekspresyon düzeylerindeki değişim ile NB'un klinik fenotipi arasındaki ilişki vurgulanmıştır. NB tümörleri ve hücre hatları üzerinde yaptığımız literatür çalışmasında ise, bu genlerin (*PHOX2B* hariç) mutasyona uğradığına veya promotör bölgelerinin hiper metile olduğuna ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durum bu genlerin miRNA'ların hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Buna ilaveten NB tümörlerinde agresif klinik fenotiple ilişkilendirilen 1p kaybının farklılaşma süreci ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu açıdan çalışmamızda kromozom 1p kaybı olan hücre hatlarında ekspresyon artışı saptanan miRNA'ların, farklılaşma sürecinde rol alan genleri hedef alması son derece önemlidir. Ayrıca çalışmamızda her iki *web* tabanlı yazılımla hedef genleri doğrulanmış miRNA'lardan, en çok geni hedef alan ve önceki çalışmalarda NB'da prognostik olarak vurgulanmamış olan miR-543, miR-495 ve miR-494'ün ekspresyon artışları doğrulanmıştır. Buna ilaveten, literatürde çalışmamızda kullanılan NB hücre hatlarının tamamının, NB'da tanımlı tüm lokusların durumunu tanımlayan diğer bir çalışma bulunmamaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Nöroblastom (NB), nöral krestten türeyerek adrenal medulla ve sempatik sinir sistemin gelişimine adanmış nöroektodermal hücrelerden köken alan embriyonel bir tümördür. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturur ve bu dönemde en sık rastlanan kranyum dışı tümördür. NB'da nedensel anlamda tanımlanan gen düzeyindeki tek genetik aberasyon olguların yaklaşık %20'sinde amplifikasyonu görülen MYCN genidir. Kromozomal düzeyde ise NB'da gözlenen en sık kromozomal aberasyonlar; 1p36, 11q23 delesyonu ve 17q22 kazanımıdır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, NB'da tümör oluşumu ve gelişiminden sorumlu genler henüz bulunamamıştır. Bu nedenle NB, karsinogenez sürecindeki moleküler mekanizması en az bilinen tümörlerden biridir. NB'da son yıllarda geniş ölçekli klinik fenotip bakımından farklı tümör örneklerinin karşılaştırılması sonucunda ileri ve düşük evre NB tümörlerinde farklı genlerin eksprese olduğu saptanmıştır. Özellikle ileri evre tümörlerde nöral krest hücrelerinin farklılaşma sürecinde rol alan bazı genlerin ekspresyon düzeylerin düşük olduğu saptanmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında ise bu genlerin hemen hemen tamamında mutasyon saptanmamıştır, buna ilaveten bu genlerin promotör bölgelerinde metilasyon saptanmamıştır. Aynı zamanda bu genlerin ekspresyon düzeylerindeki azalışın nedensel bir bağıntısı henüz tanımlanmış değildir. Bu durum bu genlerin ekspresyon düzeylerinin miRNA ile düzenlenebileceğini akıllara getirmektedir. NB örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda kromozom 1p nin farklılaşma sürecinde rolü olduğu gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da 1p delesyonu olan hücre hatlarında, 1p delesyonu olmayan hücre hatlarına göre, istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren 33 miRNA saptadık. Aynı zamanda, saptadığımız miRNA'ların 14q32 bölgesinde lokalize olduğunu göstredik. miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesinde, farklı algoritmalara sahip iki web tabanlı yazılım kullandık. Ekspresyon artışı saptadığımız miRNA'lardan özellikle miR-410, miR-543, miR-495 ve miR-494'ün en az üç geni hedef aldığından, gerçek zamanlı PCR çalışması için seçtik. Yaptığımız çalışma sonunda miR-543, miR-495 ve miR-494'ün ekspresyon artışlarını, miRNA dizin çalışmasından elde edilen sonuca yakın bulduk. Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulguların geniş tümör örnekleri ile doğrulanması ile bu miRNA'lar NB için prognostik bir faktör olarak önerilebilir. Bir çok bilinmezi olan NB da prognostik olarak miRNA'ların tanımlanması ile risk gruplamasında klinik özellikler ve genetik aberasyonların dışında miRNA'larda önümüzdeki yıllarda yer alabilir. Bu durum özellikle MYCN geninin bazı miRNA'ları, bazı miRNA'larında MYCN genini kontrol

ettiklerinin gösterilmesiyle daha da önem kazanmıştır. Nitekim *MYCN* amplifikasyonu görülmeyen bazı tümör örneklerinde kötü prognozun görülmesi, *MYCN* geninin kopya sayısının dışında, *MYCN* geninin ekspresyonunun miRNA'larca düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Evans, A., Neuroblastoma:Historical Perspective 1864 -1998, in :Brodeur G.M, Sawada T.,Tsuchida Y., Voute P.A. Neuroblastoma, 1.Edition, Amsterdam,Elsevier,2000, p:1-8.
2. Stiller CA, Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004, 23: 6429-6444
3. Olshan, A., Epidemiology, In: Nai-Kong V. Cheung, Susan L. Cohn, Neuroblastoma, 1.ed., Heidelberg, Springer, 2005, p:1-5
4. Kutluk, T., Yesilipek, A., On behalf of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) and Turkish Pediatric Hematology Society (TPHD). Pediatric Tumor Registry for 2002-2005 in Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007. 29(1): p. 12-13
5. Maris, J.M., et al., Neuroblastoma. *Lancet*, 2007. 369(9579): p. 2106-20
6. Smith EI, Castleberry RP. Neuroblastoma. *Curr Probl Surg* 1990; 27: 573-620
7. Nadine Van Roy, K.D.P., Jasmien Hoebeeck, Tom Van Maerken, Filip Pattyn, and J.V. Pieter Mestdagh, Jo Vandesompele and Frank Speleman, The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma:implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Medicine*, 2009. 1: p. 74-85
8. Yamamoto K, Hanada R, Kikuchi A, Ichikawa M, Aihara T, Oguma E, Moritani T, Shimanuki Y,Tanimura M, Hayashi Y: Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol* 1998, 16:1265-1269
9. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldut A, Hero B,Iehara T, Machin D, et al: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009, 27:289-297
10. Brodeur GM: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:203-216
11. Mora, J., et al., Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist*, 2001. 6(3): p. 263-8
12. Brodeur, G.M. and C.T. Fong, Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989. 41(2): p. 153-74

13. Carlsen, N.L. How frequent is spontaneous remission of neuroblastoma? Implications for screening. *Br. J. Cancer* 1990. 61:441-446
14. Ambros IM, Z.A., Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF, Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med*, 1996. 334: p. 1505–1511
15. Shuqing L, Y.T., Alexandre C, Qiwei Y, Peter Z, Helen R.S, Susan E.C, and Susan L.C., Cross-Talk between Schwann Cells and Neuroblasts Influences the Biology of Neuroblastoma Xenografts. . *American Journal of Pathology*, 2005. 166: p. 891-899
16. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O: Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 2010, 29:1566-1579
17. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A, et al: Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009, 27:1026-1033
18. Gilbert F, Balaban G, Moorhead P et al. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 7: 33-42
19. White PS, Maris JM, Beltinger C et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5520-5524
20. Weith A, Martinsson T, Cziepluch C et al. Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosomes Cancer* 1989; 1: 159-166
21. Richard D. Riley, David Heney , David R. Jones , Alex J. Sutton , Paul C. Lambert , Keith R. Abrams, Bridget Young, Alan J. Wailoo, and Susan A. Burchill. A Systematic Review of Molecular and Biological Tumor Markers in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* January 1, 2004 10; 4
22. Park, J.R.E., A. Caron, H., Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am*, 2008. 55(1): p. 97-120
23. Kaneko Y, Knudson AG: Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000, 29:89-95
24. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM: 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.

25. Fong CT, Dracopoli NC, White PS et al., Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989,86:3753–3757
26. 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
27. Lukens, J.N., Neuroblastoma in the neonate. *Semin Perinatol*, 1999. 23(4): p. 263-73
28. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, et al: Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005, 353:2243-2253
29. Cheng NC, van Roy N, Chan A, Beitsma M et al., Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35–36 region, only one of which is associated with N-myc amplification. *Oncogene* 1995,10:291–297
30. Bader, S. A., Fasching, C., Brodeur, G. M. & Stanbridge, E. J., Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 1991,2(5): 245-55.
31. Brodeur, G.M., et al., Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, 1984. 224(4653): p. 1121-4
32. Brodeur, G.M., et al., Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer*, 1986. 58(2 Suppl): p. 541-5.
33. Weiss, W.A., et al., Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J*, 1997. 16(11): p. 2985-95.
34. Stanton BR, Perkins AS, Tessarollo L, Sassoon DA, Parada LF: Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 1992, 6:2235-2247.
35. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U et al. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J* 1991; 10: 3703-3712.
36. Carén H, Abel F, Kogner P, Martinsson T., High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* 2008, 416(2):153–159.

37. Breen, C.J., et al., Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000. 120(1): p. 44-9.
38. Guo, C., et al., Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*, 2000. 35(6): p. 544-6.
39. Spitz, R., et al., Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(1): p. 52-8.
40. Guo C, White PS, Weiss MJ et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999, 18:4948–4957.
41. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, et al: Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1999, 340:1954-1961.
42. Savelyeva L, Corvi R, Schwab M., Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet* 1994,55(2):334–340.
43. Stallings RL, Howard J, Dunlop A, Mullarkey M, McDermott M, Breatnach F, O'Meara A. Are Gains of chromosomal regions 7q and 11p important abnormalities in neuroblastoma? *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Jan 15;140(2):133-7.
44. Caron, H., et al., Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumour suppressor gene locus. *Hum Genet*, 1996. 97(6): p. 834-7.
45. Pezzolo, A., et al., Presence of 1q gain and absence of 7p gain are new predictors of local or metastatic relapse in localized resectable neuroblastoma. *Neuro-Oncology*, 2009. 11(2): p. 192-200.
46. Giordani, L., et al., Two regions of deletion in 9p22- p24 in neuroblastoma are frequently observed in favorable tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002. 135(1): p. 42-7.
47. Suzuki, T., et al., Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res*, 1989. 49(5): p. 1095-8.
48. Villamon, E., et al., Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch*, 2008. 453(1): p. 47-55.

49. Scaruffi, P., et al., Identification and characterization of DNA imbalances in neuroblastoma by high-resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007. 177(1): p. 20-9.
50. Caren, H., et al., High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(9): p. 4323-8.
51. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y, Mano H., A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008,105:19893–19897.
52. Y.P. Mosse, M. Laudenslager, L. Longo, K.A. Cole, A. Wood, E.F. Attiyeh, M.J. Laquaglia, R. Sennett, J.E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N.J. Schork, G.M. Brodeur, G.P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, J.M. Maris, Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene, *Nature* 2008: 455 930–935.
53. R.E. George, T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. Luther 2nd, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W.B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V.E. Gregor, T.R. Webb, N.S. Gray, D.G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S.W. Morris, M. Meyerson, A.T. Look, Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma, *Nature* 2008: 455 975–978.
54. Y. Chen, J. Takita, Y.L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, S. Ogawa, Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma, *Nature* 2008: 455 971–974.
55. I. Janoueix-Lerosey, D. Lequin, L. Brugieres, A. Ribeiro, L. De Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau- Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel, O. Delattre, Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma, *Nature* 2008: 455 967–970.
56. R. Spitz, A. Oberthuer, M. Zapatka, B. Brors, B. Hero, K. Ernestus, J. Oestreich, M. Fischer, T. Simon, F. Berthold, Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome, *Gene Chromosome Cancer* 2006: 45 1130–1142.
57. Ozkan Bagci , Sait Tumer, Nur Olgun, Oguz Altungoz, Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Letters* 2012: 317 72–77.

58. Berry-Kravis EM, Zhou L, Rand CM et al. Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1139-1144.
59. Rohrer T, Trachsel D, Engelcke G et al. Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33: 71-76.
60. Limpt, V. v., Schramm, A., Lakeman, A., Sluis, P. v., Chan, A., Noesel, M. v., Baas, F., Caron, H., Eggert, A. & Versteeg, R., The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene* 2004, 23(57): 9280-9288.
61. Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Khazi, D., Carlisle, A. J., Winter, C. L., Rappaport, E. & Maris, J. M. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004,75(4): 727-30.
62. Raabe, E. H., Laudenslager, M., Winter, C., Wasserman, N., Cole, K., LaQuaglia, M., Maris, D. J., Mosse, Y. P. & Maris, J. M. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* 2008,27(4): 469-476.
63. Grimmer MR, Weiss WA: Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development. *Curr Opin Pediatr* 2006, 18:634-638.
64. Akira Nakagawara, Miki Ohira: Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model *Cancer Letters* 2004. 204 213–224.
65. Tatjana Sauka-Spengler and Marianne Bronner-Fraser. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 557-568.
66. Garcia-Castro MI, Marcelle C, Bronner-Fraser M. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 2002; 297: 848-851.
67. Wolpert L. Gastrulation and the evolution of development. *Dev Suppl* 1992: 7-13.
68. Gammill LS, Bronner-Fraser M: Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews Neuroscience* 2003, 4:795-805.
69. Knecht AK, Bronner-Fraser M: Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* 2002, 3:453-461.
70. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A: The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003, 116:499-511.

71. Kulesa PM, Lefcort F, Kasemeier-Kulesa JC: The migration of autonomic precursor cells in the embryo. *Auton Neurosci* 2009, 151:3-9.
72. Magdalena Czarnecka, Jason Tilan and Joanna Kitlinska., Sympathetic Neurotransmitters in Neuroblastoma – Between Physiology and Pathology, In: Hiroyuki Shimada, Neuroblastoma- Present and Future, 1.ed., Croatia, InTech, 2012, p:137-152.
73. Akira Nakagawara., Molecular and Developmental Biology of Neuroblastoma, In: Nai-Kong V. Cheung, Susan L. Cohn, Neuroblastoma, 1.ed., Heidelberg, Springer, 2005, p:41-53.
74. Akira Nakagawara., Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link, In Luigi Aloe, and Laura Calza, Progress in Brain Research NGF and Related Molecules in Health and Disease Vol: 146, Elsevier, 2004, p:233-242.
75. Schneider C, Wicht H, Enderich J, Wegner M, Rohrer H: Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* 1999, 24:861-870.
76. Andrew Tee, Pei Y. Liu, Glenn M. Marshall and Tao Liu., Neuroblastoma: A Malignancy Due to Cell Differentiation Block, In: Hiroyuki Shimada, Neuroblastoma- Present and Future, 1.ed., Croatia, InTech, 2012, p:79-84.
77. Vermeulen J et al., Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol* 2009, 10(7): 663–671.
78. Serra A, Haberle B, Konig IR, Kappler R, Suttorp M, Schackert HK, Roesner D, Fitze G: Rare occurrence of phox2b mutations in sporadic neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008, 30:728-732.
79. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frebourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J: Germline mutations of the paired-like homeobox 2b (phox2b) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004,74:761-764.
80. Bourdeaut F, Trochet D, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Deville A, Coz C, Michiels JF, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005 Oct 18;228(1-2):51-8.
81. Krona C, Carén H, Sjöberg RM, Sandstedt B, Laureys G, Kogner P, Martinsson T. Analysis of neuroblastoma tumour progression; loss of PHOX2B on 4p13 and 17q gain are early events in neuroblastoma tumourigenesis. *Int J Oncol.* 2008 Mar;32(3):575-83.

82. 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 Jun 15;140(12):1297-301.
83. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75:843-854.
84. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, 136:215-233.
85. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA (2008): MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int.J.Cancer* 122:969-977.
86. Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J., Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA*. 2006, 12:1161-1167.
87. Baehrecke EH. miRNAs: micro managers of programmed cell death. *Current Biology* 2003 Jun 17;13(12):473-5.
88. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 2003 Jul 18;301(5631):336-8.
89. Ke XS, Liu CM, Liu DP, Liang CC. MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks. *Curr Opin Chem Biol*. 2003 Aug;7(4):516-23.
90. Kim VN, Han J, Siomi MC: Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10:126-139.
91. Ramiro Garzon, George A. Calin, and Carlo M. Croce. MicroRNAs in Cancer, *Annual Review of Medicine* 2009,60: 167-179.
92. Takaya Saito,Pal Sætrom, MicroRNAs-targeting and target prediction, *New Biotechnology* 27;3: 2010, 243–249.
93. Dalmay T, Edwards DR., MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 2006,25:6170-6175.
94. Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *J.Intern.Med*. 2008, 263:366-375.
95. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM., Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002, 99:15524-15529.

96. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM., miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005,102:13944-13949.
97. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A, High Expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt Lymphoma Genes Chromosomes Cancer. 2004, 39(2): 167-9.
98. Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ., Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim.Biophys.Acta* 2004,1677:129-141.
99. Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 2006: 25:6202-6210.
100. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120:15-20.
101. Chen Y, Stallings RL: Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007, 67:976-983.
102. Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M, Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettner R, et al: MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer* 2008, 122:699-704.
103. Afanasyeva EA, Hotz-Wagenblatt A, Glatting KH, Westermann F., New miRNAs cloned from neuroblastoma. *BMC. Genomics.*2008,9:52.
104. Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinnazzi S, Forloni M, Boldrini R, Donfrancesco A, Federici V, Giacomini P, et al: Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS ONE* 2008, 3(5):e2236.
105. Schulte JH, Marschall T, Martin M, Rosenstiel P, Mestdagh P, Schlierf S, Thor T, Vandesompele J, Eggert A, Schreiber S, et al: Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2010, 38:5919-5928.
106. Loven J, Zinin N, Wahlstrom T, Muller I, Brodin P, Fredlund E, Ribacke U, Pivarcsi A, Pahlman S, Henriksson M: MYCN-regulated microRNAs repress estrogen receptor-alpha (ESR1) expression and neuronal differentiation in human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:1553-1558.

107. Shohet JM, Ghosh R, Coarfa C, Ludwig A, Benham AL, Chen Z, Patterson DM, Barbieri E, Mestdagh P, Sikorski D, et al: A Genome-wide Search for MYCN Binding Sites Reveals Both New Oncogenic and Tumor Suppressor MicroRNAs Associated with Aggressive Neuroblastoma. *Cancer Res* 2011, 71:1-11.
108. Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquiere B, Schulte S, Dews M, et al: The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell* 2010, 40:762-773.
109. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, et al: miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010, 12:247-256.
110. C. Welch, Y. Chen, R.L. Stallings, MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells, *Oncogene* 26, 2007,5017–5022.
111. N. Raver-Shapira, E. Marciano, E. Meiri, Y. Spector, N. Rosenfeld, N. Moskovits, Z. Bentwich, M. Oren, Transcriptional activation of miR- 34a contributes to p53-mediated apoptosis, *Mol. Cell* 2007, 26 731–743.
112. T.C. Chang, E.A. Wentzel, O.A. Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K.H. Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito, C.J. Lowenstein, D.E. Arking, M.A. Beer, A. Maitra, J.T. Mendell, Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis, *Mol. Cell* 2007, 26 745–752.
113. Tivnan A, Tracey L, Buckley PG, Alcock LC, Davidoff AM, Stallings RL. MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in neuroblastoma, *BMC Cancer*. 2011;11:33.
114. Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP, Laquaglia MJ, Diskin SJ, Brodeur GM, Maris JM: A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res* 2008, 6:735-742.
115. Wei JS, Song YK, Durinck S, Chen QR, Cheuk AT, Tsang P, Zhang Q, Thiele CJ, Slack A, Shohet J, Khan J: The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* 2008, 27:5204-5213.
116. Lin RJ, Lin YC, Chen J, Kuo HH, Chen YY, Diccianni MB, London WB, Chang CH, Yu AL: microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res* 2010, 70:7841-7850.

117. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
118. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions. *Human Mutation* 2004;23:413-419.
119. Ambros IM, Brunner B, Aigner G, et al. A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:792-804.
120. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B (Methodological)* 1995; 57:289-300.
121. Kiriakidou, M. et al. A combined computational–experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 18,2004 1165–1178.
122. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C: The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008, 36:D149-153.
123. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001, 25: 402–408.
124. Doron Betel, Anjali Koppal, Phaedra Agius, Chris Sander, Christina Leslie. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites *Genome Biology* 2010, **11**:R90.
125. Caron H, Spieker N, Godfried M, Veenstra M, van Sluis P, de Kraker J, Voute P, Versteeg R: Chromosome bands 1p35-36 contain two distinct neuroblastoma tumor suppressor loci, one of which is imprinted. *Genes Chromosomes Cancer* 2001,30:168-174.
126. Caron H, van Sluis P, van Hoeve M, de Kraker J, Bras J, Slater R, Mannens M, Voute PA, Westerveld A, Versteeg R: Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with n-myc amplification. *Nat Genet* 1993, 4:187-190.
127. Fong CT, White PS, Peterson K, Sapienza C, Cavenee WK, Kern SE, Vogelstein B, Cantor AB, Look AT, Brodeur GM: Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1992, 52:1780-1785.
128. Henrich KO, Claas A, Praml C, Benner A, Mollenhauer J, Poustka A, Schwab M, Westermann F: Allelic variants of camt1 and flj10737 within a commonly deleted region at 1p36 in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2007, 43:607-616.

129. Martinsson T, Sjoberg 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.
130. Martinsson T, Weith A, Cziepluch C, Schwab M: Chromosome 1 deletions in human neuroblastomas: Generation and fine mapping of microclones from the distal 1p region. *Genes Chromosomes Cancer* 1989, 1:67-78.
131. Peter M, Michon J, Vielh P, Neuenschwander S, Nakamura Y, Sonsino E, Zucker JM, Vergnaud G, Thomas G, Delattre O: Pcr assay for chromosome 1p deletion in small neuroblastoma samples. *Int J Cancer* 1992, 52:544-548.
132. Ritke MK, Shah R, Valentine M, Douglass EC, Tereba A: Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in neuroblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 1989,50:84-90.
133. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, Lastowska M, Bown N, Combaret V, Favrot MC, Delattre O, Michon J, Benard J, Hartmann O, Nicholson JC, Ross FM, Brinkschmidt C, Laureys G, Caron H, Matthay KK, Feuerstein BG, Speleman F: 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.
134. White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, Winter C, Gregory SG, Hogarty MD, Maris JM, Brodeur GM: Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 2005,24:2684-2694.
135. Wilzen A, Nilsson S, Sjoberg RM, Kogner P, Martinsson T and Abel F, The Phox2 pathway is differentially expressed in neuroblastoma tumors, but no mutations were found in the candidate tumor suppressor gene PHOX2A. *Int J Oncol* 2009,34:697-705.
136. Liu X, Mazanek P, Dam V, Wang Q, Zhao H, Guo R, Jagannathan J, Cnaan A, Maris JM and Hogarty MD, Deregulated Wnt/beta-catenin program in high-risk neuroblastomas without MYCN amplification. *Oncogene* 2008,27:1478-1488.
137. Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schäfer H, Christiansen H, Eilers M., Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2002 Nov;2(5):377-86.)
138. van Noesel, M.M., van Bezouw, S., Voute, P.A., Herman, J.G., Pieters, R., Versteeg, R., Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003,38, 226– 233.

139. Henrich KO, Bauer T, Schulte J, Ehemann V, Deubzer H, Gogolin S, Muth D, Fischer M, Benner A, König R, Schwab M, Westermann F. CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2011 Apr 15;71(8):3142-51.
140. de Pontual L, Trochet D, Bourdeaut F, Thomas S, Etchevers H, Chompret A, Minard V, Valteau D, Brugieres L, Munnich A, Delattre O, Lyonnet S, Janoueix-Lerosey I, Amiel J. Methylation-associated PHOX2B gene silencing is a rare event in human neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 2007 Nov;43(16):2366-72.
141. Carr J, Bown NP, Case MC, Hall AG, Lunec J, Tweddle DA: High-resolution analysis of allelic imbalance in neuroblastoma cell lines by single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet* 2007,172:127-138.
142. Mosse YP, Diskin SJ, Wasserman N, Rinaldi K, Attiyeh EF, Cole K, Jagannathan J, Bhambhani K, Winter C, Maris JM: Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer*2007, 46:936-949.
143. Perri P, Longo L, Cusano R, McConville CM, Rees SA, Devoto M, Conte M, Ferrara GB, Seri M, Romeo G, Tonini GP: Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. *Oncogene* 2002,21:8356-8360.
144. Vandesompele J, Van Roy N, Van Gele M, Laureys G, Ambros P, Heimann P, Devalck C, Schuurin E, Brock P, Otten J, Gyselinck J, De Paepe A, Speleman F: Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 23:141-152.
145. Foley NH, Bray I, Watters KM, Das S, Bryan K, Bernas T, Prehn JH, Stallings RL. MicroRNAs 10a and 10b are potent inducers of neuroblastoma cell differentiation through targeting of nuclear receptor corepressor 2. *Cell Death Differ.* 2011 Jul;18(7):1089-98.
146. Buechner J, Tømte E, Haug BH, Henriksen JR, Løkke C, Flægstad T, Einvik C. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer.* 2011 Jul 12;105(2):296-303.
147. Haug BH, Henriksen JR, Buechner J, Geerts D, Tømte E, Kogner P, Martinsson T, Flægstad T, Sveinbjørnsson B, Einvik C. MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma. *Carcinogenesis.* 2011 Jul;32(7):1005-12.

148. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 February; 2(2):a002915.
149. Zhang H, Qi M, Li S, Qi T, Mei H, Huang K, Zheng L, Tong Q. microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jul;11(7):1454-66.
150. Gattolliat CH, Thomas L, Ciafrè SA, Meurice G, Le Teuff G, Job B, Richon C, Combaret V, Dessen P, Valteau-Couanet D, May E, Busson P, Douc-Rasy S, Bénard J. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer.* 2011 Oct 25;105(9):1352-61.
151. Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matisse TC, White PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001 Jan;36(1):28-31.
152. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004.
153. Bray I et al. Widespread dysregulation of MiRNAs by MYCN amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PLoS One* 2009, 4(11):e7850.
154. Das S et al. MicroRNA mediates DNA demethylation events triggered by retinoic acid during neuroblastoma cell differentiation. *Cancer Res* 2010, 70(20):7874–7881
155. Meseguer S et al. MicroRNAs-10a and -10b contribute to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells and target the alternative splicing regulatory factor SFRS1 (SF2/ ASF). *J Biol Chem* 2011, 286(6):4150–4164
156. Evangelisti C et al. MiR-128 up-regulation inhibits Reelin and DCX expression and reduces neuroblastoma cell motility and invasiveness. *FASEB J.* 2009, 23(12):4276–4287
157. Lin RJ, Lin YC, Yu AL miR-149* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol Carcinog* 2010, 49(8):719–727.
158. Beveridge NJ et al. Down-regulation of miR-17 family expression in response to retinoic acid induced neuronal differentiation. *Cell Signal* 2009, 21(12):1837–1845.
159. Nan Feifei, Zhang Mingzhi, Zhang Yanyun, Zhang Huanle, Ren Fang, Huang Mingzhu, Cao Mingzhi, Shi Yafei, Zhang Fengchun, MicroRNA expression analysis

- of mammospheres cultured from human breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012, 138:1937–1944.
160. Hayashita Y et al. A polycistronic microRNA cluster miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005, 65(21):9628–9632.
 161. Busacca S et al. MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, 42:312–319.
 162. Yu Z et al. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol* 2008, 182(3):509–517.
 163. Takakura S et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci* 2008, 99(6):1147–1154.
 164. O'Donnell KA et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005, 435(7043):839–843.
 165. Genovesi LA, Carter KW, Gottardo NG, Giles KM, Dallas PB, Integrated analysis of miRNA and mRNA expression in childhood medulloblastoma compared with neural stem cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e23935.
 166. Hwang-Verslues WW, Chang PH, Wei PC, Yang CY, Huang CK, Kuo WH, Shew JY, Chang KJ, Lee EY, Lee WH. miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1. *Oncogene.* 2011 May 26;30(21):2463-74.
 167. Yang Du, Henry Yip, Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. *Differentiation* 2010, 79 84–92.
 168. Li W, Cogswell CA, LoTurco JJ. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci.* 1998 Nov 1;18(21):8853-62.
 169. Mehler MF, Mabie PC, Zhu G, Gokhan S, Kessler JA. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev Neurosci.* 2000;22(1-2):74-85.
 170. Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee SH, Turner PA, Hazel TG, McKay RD. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* 2001 Aug 15;15(16):2094-110.

171. De Preter K, Vandesompele J, Heimann P, Yigit N, Beckman S, Schramm A, Eggert A, Stallings RL, Benoit Y, Renard M, De Paepe A, Laureys G, Pålman S, Speleman F. Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes. *Genome Biol.* 2006;7(9):R84.
172. Huber K, Karch N, Ernsberger U, Goridis C, Unsicker K. The role of Phox2B in chromaffin cell development. *Dev Biol.* 2005 Mar 15;279(2):501-8.
173. Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF, The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature.* 1999 May 27;399(6734):366-70.
174. Ambros, I.M., Attarbaschi, A., Rumpler, S., Luegmayer, A., Turkof, E., Gadner, H., Ambros, P.F. Neuroblastoma cells provoke Schwann cell proliferation in vitro. *Med. Pediatr. Oncol.* 2001, 36, 163–168.
175. Shimada, H., Chatten, J., Newton Jr., W.A., Sachs, N., Hamoudi, A.B., Chiba, T., Marsden, H.B., Misugi, K., Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984. 73, 405–416.
176. Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Inverse relationship between trk expression and NMYC amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* 1992, 52:1364–1368.
177. V Hoene, M Fischer, A Ivanova, T Wallach, F Berthold and C Dame. GATA factors in human neuroblastoma: distinctive expression patterns in clinical subtypes. *British Journal of Cancer* 2009, 101, 1481 – 1489.
178. Sidell N, Altman A, Haussler MR, Seeger RC. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res.* 1983;148:21–30.
179. Reynolds CP, Schindler PF, Jones DM, Gentile JL, Proffitt RT, et al. Comparison of 13-cis-retinoic acid to trans-retinoic acid using human neuroblastoma cell lines. *Prog Clin Biol Res.* 1994;385:237–244.
180. Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X, et al. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm.* 2005;70:199–264.
181. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 2004;328:1–16.

8.EKLER

EK-1: Etik Kurul Rapor

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 26.05.2008/ 217

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İGCI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 22 Mayıs 2008 tarih ve 12/12/2008 no.lu toplantısında; 213/2008 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Oğuz ALTUNGÖZ'un proje yöneticisi, Araş.Gör.Dr.Özkan BAĞCI'nın sorumlusu olduğu, "Nöroblastom hücre hatarındaki miRNA ekspresyon profilleriyle genetik parametreler arasındaki ilişkilerin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ ve ESERLER LİSTESİ

1. Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Özkan BAĞCI

Akademik Ünvanı: Araştırma Görevlisi

Adres: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. 35340 Balçova-İzmir

E-Posta: ozkan.bagci@deu.edu.tr

2. Eğitim

Derece	Bölüm	Program	Üniversite	Yıl
Doktora	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	2013
Y. Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	2009
Y. Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Halk Sağlığı	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	2006
Lisans	Ortaöğretim Fen Matematik Alanlar Eğitimi Bölümü	Biyoloji Eğitimi	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	2003

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Tezi:

Bağcı Ö., "Nöroblastom Hücre Hatlarındaki miRNA Ekspresyon Profilleriyle Genetik Parametreler Arasındaki İlişkilerin Araştırılması", Bitirme Aşamasında, İzmir. Danışman Öğretim Üyesi: Doç Dr. Oğuz Altungöz.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Tezi:

Bağcı, Ö., "Nöroblastik Tümörlerde Anaplastik Lenfoma Kinaz (Alk) Gen Mutasyonlarının Tanımlanması " 2009, İzmir. Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç Dr. Oğuz Altungöz.

Halk Sağlığı Yüksek Lisans Tezi:

Bağcı, Ö, "İncir İşletmesi İşçilerinde İş Gerilimi İle Beslenme Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" 2006, İzmir, Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç. Dr. Yücel Demiral

Uzmanlık Alanları:

- Kalıtsal hastalıklarda mutasyon ve genotip analizleri.
- Kantitatif DNA kopya sayısı analizleri ve nöroblastik tümörlerdeki klinik anlamı.
- Protein düzeyinde gen ifadesi analizleri.
- Array analizleri.
- Genom gezgini ve mutasyonel analiz araçlarının kullanımı.
- Neden-sonuç ilişkilerinde, İstatistiksel analiz araçlarının (SPSS, Statcalc) kullanımı.

3.Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Grv.	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2004-2013

4.Projelerde Yaptığı Görevler:

4.1. *Nöroblastom Olgularında Edinsel PHOX2B Mutasyonlarının Saptanması ve Tümör Davranışı ile Birlikteliğinin Araştırılması.* Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2009-2011.

4.2. *Nöroblastom Hücre Hatlarındaki miRNA Ekspresyon Profilleriyle Genetik Parametreler Arasındaki İlişkilerin Araştırılması.* Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2009-2011.

4.3. *Nöroblastik Tümörlerdeki Prognostik DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin Saptanması.* Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Destek Programı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2007-2009.

4.4. *Nöroblastik Tümörlerdeki Bölgesel DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin, Allelik Dengesizliklerin Tanımlanması ve Schwann Hücresi-Nöroblastik Hücre Etkileşiminin Hücre Hattı Modellerinde Araştırılması.* Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2007-2010.

4.5. *Nöroblastom Tümörlerinde Genetik Değişikliklerin Saptanması.* Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG), Nöroblastoma Protokolü Kapsamında (www.tpog.org.tr/tpog.pdf) Projedeki Görevi: TPOG-NBL Protokolü Genetik Çalışmaların Sürdürülmesi, 2009-2012.

5.Ödüller:

5.1. Sözlü Bildiri 1.lık Ödülü: Bağcı Ö, Tümer S, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O. "Sporadik Nöroblastomda 2p23.2-2p24.3 Kromozom Bölgesindeki Segmental Dengesizliklerle ALK Geni Değişiklikleri Arasındaki İlişki". 16. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Mayıs 2010, Samsun.

6.Eserler

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI Kapsamında):

6.A1. Bağcı O, Tümer S, Olgun N, Altungöz O. "Copy number status and mutation analyses of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors", Cancer Lett. 2012 Apr 1;317(1):72-77. Epub 2011 Nov 13

6.A2. S. Kizildag, E. Gulsu, O. Bağcı, E. Yuksel, T. Canda "Vitamin D receptor gene polymorphisms and male breast cancer risk in Turkish Population", Journal of BUON 16: 640-645, 2011

B. SCI tarafından taranan Uluslar arası dergilerde yayımlanan bildiri özetleri:

6.B1. Tümer S, Bağcı O, Olgun NH, Altungöz O. "Detection of Multiple Genetic Changes in Neuroblastoma by MLPA". In vivo 25: 565-565. IV. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul, June 2011.

6.B2. Çağlar HO, Tümer S, Bağcı O, Olgun NH, Altungöz O. "PHOX2B Gene Mutations in Neuroblastomas". In vivo 25: 517-518. IV. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul, June 2011.

6.B3. Çağlar HO, Tümer S, Bağcı Ö, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O. "Nöroblastik Tümörlerde PHOX2B Geni Kopya Sayısı Değişimlerinin QPCR ile Saptanması." Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;(31):S76 (Suppl). XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, Ekim 2011.

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

6.C1. Tümer S, Bağcı Ö, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O. "Nöroblastom Olgularında Çoklu Genetik Değişikliklerin MLPA ile Saptanması". 19. Ulusal Kanseri Kongresi, Antalya, Nisan 2011.

6.C2. Bağcı Ö, Tümer S, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O. "Sporadik Nöroblastomda 2p23.2-2p24.3 Kromozom Bölgesindeki Segmental Dengesizliklerle ALK Geni Değişiklikleri Arasındaki İlişki". 16. TPOG Ulusal Pediatrik Kanseri Kongresi, Samsun, Mayıs 2010.

6.C3. Yonca Sönmez, Pembe Keskinöğlu, Serap Konakçı, Gül Saatli, Hatice Giray, Hakan Baydur, Recı Meseri, Özkan Bağcı, Türkan Günay, "15-49 yaş kadın tekstil çalışanlarının aile planlaması ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar konusunda bilgi düzeyleri ve verilen eğitimlerin etkinliğinin belirlenmesi", 10. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi, Van, Eylül 2006.

6.C4. Konakçı S, Bağcı Ö, Kaynak C, Günay T, Uçku R, "Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem V Toplum İçinde Kadın Sağlığı Uygulaması: Kadınların Uygulama

Hakkındaki Geri Bildirimleri/2004-2005", 4. Ulusal Tıp Eğitimi Kongresi, Adana, Mayıs 2006.

6.C5. Özkan Bağcı, Hatice Giray, Mehmet Ali Kurnaz, Arife Esra Kocakaya, Meryem Çetin, Alp Ergör, "15-49 yaş kadınların Kuş Gribine ilişkin bilgi düzeyini etkileyen etmenler", IV. Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu, Manisa, Nisan 2006.

6.C6. Özkan Bağcı, Gül Saatli, S.Reyhan UÇKU, "İnönü Sağlık Ocağı Bölgesindeki Enjeksiyon Yöntemiyle Korunan Kadınların özellikleri", IV. Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu, Manisa, Nisan 2006.

6.C7. Özkan Bağcı, Belgin Ünal Toğrul, "Deniz kirliliği ve nedenleri", Gülhane Askeri Tıp Akademisi Çevre Sağlığı Kongresi, Ankara, Eylül 2005.

7.Katıldığı Bilimsel Etkinlikler

7.1. Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Teorik Kursu, İzmir, 2011 (Katılımcı).

7.2. XVI. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Samsun, 2010 (Sözlü sunu).

7.3. 2. Evrim Bilim ve Eğitim Sempozyumu, İstanbul, 2009 (Katılımcı).

7.4. 4.Onkolojide Arayışlar Sempozyumu, İzmir, 2008 (Katılımcı).

7.5. Mekanik Stres Araştırmalarının Hücre ve Doku Düzeyindeki Yaklaşımları ve Uygulamaları, İzmir, 2008 (Katılımcı).

7.6. Prostat Kanseriinde NKX3.1 in Rolü, İzmir, 2007 (Katılımcı).

7.7. 1. Nörogenetik sempozyumu, İzmir, 2007 (Katılımcı).

7.8. Hücresel yaşlanma ve Kanseri, İzmir, 2007 (Katılımcı).

7.9. DNA hasarı DNA onarımı ve Hastalıklarla ilişkisi, İzmir, 2007 (Katılımcı).

7.10. Filamin Proteinlerin Organ Gelişimindeki ve Hastalıklardaki Yeni Rollerini, İzmir, 2007 (Katılımcı).

7.11. Kardiyovasküler Hastalıklara Yönelik Damar Cidarında Adenovirüslerle Gen Tedavisi, İzmir, 2007 (Katılımcı).

7.12. Apoptozis,Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri, İzmir, 2006 (Katılımcı).

7.13. 9.Halk Sağlığı Kongresi, Ankara, 2006 (Katılımcı).

7.14. 4.Halk Sağlığı Temel Konular Kursu, İzmir, 2006 (Düzenleme Kurulu Üyesi Olarak Düzenleyici)

7.15. 4. Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu, Manisa, 2006 (poster sunu)

7.16. Çevre Sağlığı Kongresi, Ankara, 2005 (poster sunu)

7.17. III. Ana Çocuk Sağlığı Kongresi, İzmir, 2005 (Katılımcı).

7.18. 3.Temel Sağlık Hizmetleri Sempozyumu, Manisa, 2005 (Katılımcı).

8.Verilen Dersler

8.1. Mezuniyet sonrası "TBG 5022 Sitogenetik" dersi, insan kromozomları uygulamalarında derse asist. (2008 Bahar Dönemi)

8.2. Mezuniyet sonrası "TBG 5022 Sitogenetik" dersi, insan kromozomları uygulamalarında derse asist. (2012 Bahar Dönemi)