



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



NÖROBLASTOM MİKRORNA İLİŞKİSİ

KEMAL ERGİN

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2015

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD-2011970069



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



NÖROBLASTOM MİKRORNA İLİŞKİSİ

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

KEMAL ERGİN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. H. Nur OLGUN

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.005 sayı ile desteklenmiştir)

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD-2011970069

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Kemal ERGİN 'NÖROBLASTOM MİKRORNA İLİŞKİSİ' konulu Doktora tezini 18.08.2015 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BASKAN

Prof. Dr. H. Nür ÖLGÜN

(DANIŞMAN)

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Safiye G. AKTAŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Onkoloji Enstitüsü

ÜYE

Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Onkoloji Enstitüsü

ÜYE

Doç. Dr. A. Gülden DİNİZ ÜNLÜ

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma

Hastanesi

ÜYE

Prof. Dr. Erdener ÖZER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

ÜYE

Prof. Dr. Mehmet KANTAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Zekiye S. ALTUN

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
İTHAF.....	ix
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	3
1.2 Araştırmanın Amacı.....	4
1.3 Araştırmanın Hipotezi.....	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nöroblastom ve epidemiyolojisi.....	5
2.2. Nöroblastomda genetik yatkınlık.....	6
2.3. Patogenez ve patoloji.....	6
2.4. Nöroblastomda Moleküler Patogenez.....	10
2.5. Nöroblastom gelişiminde genetik modeller.....	12
2.6. Risk Sınıflandırması.....	13
2.7. Klinik Tanı ve Tedavi.....	14
2.8. Prognoz.....	16
2.9. MikroRNA.....	17
2.9.1 Tarihçe ve miRNA kavramı.....	17
2.9.2 miRNA sentezi ve biyogenezi.....	17
2.9.3 MikroRNA Belirleme Yöntemleri.....	19
2.9.4 MikroRNA veritabanları ve hedef gen belirleme araçları.....	20
2.9.5 MikroRNA ve kanser.....	21
2.9.6 Nöroblastom ve mikroRNA ilişkisi.....	22

3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
3.1. Araştırmanın tipi	24
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	24
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme.....	24
3.4. Çalışma Materyali.....	24
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	24
3.6. Veri Toplama Araçları.....	25
3.6.1 Araçlar ve Gereçler.....	25
3.6.1.1 Tez çalışmasında kullanılan gereçler.....	25
3.6.1.2 Kullanılan sarf malzemeler.....	25
3.6.2 Veri (Dokuları) toplama.....	25
3.6.3 Risk Sınıflandırması.....	26
3.6.4 Gruplama.....	26
3.6.5 Mikroarray (mikroRNA) Analizi.....	27
3.6.5.1 Makrodiseksiyon.....	27
3.6.5.2 RNA izolasyonu.....	27
3.6.6 Mikroarray.....	29
3.6.6.1 Genel İlke.....	29
3.6.6.2 Uygulama Basamakları.....	29
3.6.7 Eş zamanlı PZR ile validasyon.....	30
3.6.7.1 Genel İlke.....	30
3.6.7.2 Uygulama Basamakları.....	31
3.6.8 Eş zamanlı PZR ile yeni vakalarda analiz.....	32
3.6.9 Klinik veriler ile miRNA karşılaştırması.....	32
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	33
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	33
3.8.1 Biyoistatistik Yöntem.....	33
3.8.2 Biyoinformatik Analiz.....	33
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları.....	34
3.10. Etik Kurul Onayı	34

4. BULGULAR.....	35
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri.....	35
4.2. Çalışmadaki Nöroblastom Tümör Dokularına Ait Resimler.....	36
4.3. Moleküler Belirteç Dağılımı.....	39
4.4. Risk Sınıflandırması.....	39
4.5. MikroRNA Mikroarray.....	45
4.6. Eş zamanlı PZR analizi (Validasyon).....	53
4.7. Sağkalım Analizi.....	54
4.8. Yeni vakalara ait demografik özellikler.....	55
4.9. Yeni vakalarda Eş zamanlı PZR analizi.....	56
4.10. GO ve KEGG analizi.....	57
4.11. Klinik veriler ile miRNA karşılaştırması.....	61
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR.....	73
8. EKLER.....	83
8.1. Etik Kurul Raporu (EK1).....	83
8.2. Laboratuvar Kullanım İzin Belgesi (EK2).....	84
8.3. Özgeçmiş ve Yayın Listesi.....	85

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırması.....	9
Tablo 2: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırmasına (Shimada sistemi) göre nöroblastik tümörlere ait prognostik değerlendirme.....	9
Tablo 3: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastom 2009 Protokolü Risk Sınıflaması	13
Tablo 4: Uluslararası nöroblaston evreleme sistemi (INSS).....	14
Tablo 5: Nöroblastom tedavisinde potansiyel hedef mikroRNA'lar	23
Tablo 6: Prognostik belirteç olarak yirmibeş adet mikroRNA.....	23
Tablo 7: Hastaların Demografik Özellikleri.....	35
Tablo 8: Nöroblastom hastalarındaki moleküler belirteç dağılımı.....	39
Tablo 9: Nöroblastom hastalarındaki risk sınıflandırması.....	39
Tablo 10: Validasyon amaçlı yapılan eş zamanlı PZR sonrası miRNA kat değişimleri.....	53
Tablo 11: Yüksek risk hastalara ait demografik özellikler (yeni vakalar).....	55
Tablo 12: Düşük risk hastalara ait demografik özellikler (yeni vakalar).....	56
Tablo 13: Yüksek/düşük risk (yeni vakalarda) miRNA kat değişimleri.....	56
Tablo 14: İyi-kötü histoloji gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması.....	57
Tablo 15: İyi-kötü histoloji gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması.....	57
Tablo 16: İyi ve kötü histoloji gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması.....	57
Tablo 17: Nöroblastom-ganglionörom gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması	58
Tablo 18: Nöroblastom-ganglionörom gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması	58
Tablo 19: Nöroblastom ve ganglionörom gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması.....	58
Tablo 20: Kemoterapi öncesi ve sonrası gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması.....	59
Tablo 21: Kemoterapi öncesi ve sonrası gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması.....	59

Tablo 22: Kemoterapi öncesi ve sonrası gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması.....	59
Tablo 23: Düşük risk ve yüksek risk gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması.....	60
Tablo 24: Düşük risk ve yüksek risk gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması.....	60
Tablo 25: Düşük risk ve yüksek risk gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması.....	60
Tablo 26: Klinik bulgular (cinsiyet, yaş, tanı, NMYC, 1qLOH, 11qLOH, 17qgain, metastaz, histoloji, risk sınıflaması, tedavi protokolü) ile $p<0.01$ de farklı eksprese olan miRNA'ların karşılaştırılması	61
Tablo 27: Gruplar ve klinik verilerin kıyaslanması sonrası en fazla eksprese olan miRNA'ların TarBase 7.0 ve miRDB veritabanlarındaki hedef gen sayılarını gösteren tablo.	63

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Nöral krest hücreleri ve farklılaştıkları hücreler.....	7
Şekil 2: Nöroblastik Tümörlere ait histopatolojik patternler.....	7
Şekil 3: MYCN genomik amplifikasyonu.....	10
Şekil 4: Nöroblastom gelişiminde genetik modeller.....	12
Şekil 5: Ulusal Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS)'nin şekil olarak gösterimi.....	15
Şekil 6: miRNA sentezi, biyogenezi ve RNA interferans mekanizması.....	18
Şekil 7: Pubmed'de miRNA ve miRNA+cancer ile ilgili yayın sayıları (2001-2010).....	21
Şekil 8: Differansiye olmamış (andifferansiye) nöroblastom dokusuna ait resim, x200.....	36
Şekil 9: Az differansiye nöroblastom dokusuna ait resim, x 200. Küçük resim: büyütülmüş hali ile differansiye olmuş ile olmamış tümör hücreleri birarada, x400.....	36
Şekil 10: Differansiye nöroblastom dokusuna ait resim, x 200. Küçük resim: büyütülmüş hali ile differansiye olmuş ile olmamış tümör hücreleri birarada, x 400.....	37
Şekil 11: Benign yapıda ganglionörom (matür) dokusuna ait resim, x 400.	37
Şekil 12: Kemoterapi sonrası diferansiye ganglionörom alanları, fibrosis içeren alanlar ve rezidüv nöroblastom odakları içeren tümör dokusu, x 200.	38
Şekil 13: İyi differansiye-kötü differansiye gruplardaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$).....	40
Şekil 14: İyi differansiye-kötü differansiye gruplardaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$).....	41
Şekil 15: Kemoterapi öncesi ve sonrası örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$)	42
Şekil 16: Kemoterapi öncesi ve sonrası örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$)	43
Şekil 17: İyi histoloji-kötü histoloji gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$)	44
Şekil 18: İyi histoloji-kötü histoloji gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$)	45
Şekil 19: Nöroblastom-ganglionörom gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$)	46

Şekil 20: Nöroblastom-ganglionörom gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$)	47
Şekil 21: Düşük risk-orta risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$)	48
Şekil 22: Düşük risk-orta risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$)	49
Şekil 23: Orta risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$)	50
Şekil 24: Orta risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$)	50
Şekil 25: Düşük risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.05$)	51
Şekil 26: Düşük risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p<0.01$)	52
Şekil 27: Real-time PCR analizi (Validasyon) (miR-490, miR-671, miR-98-5p ve miR-30d-5p).....	53
Şekil 28: Çalışmada yer alan nöroblastom hastalarına ait sağkalım olasılığı eğrisi.....	54

KISALTMALAR

miRNA: mikroRNA

RNA: ribonükleik asit

FFPE: Formalinde fikse ve parafine gömülü

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

TPOG: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu

POG: Pediatrik Onkoloji Grubu

CCG: Çocuk Kanseri Grubu

VMA: Vanil mandelik asit

HVA: Homo-vanilik asit

PHOX2B: Paired like homeobox 2B

ALK: Anaplastik lenfoma kinaz

MYCN: V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma

BARD1: BRCAĞ1 ilişkili RİNG domian-1 ve

LMO1: Lim domian only 1

MKI: Mitotik karyotik indeks

INPC: Uluslararası nöroblastom patolojik sınıflaması

Trk: Tirozin kinaz reseptörü

INSS: Uluslararası nöroblaston evreleme sistemi

pri-miRNA: primer miRNA

pre-miRNA: prekürsör miRNA

mRNA: mesajcı RNA

siRNA: small interfering RNA

nt: nukleotid

cDNA: komplementer DNA

PZR: polimeraz zincir reaksiyonu

RISC: RNA ile indüklenen susturma kompleksi

DGCR8: DiGeorge sendromu critical region 8 proteini

GO: Gene Ontology

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes

NB: Nöroblastom

HPSE: Heparanaz

PPAR γ : peroksizom proliferatörle aktive edilmiş reseptör γ

İTHAF

*‘Hayatımdaki en büyük öğretmen’ olan oğlum **Emre Ergin**’e.....*

TEŞEKKÜR

Projenin mali kaynağını sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü'ne,

Bu çalışmanın planlanmasında, yürütülmesinde, sonuçların yorumlanmasında ve değerlendirilmesinde görüşlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, zamansal açıdan bana sabreden, fikirleri ile bize yol gösteren ve her zaman örnek alacağım danışmanım, Onkoloji Enstitüsü Müdürü **Prof. Dr. H. Nur OLGUN**'a,

Temel Onkoloji doktorasına başlamama sebep olan, bu çalışmanın her aşamasında yanımda olan, bilimsel deneyim ve birikimlerinden çok şey öğrendiğim ve bize laboratuvar olanaklarını tümüyle açan **Prof. Dr. Safiye AKTAŞ**'a

Hasta örneklerinin ve belgelerinin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Gülден DINİZ'a

Derslerinden çok istifade ettiğim Doç. Dr. Zekiye ALTUN, Doç. Dr. Yasemin BASKIN, Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a, yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma, Onkoloji Enstitüsü çalışanlarına

ve her zaman yanımda olan Aileme,

Teşekkürü bir borç bilirim.

Prof. Dr. Kemal Ergin

NÖROBLASTOM MİKRORNA İLİŞKİSİ

Kemal Ergin, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 09100, Aydın, e-mail: kemalergin@hotmail.com

ÖZET

Giriş ve Amaç: Nöroblastom tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturur. MikroRNA (miRNA)'lar küçük ve kodlayıcı olmayan RNA'lar olup gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesinde ve bazı kanserlerin patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu çalışmanın amacı; farklı klinik ve histolojik özellikler gösteren nöroblastom dokularında miRNA ekspresyon profilini saptamaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 17 adet hastanın arşiv parafin bloklarına ait toplam 24 adet farklı örnek kullanıldı. Bu dokular gruplandırılarak 5 ayrı analizde mikroarray ile mikroRNA profilleri karşılaştırıldı:

- I. analiz: İyi differansiye (n=6), andifferansiye (n=6)
- II. analiz: Kemoterapi öncesi (n=3), kemoterapi sonrası (n=3)
- III. analiz: İyi histoloji (n=10), kötü histoloji (n=8)
- IV. analiz: Nöroblastom (n=4), Ganglionörom (n=4)
- V. analiz: düşük risk (n=10), orta risk (n=6), yüksek risk (n=8)

Biyoinformatik analizi sonrasında eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile validasyon yapıldı. Bununla birlikte yüksek ve düşük riskli yeni hastalara ait tümör dokularında valide mikroRNA'lar ile karşılaştırma yapıldı. Ayrıca klinik veriler ile farklı eksprese olan miRNA'lar açısından karşılaştırma yapıldı.

Bulgular: I. analiz'de 25 adet, II. analiz'de 8 adet, III. analiz'de 3 adet, IV. analiz'de 4 adet, V. analiz'de düşük-orta risk için 7 adet, orta-yüksek risk için 1 adet ve düşük-yüksek risk için 14 adet farklı miRNA tespit edildi ($p<0.01$). KEGG yolak analizinde bu miRNA'ların en çok kanser yolağını hedefledikleri saptandı. Klinik veriler ile mikroRNA'lar karşılaştırıldığında en belirgin farklılık miR-132 ve miR-490' de görüldü. Yüksek ve düşük riskli yeni vakaların tümör dokuları arasında en çok kat değişimi miR-98-5p'de belirlendi.

Sonuç: Çalışmamızın mikroRNA'ları hedefleyen tedavilerin gelişimi ve biyomarker çalışmaları için bilgi verebilecek nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: mikroRNA, nöroblastom, ganglionörom

RELATIONSHIP BETWEEN NEUROBLASTOMA AND MICRORNA

Kemal Ergin, Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embriology, 09100, Aydın, e-mail: kemalergin@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: Neuroblastoma tumors, presents % 8-10 of all childhood cancers. MicroRNAs (miRNA) are small and noncoding RNAs which play important roles at regulation of posttranscriptional gene expression and pathogenesis of some cancers. The aim of this study was to determine the miRNA expression profiles of neuroblastomas with different clinical and histological characteristics.

Material and methods: In this study 24 samples from 17 patients paraffin blocks, were used. Tissues were seperated into groups and their microRNA profiles were compared by 5 different analysis:

Analysis I: Well (n=6), poorly (n=6) differantiated

Analysis II: Before (n=3), after (n=3) chemotherapy

Analysis III: Favorable (n=10), unfavorable (n=8) histology

Analysis IV: Neuroblastoma (n=4), ganglioneuroma (n=4)

Analysis V: Low (n=10), middle (n=6), high (n=8) risk

After bioinformatics analysis Real-time PCR was performed for validation. Validated microRNAs were compared of high- and low-risk new patients' tumors. Clinical data were compared with differentially expressed microRNAs.

Results: 25 miRNA in analysis I, 8 miRNA in analysis II, 3 miRNA in analysis III, 4 miRNA in analysis IV, 7 miRNA at low-middle risk, 1 miRNA at middle-high risk, 14 miRNA at low-high risk comparison in analysis V were found different ($p < 0.01$). These miRNA's targeted mostly the cancer pathway by the KEGG pathway analysis. The markedly difference were at miR-132 and miR-490, comparing the clinical data and microRNAs. The most fold change was detected at miR-98-5p between the tissues of high- and low-risk patients.

Conclusion: Our study can be informative for therapies which targets microRNAs and for biomarker studies.

Keywords: microRNA, neuroblastoma, ganglioneuroma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nöroblastom, tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturur (1-9). Prevelansı 7000 canlı doğumda 1 olup ABD'de yılda 800 yeni vaka bildirilmektedir (1-9). Çocukluk çağı kanserleri içerisinde 3. sırada en sık görülen kanserdir (3). Bununla birlikte çocuklarda en sık görülen solid ekstrasaniyal neoplazm olup aynı zamanda 1 yaş altı (infant) çocukluk çağı kanserlerinin en sık nedenidir (3). Nöroblastomlar değişen derecelerde differansiasyon gösterirler: differansiasyonu fazla olan tümörler az olana göre daha iyi prognoz gösterirler (10-23). Yüksek derecede differansiasyon gösteren nöroblastik tümörler genellikle fokaldır ve cerrahi ile tedavi edilebilirler (10-23) Buna karşın az derecede differansiasyon gösteren nöroblastomlar genellikle yayılım gösterirler ve daha agresif seyrederler (10-23). Nöroblastom kompleks ve heterojen bir hastalık olup çok sayıda faktör tümörün spontan regresyona uğrayacağı veya ilerleyip metastaz yapacağı konusunda etkili olur (10-40). Bunlar arasında tanı yaşı, hastalık evresi, tümörün moleküler, hücresel ve genetik özellikleri bulunmaktadır (17-40).

MikroRNA (miRNA)'lar, 17-22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan (noncoding) küçük RNA'lar olup transkripsiyon sonrasında gen ifadesini düzenlemekte rol oynarlar (41-45). miRNA'lar nukleusta RNA polimeraz II vasıtasıyla pri-miRNA'dan pre-miRNA'ya dönüştükten sonra, nukleustan çıkarak sitoplazmada olgun hale gelirler (46-52). Olgun miRNA'lar protein kompleksleri aracılığıyla hedef genlere (mRNA) bağlanarak translasyonel baskılama, mRNA kesilmesi veya transkripsiyonel sessizleşmeye neden olurlar (46-52). Bu sayede birçok hastalıkların ve kanserlerin patogeneğinde rol almaktadırlar.

Karsinogenez sürecinde katkıda bulunduğu gösterilen mikroRNA'ların nöroblastom dahil kanserlerin patogeneğinde önemli roller oynadığı belirtilmektedir (52-71). Yapılan çalışmalarda nöroblastom kaynaklı Myc onkogeninin nöral hücre diferansiasyon ya da apoptoziste etkili olduğu, miRNA'ların ekspresyonlarını doğrudan ya da dolaylı olarak düzenlediği ve miRNA'ların tümörojenik etki gösterebileceği bildirilmiştir (52-71). Buna karşın normal doku ile primer dokunun karşılaştırıldığı bir çalışmada; mikroRNA'ların nöroblastom tümörojeneğinde supresör olarak rol aldığı gösterilmiştir (67). Nöroblastom hücre hatlarında da yapılan in-vitro çalışmalar mikroRNA'ların tümör büyümesinde önemli rol aldığına işaret etmektedir (69).

Kanserler onkogen ve tümör supresör genlerindeki çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliklerle karakterizedir (17-23). Nöroblastomlardan özellikle yüksek riskli olanlar MYCN gibi çeşitli genetik faktörler ile ilişkilidir (24-33). Nöroblastomda uygulanan klasik kemoterapi tedavilerinin yanında yeni tedaviler de denenmektedir. Bunlar arasında kök hücre nakilleri, retinoidler ve GD2 antikoru ile immunoterapi bulunmaktadır (10). Ayrıca nöroblastomda ALK genine yönelik hedefli ilaç tedavileri gibi genetik faktörlere karşı çeşitli tedaviler de denenmekte fakat tam anlamıyla başarı sağlanamamaktadır (10, 16). Son yıllarda nöroblastom tedavisinde bromodomain inhibitörleri gibi epigenetik süreçleri düzenleyici terapiler de gündeme gelmiştir (10). Bu sebeple nöroblastomda epigenomun kendisi ile birlikte epigenetik mekanizmanın ve düzenlemenin araştırılması gerekmektedir. Bu düzenlemedeki en önemli ve etkin rolü mikroRNA'lar üstlenmektedir. Yakın bir gelecekte nöroblastom tümörü için spesifik mikroRNA'ları hedefleyen tedaviler ortaya çıkabilir. Fakat bunun öncesinde nöroblastoma ait tüm klinik ve moleküler durumlara ait mikroRNA profillerinin mikroarray veya genom sekanslamaları ile ortaya konulması gerekmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı farklı klinik ve histolojiye göre ayrılmış nöroblastom dokularına ait mikroRNA ekspresyon profillerini belirlemek ve karşılaştırmaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezi

Farklı klinik ve histolojiye göre ayrılan nöroblastom tümör dokularında mikroRNA profili değişkenlik göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroblastom ve Epidemiyolojisi

Nöroblastom immatür sinir hücrelerinden gelişen bir kanser türüdür. Genellikle adrenal bezlerden başlamakla birlikte abdomen, göğüs veya omurgaya yakın sinirlerde de başlayabilir. Nöroblastoma çoğunlukla 5 yaş altı çocuklarda oluşur ve hatta doğumdan önce başladığı düşünülmektedir. Genelde tümör büyümeye başladığı veya belirti vermeye başladığı zaman saptanmaktadır (1-9).

Nöroblastom, tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturur (1, 2). Nöroblastom insidansı 7000 canlı doğumda 1 olup ABD'de yılda 800 yeni vaka bildirilmektedir (1, 2). Erkek/kız oranı 1.1/1 olup çocukluk çağı kanserleri içerisinde 3. sırada en sık görülen kanserdir (4). Bununla birlikte çocuklarda en sık görülen solid ekstrakraniyal neoplazm olup aynı zamanda 1 yaş altı (infant) çocukluk çağı kanserlerinin en sık nedenidir (çoğunluğu da hayatının ilk ayında tanı alır) (4). Pediatrik onkoloji grubu (POG)' na göre 1986-2001 arası ortalama tanı yaşı 19 ay'dır (10). Bununla birlikte hastaların % 89'u 5 yaş altı ve % 98'i 10 yaşının altındadır (3). Nöroblastomun etyolojisi bilinmemekte ve çevresel etkenlere maruziyetin (ilaç, kimyasal, virus, radyasyon gibi) önemli bir rol oynadığına dair bir veri yoktur (5, 10). Buna karşın ise ürogenital, kardiyak anomaliler gibi konjenital anomaliler ile birlikteliği olduğu bildirilmiştir (10). Nöroblastom tümörleri nöral krest hücrelerinden köken aldıkları için çoğunlukla adrenal medulla, abdomen, pelviste ve daha az sıklıkla göğüste yerleşmektedir (6, 10). Nöroblastomlar küçük, mavi, yuvarlak hücreli tümörler grubundandır. Ewing sarkomu, non-hodgkin lenfoma ve rabdomyosarkomlar da bu gruba örnek tümörlerdir (9). Bununla birlikte nöroblastom tümörleri yüksek seviyede katekolamin ve metabolitlerini (ürede saptanabilen VMA, HVA) üretirler (6).

Nöroblastomlar değişen derecelerde differansiyasyon gösterirler; differansiyasyonu fazla olan tümörler az olana göre daha iyi prognoz gösterirler (6-8). Yüksek derecede differansiyasyon gösteren nöroblastomlar genellikle fokaldır ve cerrahi ile tedavi edilebilirler. Buna karşın az derecede differansiyasyon gösteren nöroblastomlar ise genellikle yayılım gösterirler ve daha agresif seyrederler. Bu sebeple differansiyasyonu arttıran tedaviler belirgin olarak yaşamı uzatırlar. Bununla birlikte bazı çocuklarda tedavi olmadan spontan differansiyasyon gözlenmektedir (6-8). İleri evre nöroblastomlar tedaviye rağmen kötü prognoz göstermekte ve bu durum gen tedavileri dahil olmak üzere yeni tedavi yaklaşımlarını gündeme getirmektedir.

2.2. Nöroblastomda Genetik Yatkınlık

Ailesel nöroblastom

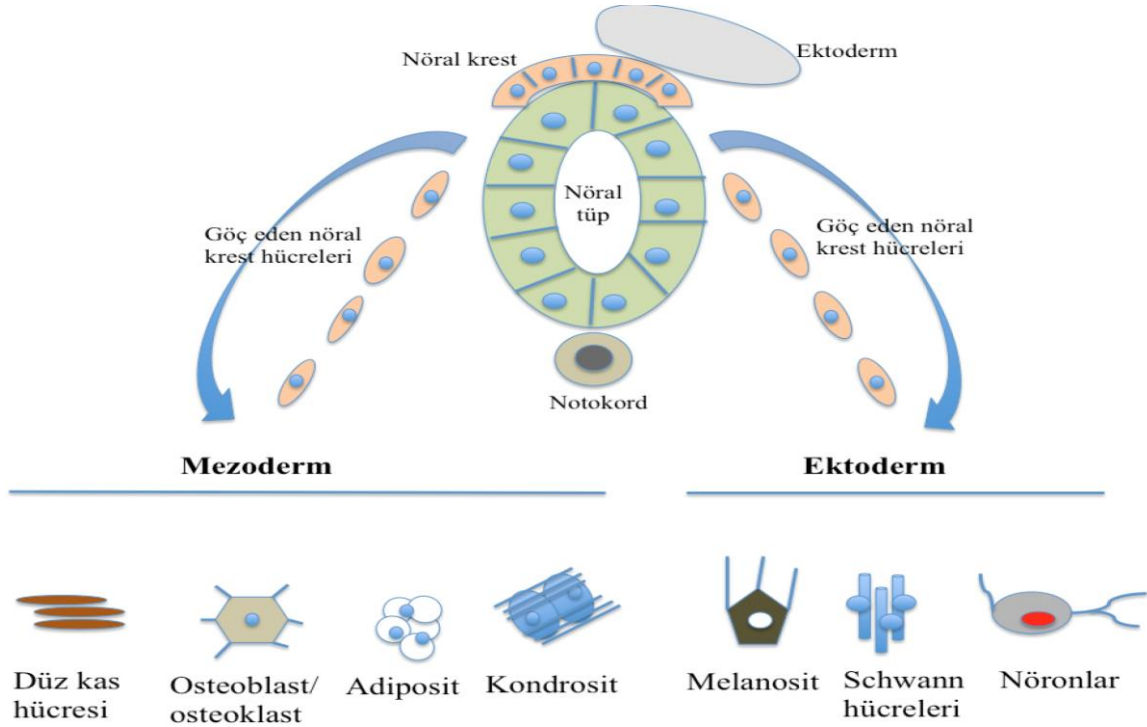
Vakaların % 1-2’de ailesel hikaye vardır (10, 11). Genetik yatkınlık açısından büyük oranda (%65-70) otozomal dominant özelliğe sahiptir (10, 11). Ailesel nöroblastomlar klinik açıdan bakıldığında spontan regresyondan hızlıca metastaza kadar geniş bir yelpaze olmak üzere belirgin bir heterojenite gösterirler. Hirschsprung hastalığı, nörofibromatozis, santral hipoventilasyon sendromu ve feokromasitoma gibi nöral krest kökenli anomalilerle birlikteliği sıktır. Hirschsprung hastalığı’nda RET, EDNRB, EDN3, GDNF, ECE1, ZFHX1B, nörofibromatozis’te NF1, santral hipoventilasyon sendromu’nda RET, GDNF, EDN3, BDNF, PHOX2B genleri ile anomaliler gözlenmekte ve bu genler aynı zamanda nöroblastomun başlamasında veya ilerlemesinde de rol oynamaktadır (12). Belirgin olarak Homeodomain transkripsiyon faktörü olan paired like homeobox 2B (PHOX2B)’deki ve anaplastik lenfoma kinaz (ALK)’deki mutasyonların ailesel nöroblastomun başlamasına yol açtıkları belirtilmektedir (13, 14). Özellikle PHOX2B’in, embriyonik gelişimin erken evrelerinde nöronal gelişim ve differansiasyonda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (15). ALK’daki mutasyonlar ailesel nöroblastomda daha sık görülmektedir. Farelerde yapılan çalışmalar ALK (F1174L) mutasyonunun (en agresif ALK mutasyonudur) nöroblastomu başlattığı gösterilmiştir (16). Ayrıca ALK ve MYCN birlikte ko-eksprese olduğunda tümör gelişiminde sinerjik bir etki yaratmaktadır (16).

Sporadik nöroblastom

Nöroblastomların %98’i sporadik olarak gelişir (10). Multipl ve düşük frekanslı polimorfizmle birlikte dirler. MYCN dışında BARD1 (BRCA-1 ilişkili Ring Domain-1) ve LMO1 (Lim Domain only 1) genetik bozuklukları eşlik etmektedir ve özellikle BARD1-BRCA1 ile heterodimerize olabilmektedir (10). LMO1 duplikasyonu primer nöroblastomların %12’de rapor edilmiştir. Hatta LMO1 siRNA knockdown çalışmaları sonrası hücre çoğalması durmuştur. ALK mutasyonu da sporadik nöroblastomlarda %12,4 oranında gözlenmektedir (10).

2.3. Patogenez ve patoloji

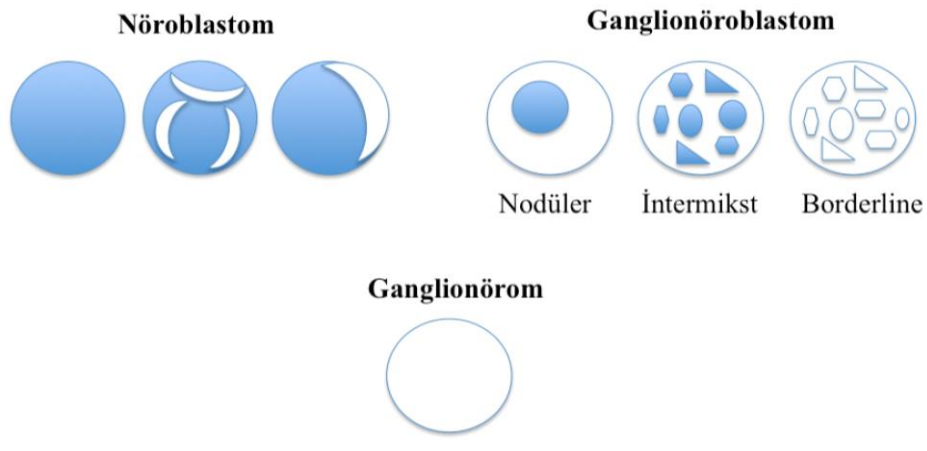
Köken: Nöroblastoma adrenal medulla ya da sempatik nöronlardaki nöronal krest kökenli hücrelerin differansiasyonun bozulmasına bağlı oluşur (Şekil 1) (5).



Şekil 1: Nöral krest hücreleri ve farklılaştıkları hücreler.

Olgunlaşma ve differansiyasyon spektrumu açısından klasik olarak üç adet histopatolojik pattern görülmektedir (Şekil 2):

- 1) Nöroblastom
- 2) Ganglionöroblastom
- 3) Ganglionörom (3)



Şekil 2 : Nöroblastik tümörlere ait histopatolojik patternler.

1) *Nöroblastom*: Tipik olarak nöroblastom komponenti dens, hiperkromatik nukleus ve az sitoplazma içeren küçük, uniform hücrelerden oluşmaktadır. Nöropil (sinaptik olarak yoğun bir bölge olup, az sayıda sinir gövdesi içerir) bulunabilir. Homer-Wright psödorozetleri nöroblastlardan oluşan bir halka olup bir eozinofilik nöropilin merkezini sarar (17). Nöroblastomlar differansiyasyon durumuna göre üç tipe ayrılmaktadır:

a) Andifferansiye (differansiye olmamış) nöroblastom: Küçük-orta boy, yuvarlak, poligonal, koyu boyanan nukleuslu, az sitoplazmalıdır ve nöropil bulunmaz.

b) Az differansiye nöroblastom: Nöropilik bir zemin içerir. Belirgin nukleollü büyük hücreler içerebilir (18).

c) Differansiye nöroblastom: gangliyonik differansiyasyon ve schwannian stroma belirgindir ve yoğun nöropil içerir. Homer-Wright psödorozetleri bulunur.

2) *Ganglionörom*: Tam anlamıyla differansiye olan ve benign özellik gösteren tipte ganglionöromadır. Sıklıkla posterior mediasten yerleşimlidir Olgun gangliyon hücreleri, nöropil ve Schwann hücrelerini içerir. Makroskobik olarak iyi sınırlı ve fibröz kapsüllüdür. Mikroskobik olarak uniform görünümlü düzensiz çaprazlaşma gösteren Schwann hücreleri ve bunların arasında dağılmış olgun gangliyon hücreleri görülmektedir (3, 19-21).

3) *Ganglionöroblastom*: Nöroblastom ve ganglionöromların olgunlaşma bulguları dahil histopatolojik özelliklerini içeren heterojen bir grup tümörü tariflemektedir. Genelde olgun gangliyon hücreleri boyunca ilkel nöroblastlardan oluşmaktadır (3).

‘Olgun nöroblastom’ terimi daha çok %50 oranında (en az) olgun veya olgunlaşmakta olan ganglion hücresi için kullanılmaktadır.

Çok sayıda araştırmacı histolojik özellikleri temel alarak prognostik sınıflandırmalar yapmıştır. “**Shimada sınıflandırması**” günümüzde en fazla kullanılan sistemdir: Hasta yaşı, schwann stroması varlığı veya yokluğu, differansiyasyon derecesi ve mitotik karyotik indeks (MKI) değerlendirmelerini yaparak tümörün iyi (favorable) ve kötü (unfavorable) olarak sınıflandırır (Tablo 1). Son zamanlarda Shimada dahil bir grup önemli çocuk patoloğu Uluslararası Nöroblastom Patolojik Sınıflamasını (INPC) geliştirmiştir (Tablo 2) (3). POG tarafından kullanılan risk şemasında hastalık evresi, hasta yaşı, INPC histopatoloji sınıflandırması, MYCN amplifikasyon durumu, ploidi ve 1p veya 11q’da allelik kayıp bulunmaktadır (22, 23).

Tablo 1: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırması (22).

Shimada	Yaş	Diferansiasyon	Mitoz Karyoreksis İndeksi (MKI)
Prognostik sınıfı			
KÖTÜ	< 18 ay	Andiferansiye	Herhangi
İYİ	< 18 ay	Az diferansiye veya Diferansiye	Düşük (<%2) veya Orta (%2-4)
KÖTÜ	< 18 ay	Herhangi	Yüksek (>%4)
KÖTÜ	18 ay – 5 yıl	Andiferansiye veya Az diferansiye	Herhangi
İYİ	18 ay – 5 yıl	Diferansiye	Düşük (<%2)
KÖTÜ	18 ay – 5 yıl	Diferansiye	Orta (%2-4) veya Yüksek (>%4)
KÖTÜ	> 5 yıl	Herhangi	Herhangi

Tablo 2: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırmasına (Shimada sistemi) göre nöroblastik tümörlere ait prognostik değerlendirme (MKI: mitotik karyotik indeks).

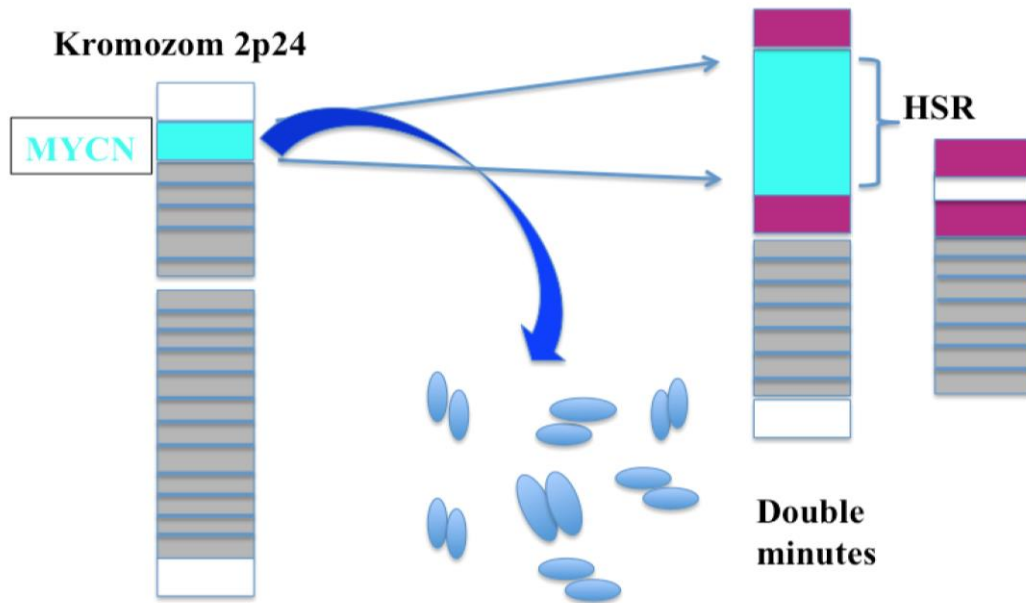
Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırması			Shimada sınıflandırması	Prognostik grup
Nöroblastom		Schwannian stromadan fakir	Stromadan fakir	
	İyi		İyi	İyi
	< 1.5 yaş	Az differansiye veya differansiye olmakta ve düşük veya intermediate MKI tümör		
	1.5-5 yaş	Differansiye olan ve düşük MKI tümör		
	Kötü		Kötü	Kötü
	< 1.5 yaş	a) differansiye tümör b) yüksek MKI tümör		
	1.5 -5 yaş	a) undifferansiye veya az differansiye tümör b) İntermediate veya yüksek MKI tümör		
	≥ 5 yaş	Tüm tümörler		
Ganglionöroblastom, intermikst		Schwannian stromadan zengin	Stromadan zengin intermikst (iyi)	İyi
Ganglionörom		Schwannian stroma dominant		
	Olgunlaş-makta		İyi differansiye (iyi)	İyi
	Olgun		Ganglionörom	
Ganglionöroblastom, nodüler		(kompozit Schwannian stromadan zengin/stroma-dominant ve stroma fakir)	Stromadan zengin, nodüler (kötü)	Kötü

2.4. Nöroblastomda Moleküler Patogenez

- MYCN (N-myc) amplifikasyonu
- 1p36 delesyonu (LOH)
- 11q delesyonu (LOH)
- 17q25 kazanımı (gain)
- Bazı genlerin (Trk, NGF, BDNF) ekspresyonundaki değişiklikler (23)

MYCN (N-MYC) Amplifikasyonu

MYCN kromozom 2'nin distal, kısa kolunda yerleşiktir (2p24) (24). MYCN gen ürününün aktif olarak transkripsiyonda görev alabilmesi için Max proteini ile dimerize olması gerekmektedir (25). Bu genin amplifikasyonu (kopya sayısının artması) iki şekilde görülmektedir: a) Double minutes kromatin cisimcikleri: ekstra küçük kromozom parçaları ve b) HSR (homojen boyanan bölgeler): aynı kromozom içinde bir bölgenin yinelenmesi (Şekil 3). Double minute'ler daha çok primer tümörlerde görülürken HSR'ler daha çok hücre hatlarında görülmektedir (10, 26-29). MYCN overekspresyonu ile tümörün proliferasyonu ve DNA sentezi artar (30). Ayrıca kötü prognoz ile ilişkili olup artmış anjiogenez ve metastazla korreledir (31-33). MYCN geni amplifikasyonu primer nöroblastom tümörlerinde yaklaşık %25-30 oranında gözlenir iken ileri evre olguların % 50'de gözlenebilmektedir (33).



Şekil 3: MYCN genomik amplifikasyonu; homojen boyanan bölgeler (HSR) ve double minute'lar.

1p36 delesyonu (1p36 LOH: loss of heterozygosity)

1.kromozomun kısa kolunda delesyon olmakta ve olguların % 25-35'inde saptanabilmektedir (34). Genellikle MYCN amplifikasyonu ile birlikte (23). Mental retardasyon ve kraniyo-fasyal belirtiler görülebilmektedir (35). TPOG Nöroblastom 2009 protokolünde düşük risk evre 2A-2B olup yaşı 18 aydan büyük ve evre 4S olgularda kromozom 1 aberasyonları dikkate alınmaktadır (10, 22).

11q delesyonu (11qLOH)

Olguların %35-45'inde saptanmaktadır ve kötü prognoz belirteçidir. (10, 22). İlginç olarak bu genomik aberasyon MYCN pozitifliğine sahip tümörlerde genellikle görülmemektedir (10). Buna karşın diğer yüksek riskli özelliklerle (ileri evre, ileri yaş, kötü patoloji) yakın ilişkilidir (10).

17q25 kazanımı (17q25 gain)

Hastaların %50'den fazlasında görülmektedir. Genellikle t (1;17) ve t (11,17) dengesiz translokasyonları şeklinde görülmektedir (10, 22). Kötü prognoz belirteçidir (10, 22). Dengesiz 17q trizomileri nöroblastomlarda sık görülmektedir. Kazanılmış genomik materyale ait olası hedef genler arasında BIRC5, PPMD1 ve NME1 bulunmaktadır (10).

Bazı genlerin ekspresyonundaki değişiklikler

Nörotrofin reseptörleri olan NTRK1 (TrkA), NTRK2 (TrkB) ve ligandları NGF, BDNF'ni içeren yollar nöroblastomların malign dönüşüme neden olduğu düşünülmektedir. TrkA/NGF yolağının aktivasyonu nöroblastların gangliyon hücrelerine farklılaşmasını sağlarken inhibisyonu apoptozise ve dolayısıyla spontan regresyona neden olur. TrkB/BDNF yolağı daha çok hücrelerin ilaç direnciyle ilgilidir. TrkA'nın yüksek ekspresyonu iyi prognoz ve iyi klinik (düşük evre) özellikleri ile ilişkili iken TrkB'nin yüksek ekspresyonu kötü prognoz ve agresif tümör özellikleri ile ilişkilidir (36).

2.5. Nöroblastom gelişiminde genetik modeller

Tip 1:

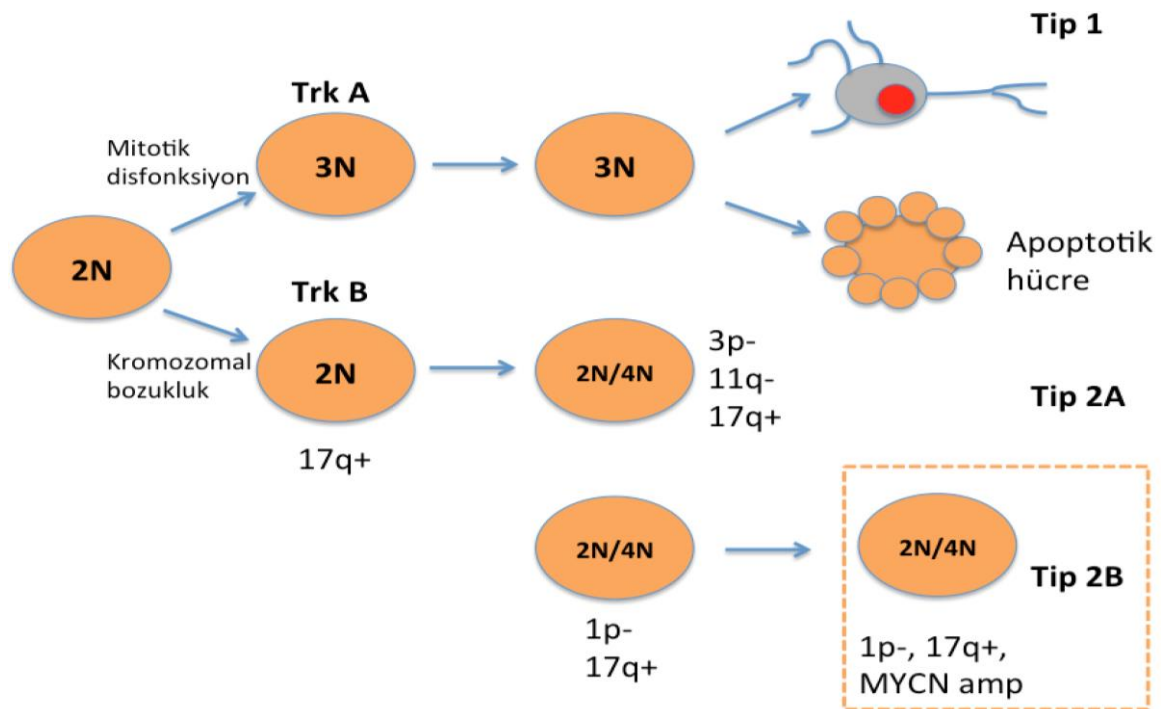
Sıklıkla 1 yaşın altında gözlenmektedir. Hiperdiploid veya triploide yakın karyotip bulunmaktadır. Bununla birlikte TrkA ekspresyonu göstermektedirler. Lokalize hastalık olup iyi prognoz gösterirler (Şekil 4) (22).

Tip 2:

Sıklıkla 1 yaşın üstünde gözlenmektedir. Ayrıca 3p delesyonu, 11q delesyonu veya 17q kazanımı eşlik edebilir. Bununla birlikte TrkB ekspresyonu göstermektedir. Daha ileri evre hastalık grubundadır (Şekil 4) (22).

Tip 3:

Genellikle 1-5 yaş arasında gözlenmektedir. Ayrıca 1q delesyonu veya 17q kazanımı eşlik edebilir. MYCN amplifikasyonu bulunabilir. Bununla birlikte TrkB ekspresyonu göstermektedir. İleri evre hastalık grubundan olup hızlı progresyon gösterirler (22).



Şekil 4: Nöroblastom gelişiminde genetik modeller (22, 36).

2.6. Risk Sınıflandırması

- INSS evresi
- N-myc (MYCN)
- Yaş
- Shimada histolojisi

parametreleri kullanılarak hastalar düşük-orta-yüksek risk grupları olarak değerlendirilmektedir (Tablo 3) (37).

Tablo 3: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastom 2009 Protokolü Risk Sınıflaması (22).

Risk Grubu	INSS Evre	Yaş	MYCN	1p veya 11q veya 17q aberasyonu	Shimada	DNA indeks
Düşük risk	1	0-21 yaş	herhangi	herhangi	herhangi	herhangi
	2A-2B	<18ay	herhangi	herhangi	herhangi	herhangi
	2A-2B	≥18ay	(-)	(-)	herhangi	herhangi
asemptomatik	4S	<12 ay	(-)	(-)	iyi	> 1
Orta risk iyi histoloji	2A-2B	≥18ay	(-)	(+)	herhangi	herhangi
	3	herhangi	(-)	(-)	iyi	>1
	4	<18ay	(-)	(-)	iyi	>1
	4S	<12ay	(-)	herhangi	iyi	> 1
Orta risk kötü histoloji	4	<18ay	(-)	herhangi	iyi	1
	3-4	<18ay	(-)	herhangi	kötü	herhangi
	3	herhangi	(-)	(+)	iyi	herhangi
	4S	<12ay	(-)	herhangi	iyi	1
	4S	<12ay	(-)	herhangi	kötü	herhangi
Yüksek risk grubu	2A-2B	≥18ay	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi
	3	0-21 yaş	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi
	3	≥18ay	(-)	herhangi	kötü	herhangi
	4	≥18ay	herhangi	herhangi	herhangi	herhangi
	4	<18ay	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi
	4S	<12ay	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi

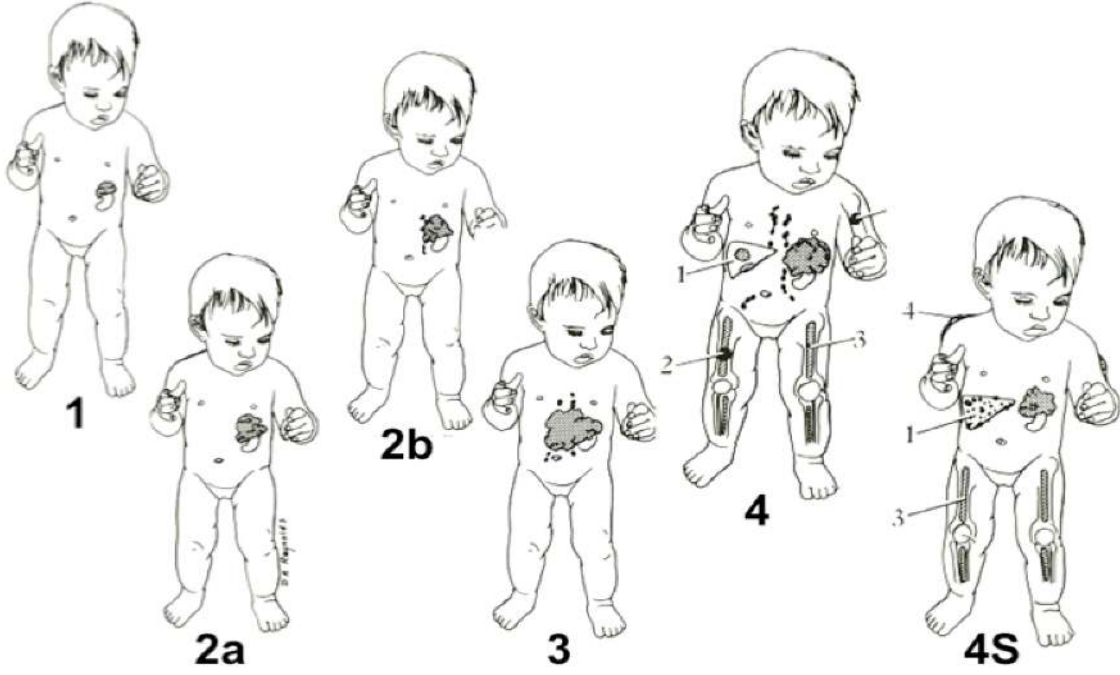
2.7. Klinik tanı ve tedavi

Nöroblastom sempatik sinir sistemi zincirinin herhangi bir yerinden gelişebilir. Genelde abdomen-sürrenal yerleşimlidir, bununla birlikte servikal ve torasik yerleşim gösterebilir. Klinik seyri açısından bakıldığında geniş bir yelpazeye sahiptir: spontan regresyon (özellikle 1 yaş altı) veya ganglionöromaya değişim gibi benign bir geçiş gösterebilmekle birlikte 1 yaş üstünde agresif seyir ve metastaz gösterebilir. Lenfatik ve hematojen yayılım gösterebilir. Hematojen yolla en sık kemik iliği, kemik, karaciğer, akciğer, cilde ve beyin parankimine yayılabilir (22, 38). Tanı için “Uluslararası Nöroblaston Evreleme Sistemi” (INSS) kullanılır (Tablo 4, Şekil 4). INSS, tümörün rezeksiyonu, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz değerlendirmelerini içermektedir (38).

Tablo 4: Uluslararası nöroblastom evreleme sistemi (INSS) (22, 38).

Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi

Evre 1:	Tümör köken aldığı organda sınırlı, makroskopik tam rezeksiyon. Mikroskopik tümör artığı olabilir veya olmayabilir. İpsilateral veya kontralateral lenf tutulumu yok.
Evre 2a:	Unilateral tümör, tam olmayan makroskopik rezeksiyon. İpsilateral veya kontralateral lenf tutulumu yok.
Evre 2b:	Unilateral tümör, tam veya tam olmayan makroskopik rezeksiyon. İpsilateral bölgesel lenf tutulumu var, kontralateral lenf tutulumu yok.
Evre 3:	Orta hattı aşan tümör ± bölgesel lenf nodu tutulumu Unilateral tümör ± kontralateral lenf nodu tutulumu Orta hat tümörü ± bilateral lenf nodu tutulumu
Evre 4:	Yaygın hastalık, uzak metastazlar (kemik iliği, kemik, uzak lenf nodu, karaciğer ve/veya diğer organlar)
Evre 4S:	Hastanın yaşı < 365 gün; Evre 1 ve 2 gibi lokalize primer tümör var; sadece karaciğer, cilt ve/veya kemik iliği tutulumu (kemik iliğinde tümör hücrelerinin oranı < %10 olmalı)



Şekil 5: Ulusal Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS)'nin şekil olarak gösterimi (39).

Tanı Yöntemleri

- Tümör dokusundan histopatolojik inceleme (3)
- Kemik iliği aspirasyonu veya biopsisinde tümör hücrelerinin gösterilmesi (3)
- İdrar veya kan katekolamin (VMA) düzeylerinde artma (3)
- Genetik incelemeler (MYCN, 1q, 11q, 17q) (3)
- Radyoloji (karın ve mediasten için bilgisayarlı tomografi, baş ve boyun için manyetik rezonans, metastaz için pozitron emisyon tomografisi kullanılmaktadır) (3)
- Kemik sintigrafisi (Tc-99 difosfonat ile kemik taramaları ve $^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$ -metaiodobenzyilguanadin ile de kemik metastazı değerlendirilmektedir) (3)

Tedavi

1. Cerrahi:

Tümörü tam olarak çıkarmak için, tanı için yeterli tümör dokusu sağlamak veya hastalığın evresini belirlemek için yapılmaktadır. Bununla birlikte ikincil cerrahi de yapılabilmektedir, bunun da amacı rezidüel hastalığı ortadan kaldırmak ve kemoterapiye yanıtı belirlemektir (3).

2. Radyoterapi:

Nöroblastom radyoterapiye duyarlı bir tümördür. Tümörün yerleşim yeri, büyüklüğü ve hasta yaşı uygulanacak radyasyon dozunu belirlemektir. Özellikle rezidüel hastalıkta ve metastatik hastalık gibi yüksek risk gruplarında uygulanmaktadır (3).

3. Kemoterapi:

Daha çok cerrahinin uygulanamadığı hastalarda ve orta-yüksek grubu hastalara uygulanmaktadır (3).

2.8. Prognoz:

Erken evrede tedavi edilebilir, geç evrede ise 2 yıllık hastalıksız yaşam yaklaşık % 40' dır (40).

Prognozu Etkileyen Faktörler

- 1. Tanı Yaşı:** 1 yaş altındaki olguların prognozu 1 yaş üzerinelere göre daha iyidir.
- 2. Hastalık Evresi:** INSS Evre 1, 2 ve 4S'nin prognozları Evre 3 ve 4'ten daha iyidir.
- 3. Tümör hücre diploidisi (DNA indeksi, miktarı):** Hiperdiploid tümörler (>1), diploid (=1) tümörlere göre daha iyi prognoza sahiptir.
- 4. Tümör patolojisi:** Tümörün stromal komponenti, differansiyasyon derecesi, mitotik indeks (MKI) ve hasta yaşına bağlı olarak tümörler iyi (favorable) ve kötü (unfavorable) histolojik tip olarak değerlendirilmektedir. Nodüler ganglionöroblastom açıkça istenmeyen tiptir.
- 5. MYCN Amplifikasyonu:** Varlığı kötü prognozla ilişkilidir.
- 6. Spesifik bölgelerin allelik kaybı veya kazanımı:** 1p veya 11q delesyonu gibi
- 7. Diğer :** Serum ferritin, NSE, LDH ve dolaşımdaki GD2 gibi markerlar bazen kullanılmaktadır (3).

2.9. MikroRNA

2.9.1. Tarihçe ve miRNA kavramı

miRNA'lar ilk kez Victor Ambros ve ark. tarafından (1993) *Caenorhabditis elegans*'ta lin-4 geni üzerindeki çalışmalarda keşfedilmiştir. Bu genlerde kodlanmayan bir bölgenin (22 nükleotid) olduğunu görmüşlerdir (41). Sonrasında Gary Ruvkun ve ark. (2001) 21 nükleotid uzunluğundaki let-7 mikroRNA molekülünü keşfetmişlerdir (42). Günümüzde miRBase veritabanında (release 21, Haziran 2014) insanlarda 1881 adet öncül, 2588 adet olgun miRNA kayıtlı olarak durmaktadır (43). Bununla birlikte 'RNA interferans- Çift iplikçikli RNA ile genlerin inaktivasyonu' çalışmalarıyla Andrew Z. Fire ile Craig Mello 2006 yılında fizyoloji/Tıp Nobel ödülünü almışlardır (44).

miRNA'lar yaklaşık 18-25 nt'lik RNA molekülleri olup gen ekspresyonunun düzenlenmesinde özellikle posttranskripsiyonel evrede etkilidir. miRNA'lar protein kodlamayan RNA'lar (non-coding RNA) grubundan RNA molekülleridir (45).

2.9.2. miRNA sentezi ve biyogenezi

miRNA'lar ilk olarak RNA polimeraz II tarafından okunur ve uzun bir dizi olan primer miRNA (pri-miRNA) oluşur. Pri-miRNA'larda 5'cap (şapka) ve 3' poli A kuyrukları bulunur (46, 47). Bundan sonra pri-miRNA'lar Drosha (kesici bir enzim, RNaz II) ve DGCR8 (çift zincirli bir bağlanma proteini) vasıtasıyla yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki prekürsör (öncü miRNA) (pre-miRNA)'ya dönüşür (48, 49). Buraya kadar tüm süreçler nükleus içinde gerçekleşir ve miRNA ilmik şeklindedir. Bundan sonra pre-miRNA eksportin 5 proteini aracılığıyla nükleus porlarından geçer ve sitoplazmaya ulaşır (50). Burada DICER (RNaz III) kesici enzimi ve TRBP bağlanma proteini vasıtasıyla pre-miRNA'nın ilmik şekli bozularak tek zincirli hale gelir ve olgun miRNA'ya dönüşür fonksiyonel bir hal alır (51).

miRNA'lar bu aşamada üç esas mekanizma ile etki gösterirler (52):

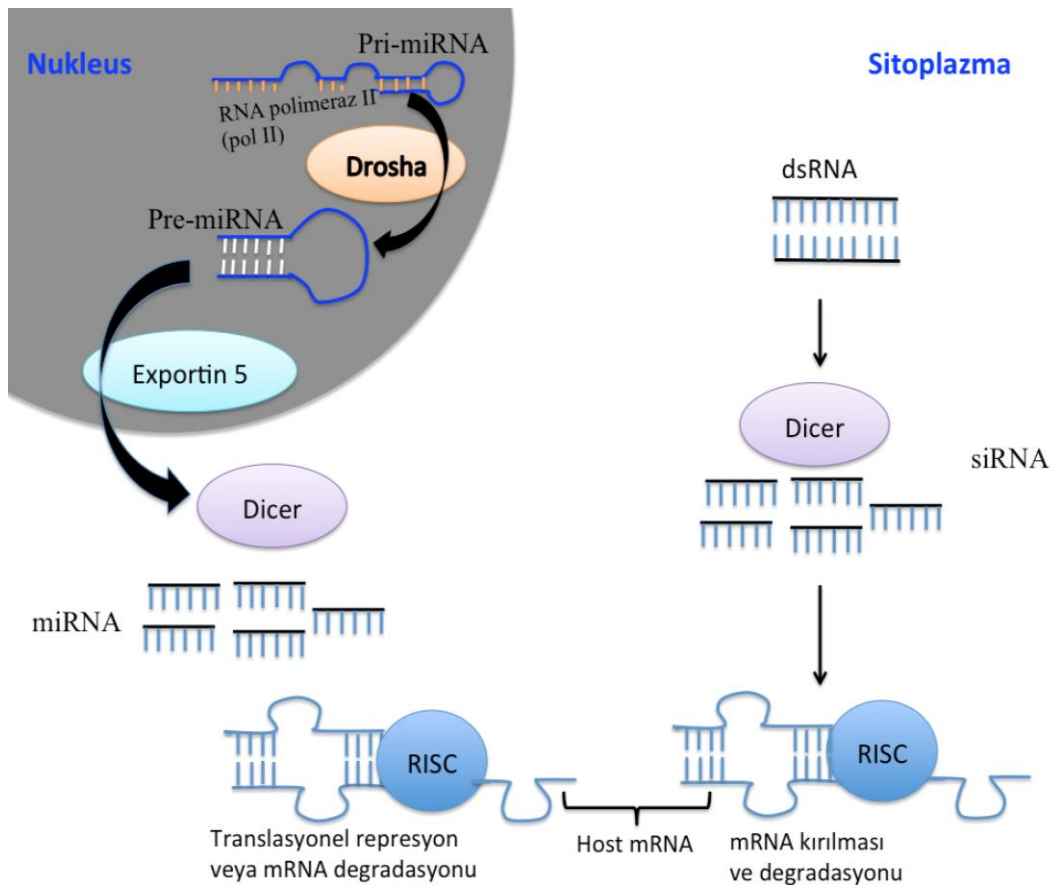
1. Translasyonel baskılama
2. mRNA kesilmesi
3. Transkripsiyonel sessizleşme

RNA interferans mekanizması

miRNA ve siRNA (small interfering RNA) en bilinen ve başlıca iki oyuncularındır. İkisi de benzer mekanizmaya sahiptir ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (53). siRNA'lar dsRNA kaynaklıdır (büyük ölçüde ekzojen), yabancı RNA'ya etki gösterir ve hedefine %100 bağlanır. miRNA'lar ise endojen kaynaklıdır, saç tokası şeklinde olup hedefine %100'lük bir komplementerlik sağlamaz (54).

Tek zincirli hale gelmiş miRNA ve siRNA'lar bir ribonukeloprotein kompleksi olan RNA ile indüklenen susturma kompleksine (RISC) (PRK aktive edici protein, TRBP ve Argonat-2 proteinleri içerir) katılırlar. Sonrasında da hedef gen mRNA'sına tutunarak sustururlar veya baskırlarlar (Şekil 6) (55).

RISC'e bağlı miRNA'lar çok sayıda geni (mRNA) hedefleyip susturabildiği gibi her mRNA'ya da çok sayıda farklı miRNA bağlanabilmektedir (56).



Şekil 6: miRNA sentezi, biyogenezi ve RNA interferans mekanizması.

miRNA'ların düzenlenmesi

Ökaryot hücrelerde miRNA'ların büyük çoğunluğu (%60) genlerin intronik bölgelerinde bulunmaktadır, ancak genler arası bölgelerde (intergenik) veya ekzonlarda da bulunabilirler (52). Ayrıca polisistronik şekilde de kodlanmaktadır. miRNA'lar etkilerini nukleus dışında gösterdiğinden ekspresyonlarının posttranskripsiyonel olarak da düzenlendiği düşünülmektedir (57).

2.9.3. MikroRNA Belirleme Yöntemleri:

- Eş zamanlı-PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) Analiz
- Northern Blot Analiz
- Mikroarray
- İn situ Hibridizasyon
- Sekanslama (Yeni nesil) (58)

miRNA'ların hücrelerde bulunduğu fizyolojik/patolojik durumlar veya miRNA'ların bulundukları hücre tipi göz önüne alınarak miRNA saptama yönteminin öncesinde planlanmış olması gerekmektedir. miRNA'ların saptanmasında en büyük teknik zorluk boyutlarının küçük olması ve guanin-sitozin içeriğinin değişken olmasıdır. miRNA izolasyonu için iki yöntem kullanılmaktadır: total RNA izolasyonu veya doğrudan miRNA izolasyonu. Her ikisi için de ayrı kitler kullanılmaktadır. Bununla birlikte izole edilmek istendikleri hücre (hücre kültürü), doku (taze doku, parafine gömülü doku) ve sıvıya (kan vs) göre de izolasyon kitleri bulunmaktadır. Belirli miRNA'ların ekspresyonu saptanmak istenirse Northern Blot, Eş zamanlı PZR veya in situ hibridizasyon kullanılmaktadır. İn situ hibridizasyon daha çok dokularda (parafin veya frozen) proplar vasıtasıyla spesifik miRNA'ları saptamak için tercih edilmektedir. Eş zamanlı PZR'ın yelpazesi daha geniş olup birçok hücre, doku ve sıvıda çalışmaktadır ve spesifik miRNA'ları saptamaktadır. Mikroarray'ler veri bankalarındaki son ve güncel miRNA probları içeren çip (chip) kullanılarak miRNA profillemesi yapmaktadırlar. Sekanslama tüm genom taraması sonrası biyoinformatik analiz ile veri bankalarında olan veya olmayan (yeni) miRNA'ları da saptama yeteneğine sahip olmakla birlikte tüm miRNA belirleme yöntemleri içerisindeki en pahalı yöntemdir. Günümüzde en sık kullanılan miRNA saptama yöntemleri mikroarray ve eş zamanlı PZR'dır.

Mikroarray

Mikroarray yönteminde temel prensip nükleik asitlerin çip üzerindeki probe komplementerleriyle hibridizasyonudur. Hibridizasyon öncesi nükleotidler için floresan işaretleme yapılır: Bir renk (tüm örnekler aynı renk ile işaretlenir) ve iki renk (kontrol ve deney örnekleri farklı iki renkle işaretlenir) işaretleme yapılabilir. Hibridizasyonla işaretlenmiş moleküller tarayıcılar tarafından okunur ve ortaya çıkan floresan ışıma değerine bakılır. Tarama sonrası veri normalizasyonu (quantile veya scatterplot) ve biyoinformatik analizler yapılmaktadır. Mikroarray çok sayıda miRNA ekspresyonunun saptanabildiği ucuz, hızlı ve güvenilir bir metoddur (59).

Eş Zamanlı PZR

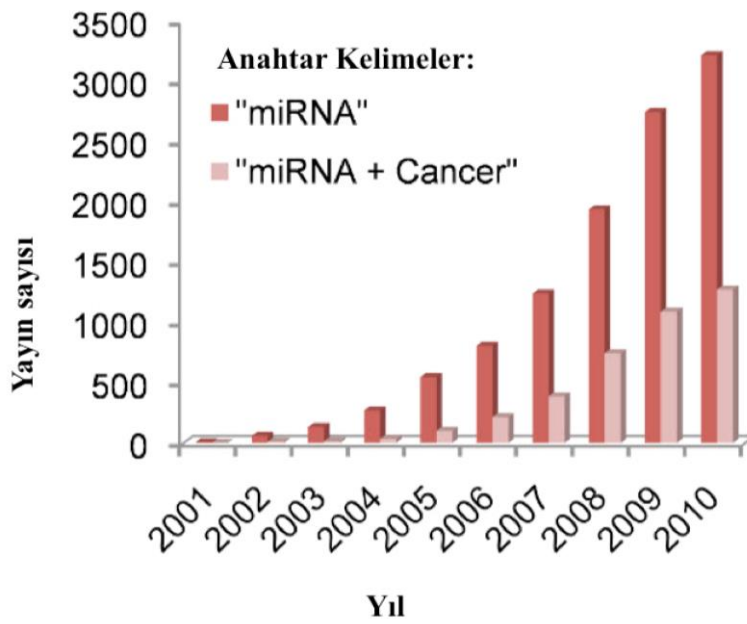
Eş zamanlı PZR miRNA mikroarray ekspresyon analizlerinden sonra validasyon (doğrulama) amacıyla yapılmaktadır. Örneklerden total RNA veya miRNA izolasyonu yapıldıktan sonra bunlar cDNA'ya çevrilmektedir. miRNA'ların amplifikasyonu zor olduğundan bunlara Poli A (AAA) kuyruğu eklenmekte ve sonrasında cDNA'ya çevrilerek PZR ile çoğaltılmaktadır. Bu amaçla spesifik miRNA primer Taqman problemleri veya Syber Green ile işaretleme metodu kullanılmaktadır. Eş zamanlı PZR cihazında her bir örneğin ışıma miktarına ait amplifikasyon eğrileri çizilmektedir. Cihazın saptadığı sıklusa ait eşik değere Ct (threshold of cycle) değeri denilmektedir. Bu değerler genellikle kontrol housekeeping gen/miRNA ile kıyaslanarak normalize edilmektedir. miRNA çalışmalarında housekeeping genleri olarak sıklıkla SNORD 48 veya U6 kullanılmaktadır. Örnekler arası karşılaştırma yapıldığında kat değişimleri baz alınmakta ve bunun için karşılaştırmalı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılmaktadır.

2.9.4. MikroRNA veritabanları ve hedef gen belirleme araçları

miRNA'lar (olgun ve öncül) için en sık kullanılan ve tüm türleri barındıran veritabanı miRBase (www.mirbase.org)'dir. miRNA'lar için hedef gen tahminin yapıldığı veritabanlarında bazıları, Target Scan, MiRanda, TarBase, PicTar ve DianaTools'dur. miRNA ekspresyon paternleri için sıklıkla kullanılan veritabanları microRNA.org, miRdb.org ve GEO'dur. Yeni nesil sekanslama verilerinin analizinde kullanılan veritabanları miRDeep, miRNAkey, ProMIR, miReduce ve miRanalyzer'dır.

2.9.5. MikroRNA ve Kanser

RNA interferans mekanizmasının 2006 yılında Nobel ödülünün almasının ardından miRNA ile ilgili çalışmalar büyük bir artış göstermiştir. Bu artış özellikle kanser çalışmalarında olmuştur (60). Pubmed verilerine göre 2010 yılı ile günümüzdeki miRNA ve kanser ilişkili çalışmalar arasında 15 katlık bir artış meydana gelmiştir ve halen de giderek artan bir oranda devam etmektedir (Şekil 7).



Şekil 7: Pubmed’de miRNA ve miRNA+cancer ile ilgili yayın sayıları (2001-2010).

08 Ocak 2012 tarihi itibarıyla

miRNA: 14.036

miRNA and cancer: 5.379 (% 38)

10 Temmuz 2015 tarihi itibarıyla

miRNA: 40.162

miRNA and cancer: 17.645 (% 43)

miRNA and neuroblastoma: 254 (miRNA: % 0.6, miRNA and cancer : % 1.4)

miRNA'lar gen ifadesinde çok önemli görevlere sahip olduğundan düzensizlikleri sonucunda kanser dahil bir çok hastalığın patogeneğinde rol oynarlar (61). miRNA'ların çoğunun kanserle ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya heterozigotenin kaybolduğu kırılğan bölgelerde yerleşik olduğu gösterilmiştir. Bu kırılğan bölgeler amplifikasyonun minimal olduğu veya genel kromozomal kırılma noktası bölgeleridir. Burdaki lezyonlar sonucu oluşan genetik hasar kanserlere neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar miRNA'ların kanserlerin gelişiminde, büyümesinde rol oynadığını göstermektedir. Bu sebeple miRNA'ların diagnostik ve prognostik potansiyele sahip olduğu yaygın bir görüştür (62).

Kanserlerde fonksiyonel açıdan bakıldığında mikroRNA'lar 2 gruba ayrılırlar (63):

- 1) "Tümör supresör miRNA(TS-miR)": Tümör baskılayıcı gen ekspresyonu yaparlar veya onkogenleri baskırlarlar (63). Örneğin let-7 tümör baskılayıcı miRNA'dır ve genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunur (60).
- 2) "Onko-miR": Onkogen ekspresyonu yaparlar. Hücre çoğalmasını engelleyen ve apoptozu kontrol eden genlerin etkinliğini azaltır (64).

2.9.6. Nöroblastom ve mikroRNA ilişkisi

MikroRNA'ların nöroblastom patogeneğinde de önemli roller oynadığı belirtilmektedir (65-71). Chen ve Stalling nöroblastom kaynaklı Myc onkogeninin nöral hücre differansiasyon ya da apoptoziste etkili miRNA'ların ekspresyonlarını doğrudan ya da dolaylı olarak düzenleyerek tümörojenik etki gösterebileceğini bildirmişlerdir (66). Welch ve ark.larının normal doku ile primer tümör dokularını karşılaştırdıkları çalışmada miR-34a'nın nöroblastom tümörogeneğinde supresör olarak rol aldığını göstermişlerdir (67). Laneve ve ark. ları, miR-9, miR-125a ve miR-125b'nin neurotrophin reseptör tropomyozin ilişkili kinaz C'yi baskılayarak additif tarzda rol aldığını göstermişlerdir. Bu baskılanmanın nöroblastom hücre çoğalmasının regülasyonu için kritik olduğunu belirlemişlerdir (68). Nöroblastom hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmalar miR-184'ün apoptoziste önemli rol aldığını işaret etmektedir (69). Başka çalışmalarda da tedavide potansiyel hedef olarak çok sayıda mikroRNA belirlenmiştir (Tablo 5 ve 6) (70, 71).

Tablo 5: Nöroblastom tedavisinde potansiyel hedef mikroRNA'lar (70).

miRNA	Hedef gen	Fonksiyon	Tip	Referans
miR-17-5p-92 kümesi	TGF-b, CDKN1A	Hücre proliferasyonu, adhezyon	Onkogen	Fontana (2008) Mestdagh (2010)
miR-34a	MYCN, Bim, E2F3	Hücre siklusu, apoptoz, DNA tamiri, angiogenez	Tm supressor	Welch (2007) Cole (2008)
miR-184	Akt-2	Nöral farklılaşma ve apoptoz	Tm supressor	Foley (2010) Tivnan (2010)
miR-380-5p	p53	Apoptoz	Onkogen	Swarbrick (2010)
miR-9	E-cadherin, tropomyozin C	Angiogenez, metastaz	Onkogen	Ma (2010) Goodall (2010)
miR-125a	Bmf, tropomyozin C	Hücre proliferasyonu, apoptoz	Onkogen	Laneve (2007)
miR-125b	Bmf, tropomyozin C	Hücre proliferasyonu, apoptoz	Onkogen	Laneve (2007)
miR-152	CHUK, CUL5, GADD45A	Nöroblast farklılaşması, migrasyon/invazyon, apoptoz	Onkogen	Ragusa (2010)
miR-338	PTPRT	Nöroblast farklılaşması, apoptoz	Onkogen	Ragusa (2010)
miR-200B	ZEB1	Nöroblast farklılaşması, migrasyon/invazyon, apoptoz	Tm supressor	Ragusa (2010)

Tablo 6: Prognostik belirteç olarak yirmibeş adet mikroRNA (71).

Yüksek riskli hastalarda yüksek ekspresyon	P değeri (univariate lojistik regresyon)	Düşük riskli hastalarda yüksek ekspresyon	P değeri (univariate lojistik regresyon)
hsa-miR-17	6.01E-04	hsa-miR-125b	9.16E-04
hsa-miR-18a	4.72E-04	hsa-miR-26a	1.19E-03
hsa-miR-18a*	4.72E-04	hsa-miR-190	9.14E-04
hsa-miR-19a	4.93E-04	hsa-miR-30c	1.47E-04
hsa-miR-20a	3.31E-04	hsa-miR-326	1.39E-04
hsa-miR-20b	9.29E-04	hsa-miR-488	2.04E-04
hsa-miR-92a	8.95E-05	hsa-miR-500	8.09E-04
hsa-miR-15b	1.38E-04	hsa-miR-628	7.61E-05
hsa-miR-572	3.16E-04	hsa-miR-485p	9.00E-04
hsa-miR-192	1.51E-03	hsa-miR-542-3p	9.04E-04
hsa-miR-25	1.08E-04	hsa-miR-204	2.45E-04
hsa-miR-320	8.37E-04		
hsa-miR-345	5.43E-04		
hsa-miR-93	2.85E-04		

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi:

Çalışma kesitsel tipte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışmanın materyal/örnek toplama bölümleri Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim-Araştırma Hastanesi'nde (2012-2013), değerlendirme bölümü ise Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji AD'da (2013-2015) yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi:

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim-Araştırma Hastanesi ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Onkolojisi Servisleri'nde tanı ve tedavi alan nöroblastom hastaları ve bunlara ait arşiv primer nöroblastom tümör dokuları.

3.4. Çalışma Materyali

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim-Araştırma Hastanesi'nden alınmış (2012-2013) parafine gömülmüş primer nöroblastom tümör dokuları (arşiv materyali: 2005-2012 tarihleri arasında tanı alan nöroblastom hastalarına ait dokular)

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: Nöroblastoma

Bağımlı değişken: miRNA ekspresyon düzeyleri (profili)

Tümörün patolojik tipi: Patolojik tanısı, histolojisi ve differansiyasyon durumuna bakılarak elde edilmiştir.

Tedavi: Hastanın kemoterapi alıp almadığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Cins: Kız ve erkek olarak belirtilmiştir.

Yaş: Tanı anındaki yaşı patoloji sonuç raporu tarihinden biopsi tarihi çıkarılarak elde edilmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Araçlar ve Gereçler

3.6.1.1 Tez çalışmasında kullanılan Gereçler

- EZ-PZR (validasyon).....Roche Light Cycler 480
- EZ-PZR (risk analizinde moleküler belirteç).....Roche Light Cycler Nano
- Nanodrop spektrofotometreThermo Scientific
- Mikrotom.....Leica RM2125RT
- Mikroarray cihazı LC Sciences
- Buzdolabı (+4 ve -20 derece).....Arçelik 450 lüks

3.6.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Mikroarray mikroçip (LC Sciences, miR Base v.19)
- RNA izolasyon kit (Trizol)
- cDNA kit (Exiqon)
- MikroRNA primerleri (4 adet ve kontrol) (Exiqon)

3.6.2. Veri (Dokuları) Toplama

- Hasta parafin dokuları Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim-Araştırma Hastanesi Pediatrik Onkoloji bölümlerinde tanı ve tedavi alan nöroblastom olgularının arşivlerinden (2005-2012 arası nöroblastom tanısı alan dokulardan) alındı.
- Her bir bloktan Hematoksilen-eosin boyalı preparattan uygun tümör bölgesi mikroskopta seçildikten sonra blok üzerinden makrodiseksiyon yöntemi ile bistüri yardımı ile 2x2x3 mm boyutta parafinlenmiş doku çıkarılmıştır.
- Ayrıca risk analizi yapmak için hastalara ait patoloji raporları ve TPOG-2009 veri tabanına kayıtlı hastalar için buradaki bilgiler kullanıldı.

3.6.3. Risk Sınıflandırması

Hastalara ait risk analizi yapmak için aşağıdaki parametreler kullanıldı:

1. Tanı yaşı

2. Moleküler Belirteçler (Eş zamanlı PZR ile saptandı):

- MYCN
- 1p36 LOH
- 11q1OH
- 17q25 gain

3. Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırması (Shimada Sistemi)

4. Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS)

3.6.4. Gruplama

mikroRNA profili için örnekler aşağıdaki şekilde gruplandırıldı ve 5 ayrı analiz ile karşılaştırma yapıldı:

I. Analiz

Grup 1: İyi differansiye (n=6)

Grup 2: Kötü differansiye (n=6)

II. Analiz

Grup 3: Kemoterapi öncesi (n=3)

Grup 4: Kemoterapi sonrası (n=3)

III. Analiz

Grup 5: İyi histoloji (n=10)

Grup 6: Kötü histoloji (n=8)

IV. Analiz

Grup 7: Nöroblastom (n=4)

Grup 8: Ganglionörom (n=4)

V. Analiz

- a) Grup 9: Düşük risk (n=10)
Grup 10: Orta risk (n=6)
- b) Grup 10: Orta risk (n=6)
Grup 11: Yüksek risk (n=8)
- c) Grup 9: Düşük risk (n=10)
Grup 11: Yüksek risk (n=8)

3.6.5 Mikroarray (mikroRNA) Analizi

3.6.5.1 Makrodiseksiyon

Parafin bloklardan öncelikli olarak hematoksilen ve eosin boyalı preparatlar elde edildikten sonra uygun tümör bölgesi mikroskopta seçildi ve sonrasında her bir parafin bloktan biopsi iğnesi ya da bistüri yardımıyla ve makrodiseksiyon yöntemi ile 2x2x3 mm boyutta parafinlenmiş doku çıkarıldı. Bu dokulardan mikrotom yardımı ile 20 µm'luk kesitler alındı.

3.6.5.2. RNA İzolasyonu

RNA Ekstraksiyonu

- Dokuları trizol ile muamele edip havan ile homojenize edildi.
- Oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
- 200 µl chloroform / 1 ml Trizol ekleyip vortekslendi.
- Oda ısısında 10 dk beklendi.
- Soğutmalı santrifüjde (4 °C) 15 dk boyunca 11.000 rpm santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üç bölüme ayrılan tüpte üst aköz (akışkan sıvı) kısmın (RNA'nın bulunduğu bölüm) % 80'i alınarak yeni bir tüpe aktarıldı.

RNA Presipitasyonu

- 0.5 ml isopropanol/ 1ml Trizol eklendi ve vortekslendi.
- Oda ısısında 10 dk bekletildi.
- Soğutmalı santrifüjde (4 °C) 15 dk boyunca 11.000 rpm santrifüj edildi.
- Pellete dokunmadan süpernatant pipet yardımı ile uzaklaştırıldı.

RNA yıkama

- 1 ml %75'lik soğuk etanol (%25 DEPC su) ile yıkandı ve vortekslendi.
- Soğutmalı santrifüjde (4 °C) 5 dk boyunca 9.000 rpm santrifüj edildi.
- Pipet yardımı ile süpernatant uzaklaştırıldı.
- Oda ısısında 10-15 dk kurumaya bırakıldı.

Solubilizasyon

- Isıtıcı bloklara (55°C) su eklendi.
- RNA pelletini 100 µl elüsyon tamponunda çözündürüldü ve vortekste karıştırıldı.
- Isıtıcı blokta (55°C) 5 dk inkübe edildi.

DNAase Uygulama

- 10 µl DNAaz buffer (10x) eklendi.
- 1 µl DNAaz I eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı.
- İnkübatörde (37 °C) 30 dk inkübe edildi.
- 11 µl DNAaz inaktivasyon reagentı eklendi oda ısısında 2 dk inkübe edildi.
- Santrifüjde 1 dk boyunca 11.000 rpm santrifüj edildi.
- Süpernatant (%90 ı) yeni bir mikrosantrifüj tübe transfer edildi.

RNA rekonsantrasyonu

- 1 µl akrilamid eklendi.
- 10 µl amonyum asetat (5M) ve ardından 300 µl etanol (%100) eklendi.
- -20 °C'de 1 saat bekletildi.
- Supernatant uzaklaştırıldı, 30 dk kuru bırakıldı.
- 50 µl elüsyon tamponunda dilüsyon yapıldı.
- Pipetle karıştırıldı ve buzda bekletildi.

RNA kantifikasyonu

- Mikrosantrifüj tüpü hazırlandı (498 µl DNAse/RNase free su+ 2 µl elüsyon buffer).
- Örnek hazırlandı (498 µl su+ 2 µl RNA(premikst)) ve vortekslendi.
- Arta kalan RNA'ya 20 µl amonyum asetat ve 200 µl etanol (%100) eklendi.

Spektrofotometrik Okuma

Nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific) ile RNA kaliteleri ölçüldü. A260/A280 değeri 1.8 nm üstünde olanlar (özellikle 1.8-2.0 arası) çalışmaya dahil edildi.

3.6.6. Mikroarray

3.6.6.1 Genel İlke:

Mikroarraylerde temel prensip, çalışılacak örneklerin (izole edilmiş DNA, mRNA veya miRNA'ların) küçük çiplere aktarılmasından sonra floresan probalar ile işaretlenip hibridize edilmesi ve sonrasında tarayıcı vasıtasıyla taranmasıdır. Bunun amacı örneklerle bağlanan problemlerin yaydıkları ışını tespit etmektir. Bu ışınma düzeyine göre de bir değer verilerek biyoinformatik araçlar ile analiz edilmektedir. miRNA ekspresyon profili incelenerek hedefledikleri genleri ve bu genlerin olası fonksiyonları hakkında ipucu elde edilmektedir.

Dolayısıyla dokulardan total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra mikroarray ekspresyon analizi için sırasıyla şu işlemler yapılmaktadır; örnekleri işaretleme (labelling), hibridizasyon, yıkama ve tarama (scanning).

3.6.6.2 Uygulama Basamakları

Mikroarray Analiz

1. Örnekleri işaretleme (RNA labeling):

- Total RNA 5'pCU-DY547-3'(0.5 µg), HEPES ve BSA (sentetik linker, cyanin 3, T4 RNA ligaz, dithiothreitol (DTT) içeren) tampon içinde 5'pCU-DY547-3'(0.5 µg) ile karıştırıldı.
- Örnekler buz üstüne alınarak buzdolabında 24 h bekletildi.
- RNA 0.3 M sodyum asetat ve etanol içinde presipite edildi.
- Floresan bağlı nükleik asit işaretli kitler kontrol olarak kullanıldı.

2. Hibridizasyon:

- Hibridizasyon tamponu (3X) 65 °C'de ısıtıldı.
- Arraylerin kurumasını önlemek için 5-6 damla SSC eklendi.

- Array (slayt'lar) hibridizasyon çemberine konuldu, bu arada arraylerin yüzeylerinin çizilmemesi için dikkat edildi.
- RNA miktarı saptanarak (yaklaşık 20 µl) bunun yarısı (10 µl) hibridizasyon tamponu içine konuldu.
- Denatüre örnekler ısıtıcı bloklarda (95 °C'de) 2 dk tutularak ısıtıldı.
- Örnekler alınarak hibridizasyon çemberine kapatıldı.
- Sonrasında da örnekler 42 °C'lik su banyosuna transfer edilerek bırakıldı (12-16 h).

3. Yıkama:

- Yıkama solüsyonlarını içeren slayt kutuları hazırlandı.
- Hibridizasyon çemberi yavaşça su banyosundan alındı.
- Slayt'lar çemberden ayırarak slide kutularına konuldu.
- Burada slayt'lar iki aşamalı olarak yıkandı: düşük şiddet sıvıda (deterjan, tuz ve su kombinasyonu içeren) yüksek şiddet sıvıda (tuz ve su kombinasyonu içeren)
- Slayt'lar 3 dk, 800 rpm'de santrifüj edildi.
- Slayt'lar plastik slide kutusuna yerleştirildi ve tarama işlemine geçildi.

4. Tarama (scanning):

Floresan işaretli slaytlar tarayıcı (scanner) vasıtasıyla taranarak ışımaya düzeyine göre bir değer verildi.

MikroRNA profillemesi için µParaflo teknolojisi içeren LC Sciences çipleri (miR Base version 19) kullanıldı. Sanger veri bankasına dayanan bu çip içerisinde yaklaşık 2019 olgun miRNA (insan) ve 50 kontrol miRNA probu bulunmaktaydı.

3.6.7. Eş zamanlı PZR ile Validasyon

3.6.7.1 Genel İlke:

Mikroarray sonuçlarının doğruluğunu kontrol etmek (valide etmek) amacıyla sonuçlar başka bir yöntem ile konfirme edilmektedir. Bunun için farklı eksprese olan miRNA'lerden bazıları seçilerek aynı örnek grupların izole RNA'ları ile eş zamanlı PZR yapılmaktadır. Çalışmamızda farklı eksprese olan 4 adet mikroRNA kullanıldı: miR-30d-5p, miR-490, miR-671 ve miR-98-5p.

3.6.7.2 Uygulama Basamakları

Her örnek için 5ng/μl RNA stokları hazırlandı ve cDNA'da bu stoklar kullanıldı. Universal cDNA sentez kiti (Exiqon) ile cDNA sentezi yapıldı.

Tek bir reaksiyon için

RNA örneği (5ng/ul)	4 μl
Nukleaz Free Water	9 μl
5x Reaction Buffer	4 μl
Spike in RNA	1 μl
<u>Enzim mix</u>	<u>2 μl</u>
Toplam	20 μl

Tüpler thermal cycler a yerleştirildi ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırıldı.

42°C 'de	60 dk
95°C'de	5 dk
4°C'de	bekleme

Eş zamanlı PZR :

Elde edilen cDNA'lar 80x dilue edildi (5 μl cDNA + 395 μl su) ve housekeeping gen ve cDNA kontrolü spike-in primerleri ile kontrol edildi. Bu çalışmada housekeeping gen olarak Snord48 kullanıldı ve eş zamanlı PZR'da yürütüldü. cDNA'ların Snord48 ve spike in sonuçları Ct değerleri açısından Ct15-29 arasında olanlar, aşağıda belirtilen miRNA'lar için mikroRNA LNA™ primer setleri (Exiqon) kullanıldı ve aşağıdaki miks ve cihaz protokolleri ile çalışıldı. Elde edilen örneklerin cDNA'sı, Roche LightCycler 480II cihazı ile çalışıldı.

miRNA primerlerinin hazırlanışı:

miRNA primerleri için liyofilize primer tüplerine 220 μl nükleaz free su eklenerek 20 dakika oda ısında beklendi, vorteks ve spin edilerek kullanıma hazır hale geldi (bu primerler 10 μl reaksiyon hacminde 200 reaksiyonluktur).

Miks hazırlanışı:

Tek Reaksiyon için

cDNA	4 μl
Primer miks	1 ul
<u>Enzim ve dNTP miski (PZR Master mix)</u>	<u>5 μl</u>
Toplam	10 μl

Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklenerek reaksiyon sayısı kadar konuldu ve reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım spin ettirilip plate'lere her bir reaksiyon için 6 µl reaksiyon karışımından transfer edildi. 4 µl cDNA örnek her bir kapillere son reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler (karışım ilave edildikten sonra) 2000 rpm' de 15 saniye santrifüjlendi.

Sonuçların Analizi: Elde edilen sonuçlardan relatif kantitasyon yapabilmek için Δ/Δ Ct metodu kullanıldı. Bu metod ile miRNA Ct değerleri Snord48 house keeping geni ile normalize edildi. (bu değer Δ Ct olarak geçmektedir). Eşik değeri geçen siklusa ait kat değişimleri için de karşılaştırmalı 2- $\Delta\Delta$ Ct metodu kullanıldı. Kat değişimleri 2 ve üstü değerde olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

3.6.8. Eş Zamanlı PZR ile Yeni Vakalarda Analiz

Nöroblastom hastalarına ait izole RNA'ları ile çalışıldı: Yüksek riskli hastalar (n=24) ve düşük riskli hastalar (n=14). Her örnek için 5ng/ul RNA stokları hazırlandı ve cDNA'da bu stoklar kullanıldı. Universal cDNA sentez kiti (Exiqon) ile cDNA sentezi yapıldı. MikroRNA primeri olarak validasyon çalışmasında da kullanılan miR-30d-5p, miR-490, miR-671 ve miR-98-5p ve kontrol primeri olarak Snord49 primeri kullanıldı. Analiz için Δ/Δ Ct metodu kullanıldı (miRNA ct değerleri Snord48 house keeping geni ile normalize edildi). Eşik değeri geçen siklusa ait kat değişimleri için de karşılaştırmalı 2- $\Delta\Delta$ Ct metodu kullanıldı. Kat değişimleri 2 ve üstü değerde olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

3.6.9. Klinik Veriler ile miRNA Karşılaştırması

Biyoinformatik analizler sonrasında $p<0.01$ olan tüm miRNA'lar baz alındı ve aşağıdaki özellikler dikkate alınarak karşılaştırmalar yapıldı:

- Hastaların cinsiyeti
- Yaş (18 ay öncesi ve sonrası)
- Hastaların risk grubu (düşük-orta-yüksek)
- Metastaz varlığı veya yokluğu
- Nöroblastom patoloji tanıları (Nöroblastom, ganglionörom, ganglionöroblastom)
- Moleküler belirteç (NMYC, 1q, 11q, 17q)
- Tümör özelliği (primer, metastaz)
- Histoloji (kötü, orta, iyi, intermiks, matür)

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tezin hazırlanması/hazırlık	Ekim 2011
Teze ait analizlerin şekillenmesi	Haziran 2012
Örneklerin Toplanması	Eylül 2012-Ocak 2013
Mikroarray Analizleri	Eylül 2013
Biyoinformatik Analizler	Ocak 2014
Eş zamanlı PZR validasyon	Nisan 2014
Tez Yazımı	Ocak-Temmuz 2015

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. Biyoistatistik Yöntem

Sonuçların istatistiki değerlendirmesi SPSS 19.0 (IBM, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Klinik verilerin ölçüm verisi olan miRNA ekspresyonu açısından karşılaştırmasında karşılaştırılacak iki gruptaki örnek/hasta sayısının 30'dan az olması sebebiyle nonparametrik testlerden biri olan Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Sağkalım analizi için Kaplan-Meier analizi kullanılmıştır. Genel sağ kalım tanı tarihinden son takip süresi veya ölümüne dek geçen süre olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada yer alan hastalarda nöroblastom tümörü dışında ölüm nedenine rastlanmamıştır. Yani genel sağ kalım aynı zamanda kansere özgü ölümdür.

3.8.2. Biyoinformatik Analiz

Her bir örnek için miRNA'ların yaydığı sinyale göre görüntüler elde edildi ve bunlar üzerinde normalizasyon çalışması yapıldı. Bu analizler sonrasında da R programı ve GeneSpringGX software kullanılarak gruplar arası mikroRNA profil farklılıklarına göre hiyerarşik küme analizi yapıldı ve bunlara ait *Heat-map*'ler (ısı haritaları) çıkarıldı. Bu sayede sinyal değerine göre tüm örnekler kendi grupları içerisinde yeniden tabakalandırılarak ekspresyon seviyesindeki bağlantılar görsel olarak belirlenmiş oldu. Isı haritalarında kırmızı renkli olanlar artan (up-regüle) mikroRNA'ları gösterirken, yeşil renkli olanlar azalan (down-regüle) mikroRNA'ları göstermektedir. Biyoinformatik analizler için farklı eksprese olan miRNA'ları saptamak için örnek sayısının azlığı sebebiyle nonparametrik test olan iki bağımsız örnek testi (Mann whitney U) kullanılmıştır. Sadece kemoterapi öncesi ve sonrası

(II. analiz) eşleştirmeyi göstermek amacıyla ve herhangi bir fark olup olmadığını test etmek için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır. Çalışmanın başında gruplararası farkın değerlendirilmesinde α (tip 1 hata) = 0.05 olarak belirlenmiştir. İlk analizler neticesinde anlamlı çıkan sonuçlar daha sonra α (tip 1 hata) = 0.01'e göre tekrar analiz edilmiş ve böylece gruplararası % 99 fark olan miRNA'lar ortaya çıkarılmıştır.

Gene Ontology (GO) Analizi: Farklı ekspresyon gösteren miRNA'ların hedeflediği hücresel, biyolojik ve moleküler açıdan fonksiyonel genleri ve gen gruplarını ortaya koymak amacıyla Gene Ontology (GO) analizi yapıldı. Herbir analiz için iki grup karşılaştırması yapılarak en belirgin farklılık gösteren hücresel olaylar belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Yolak Analizi: Ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'ların hedeflediği genlerin birbirleri ile olan ilişki ağını ve hücre metabolizması hakkında bilgi vermek için de KEGG yolak analizi gerçekleştirildi. Herbir analiz için iki grup karşılaştırması yapılarak yolaklarda en yoğun değme noktası farklılığı gösteren yolaklar belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

- Bu çalışmanın asıl amacı, farklı klinik ve histopatolojik özellikleri olan nöroblastom hastalarına ait tümör dokularındaki miRNA profillerini belirlemek olduğundan normal dokular kullanılmamıştır.
- Çalışmadaki bütçe kısıtlılığı ve mikroyarray analizlerinin pahalı olması örnek sayısını sınırlandırmamıza neden olmuştur.
- Çalışmada farklı eksprese olan miRNA'lar sadece parafine gömülü arşiv dokularından çalışılabilmiştir. Hastaların kan örnekleri ile karşılaştırma yapılamamıştır.
- Nöroblastom için önemli bir yaş grubu olan 5 yaş üstü hastalara ait dokular ile çalışılamamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul tarafından 22.06.2011 tarihinde 250-GOA protokol numaralı ve 2011/19-10 karar numarasıyla onay verilmiştir (Ek 1).

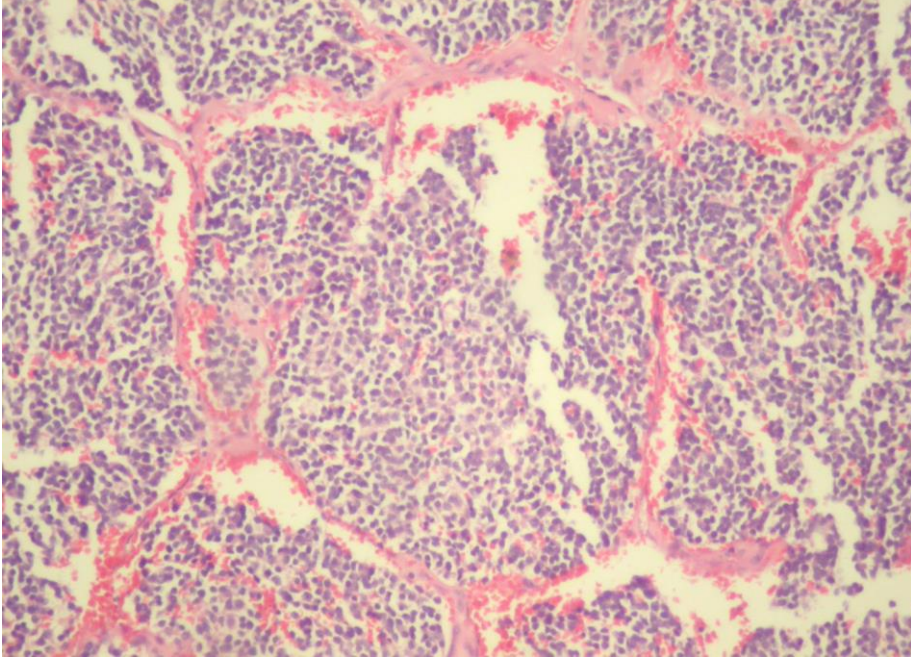
4. BULGULAR

4.1 Hastaların Demografik Özellikleri

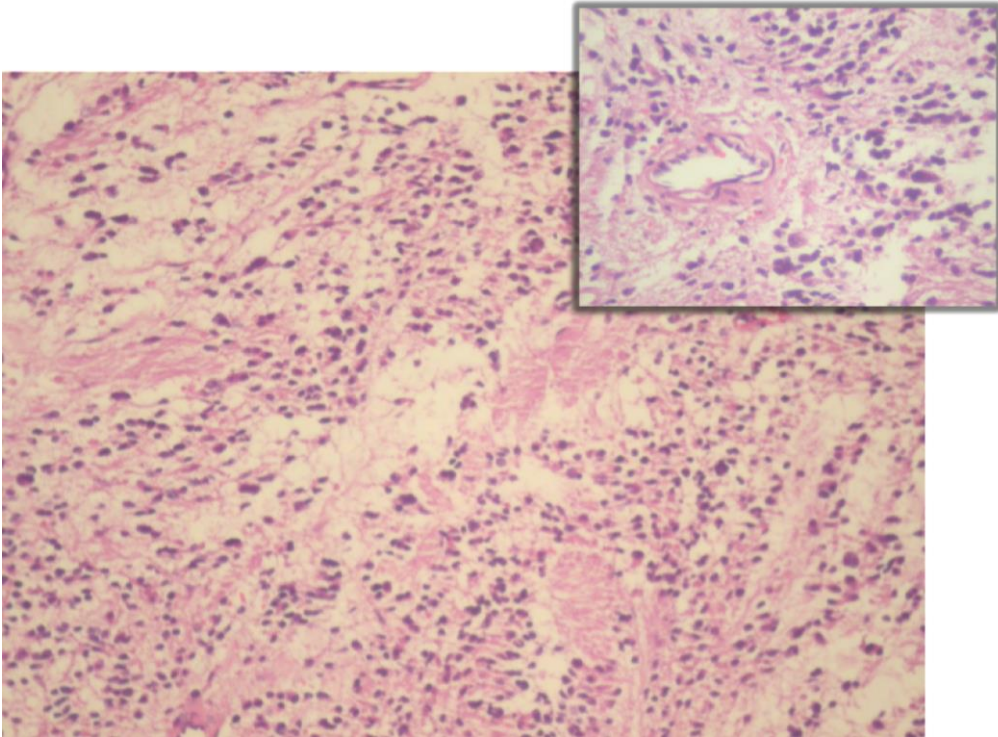
Tablo 7: Hastaların Demografik Özellikleri (K: Kız, E: Erkek, NB: nöroblastom, GNB: ganglionöroblastom) (8 erkek, 9 kız hasta; 0-17 ay: 7 hasta, 18 ay ve üstü: 10 hasta) (**bu olgularda matür alanlardan alınan örnek-rezidü tümör- ile de karşılaştırma yapılmıştır)

Vaka No	Cinsiyet	Yaş (Ay)	Tanı	Risk Sınıfı	Histoloji	MYCN
1	K	1	NB	Düşük	İyi	Pozitif
2	K	60	GNB**	Düşük	İyi	Yok
3	E	12	NB	Düşük	İyi	Yok
4	K	24	NB	Yüksek	Kötü	Pozitif
5	K	24	NB	Orta	İyi	Negatif
6	E	23	NB	Yüksek	Kötü	Pozitif
7	K	4	NB	Orta	Kötü	Pozitif
8	E	35	GNB**	Düşük	İyi	Negatif
9	K	15	NB**	Orta	İyi	Negatif
10	K	60	NB	Yüksek	Kötü	Pozitif
11	E	24	GNB**	Düşük	İyi	Negatif
12	E	36	NB	Yüksek	Kötü	Pozitif
13	E	42	NB	Yüksek	Kötü	Pozitif
14	E	12	NB	Orta	Kötü	Negatif
15	E	24	NB	Yüksek	Kötü	Pozitif
16	K	12	NB	Düşük	İyi	Negatif
17	K	14	NB	Düşük	İyi	Negatif

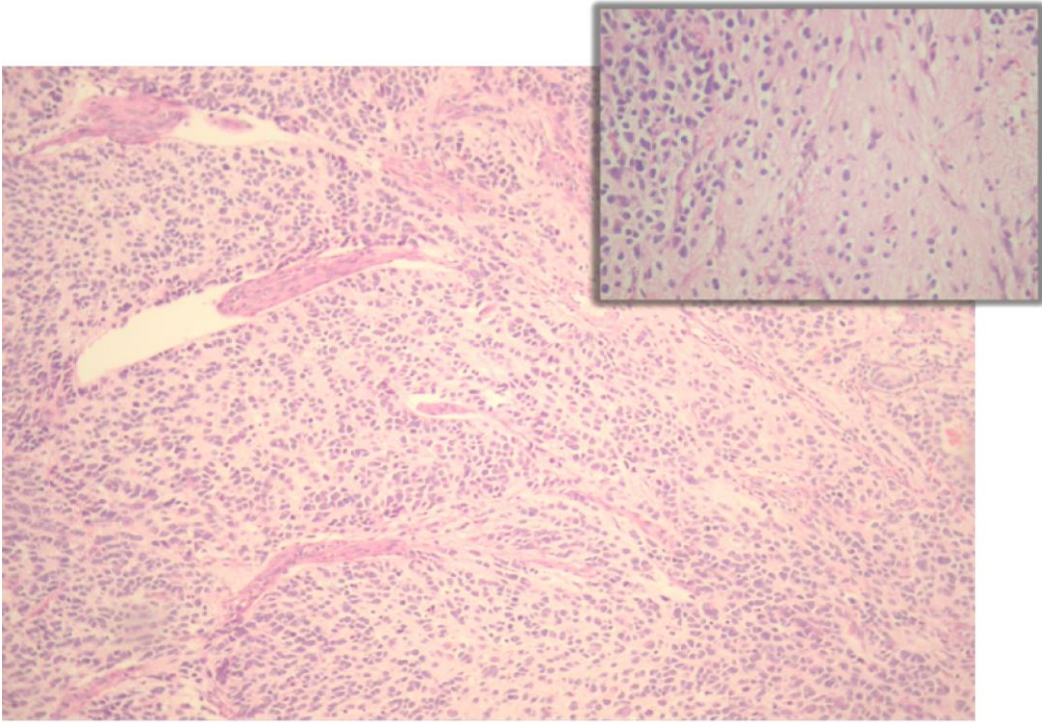
4.2. Çalışmadaki Nöroblastom Tümör Dokularına Ait Resimler:



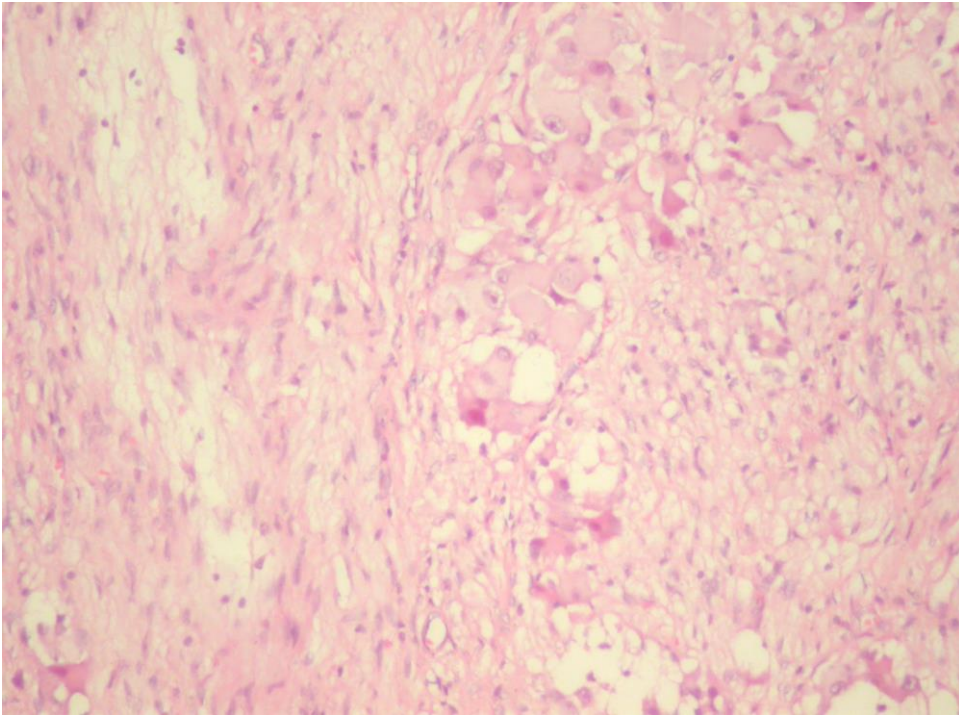
Şekil 8 : Differansiye olmamış (andifferansiye) nöroblastom dokusuna ait resim, x 200.



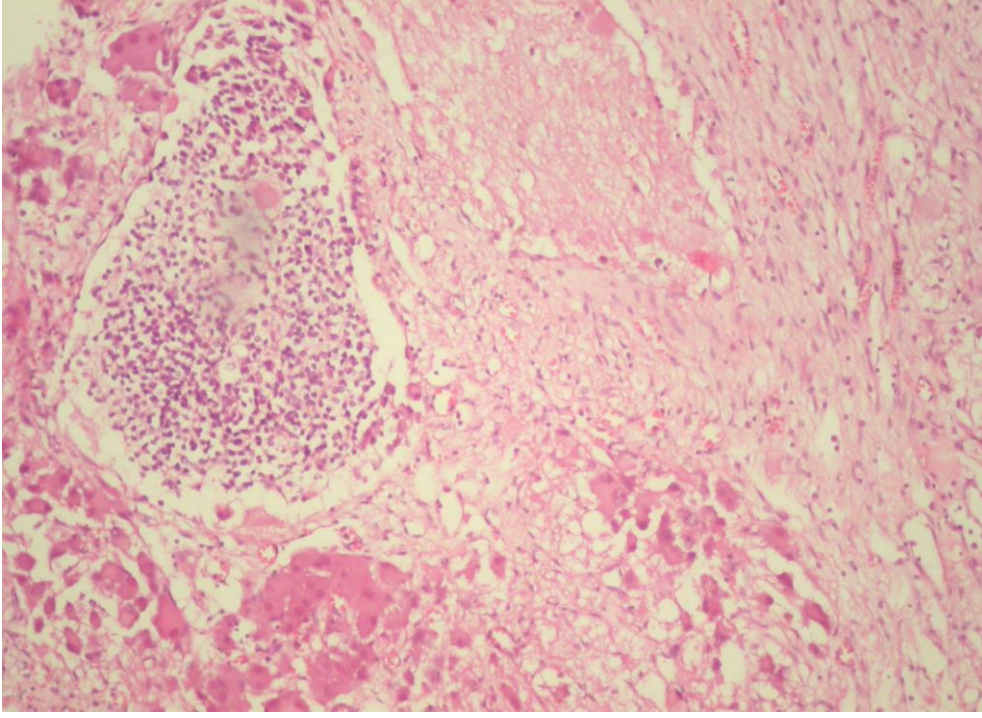
Şekil 9: Az differansiye (Poorly differentiated) nöroblastom dokusuna ait resim, x 200.
Küçük resim: büyütülmüş hali ile differansiye olmuş ile olmamış tümör hücreleri birarada, x 400.



Şekil 10: Differansiye (Differentiating) nöroblastom dokusuna ait resim, x 200. Küçük resim: büyütülmüş hali ile differansiye olmuş ile olmamış tümör hücreleri birarada, x 400.



Şekil 11: Benign yapıda ganglionörom (matür) dokusuna ait resim, x 400.



Şekil 12: Kemoterapi sonrası differansiye ganglionörom alanları, fibrozis içeren alanlar ve rezidüv nöroblastom odakları içeren tümör dokusu, x 200.

4.3. Moleküler Belirteç Dağılımı

Moleküler belirteç olarak MYCN amplifikasyonu, 1p36 LOH ve 11qLOH delesyonları ve 17q25 kazanımlarına bakıldı (Tablo 8). Yirmidört örnekten 3 örneğin RNA kalitesi çok iyi olmadığından bu analiz için 21 örneğe bakılabildi.

Tablo 8: Nöroblastom hastalarındaki moleküler belirteç dağılımı (toplam 17 hastaya ait 21 biopsi örneğini içermektedir; 4 hastanın biopsi tekrarları da dahil edilmiştir).

	(+) hasta sayısı	(-) hasta sayısı
MYCN	9	12
1p36 LOH	10	11
11q LOH	9	12
17q25 gain	9	12

4.4. Risk Sınıflandırması

Tablo 9: Nöroblastom hastalarındaki risk sınıflandırması

Risk Sınıfı	Hasta sayısı
Düşük	7
Orta	4
Yüksek	6

4.5. MikroRNA Mikroarray

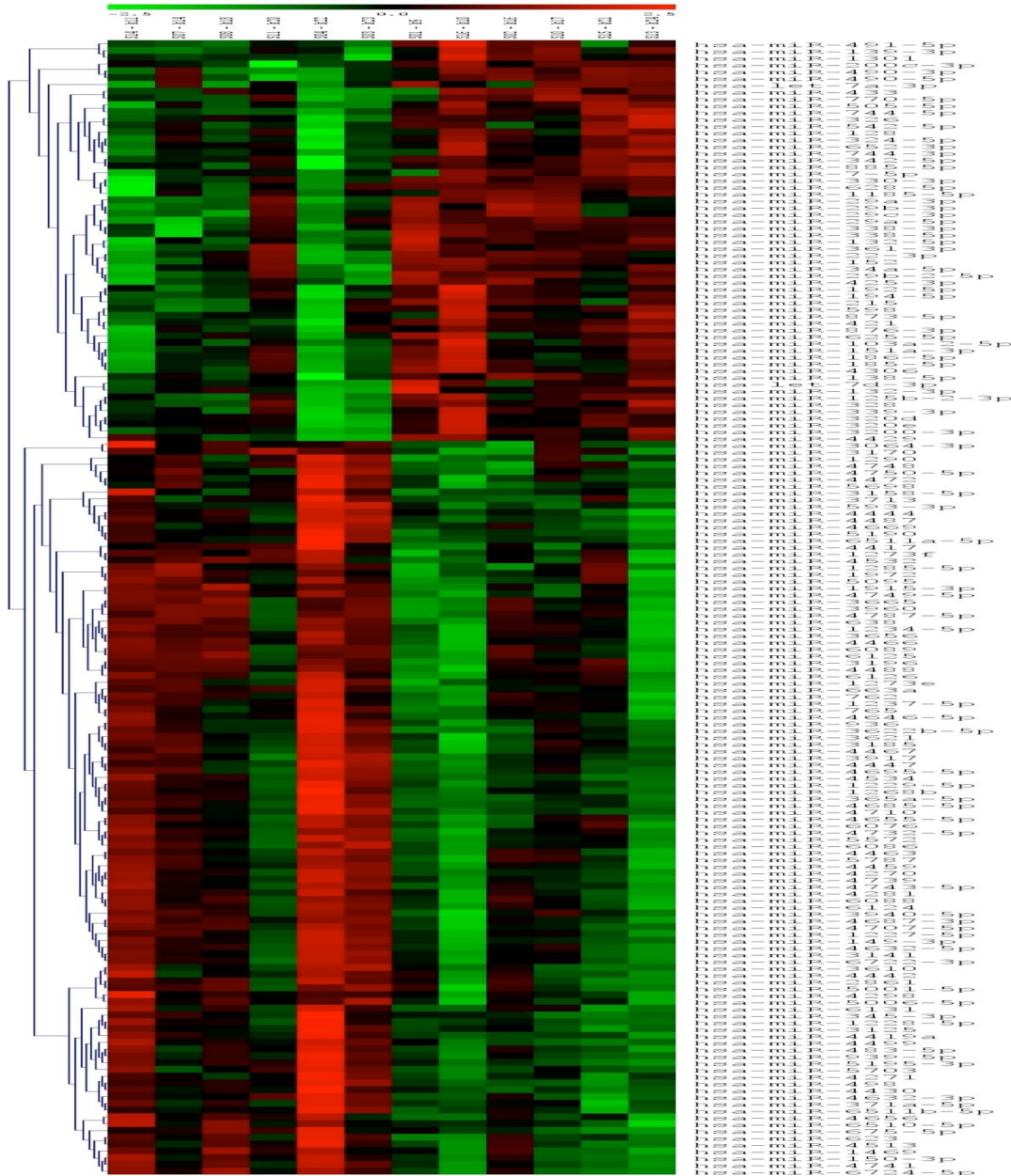
Farklı ekspresyon seviyesi tespit edilen miRNA'lar ile yapılan hiyerarşik kümeleme analizi ile gruplar arası fark tespit edildi:

I. Analiz:

Grup 1: İyi differansiye grup (n=6) ile

Grup 2: kötü differansiye grup (n=6) karşılaştırıldı.

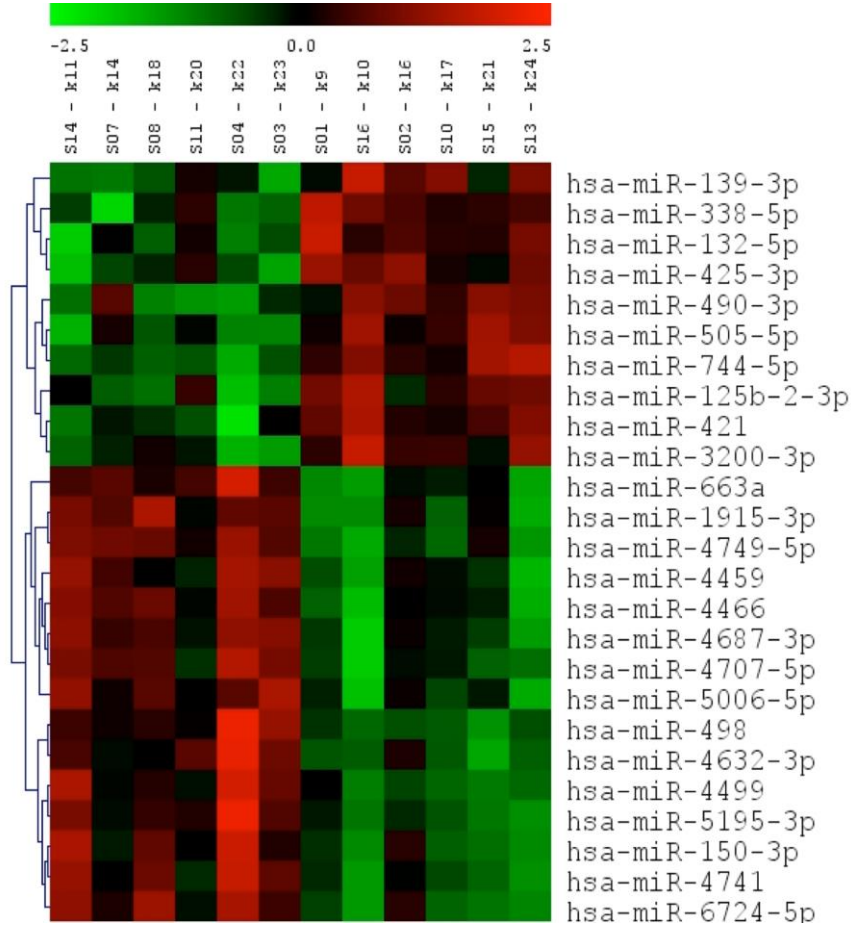
$p < 0.05$ alındığında 167 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 13).



Şekil 13: İyi differansiye-kötü differansiye gruplardaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

$p < 0.01$ alındığında ise 25 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 14).

Kötü differansiye: 10 up regüle , 15 down regüle miRNA.



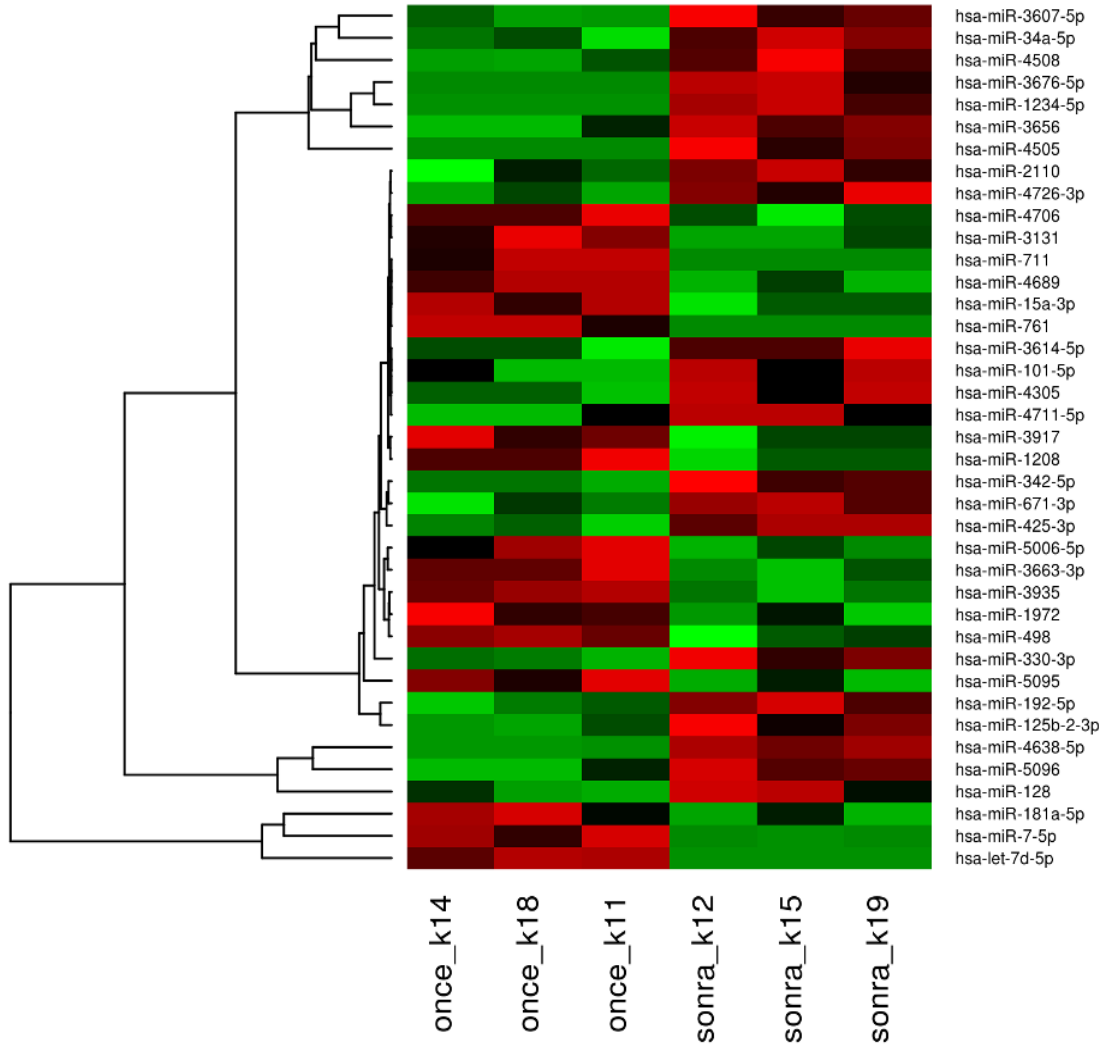
Şekil 14: İyi differansiye-kötü differansiye gruplardaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.01$).

II. Analiz

Grup 3: Kemoterapi öncesi (n=3) ile

Grup 4: Kemoterapi sonrası (n=3) karşılaştırıldı.

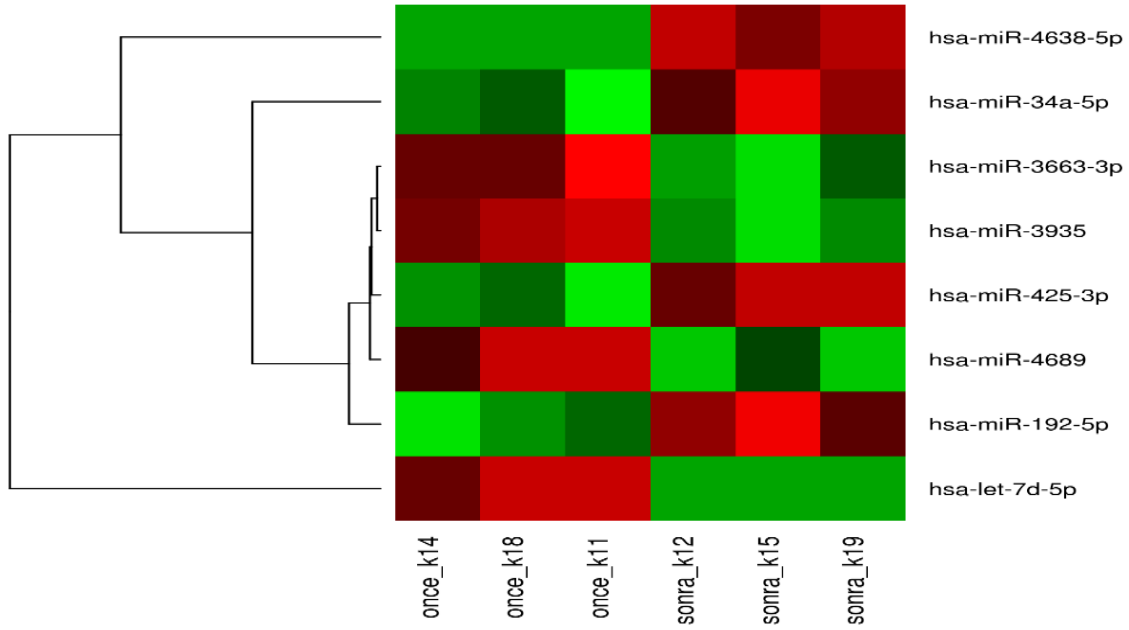
$p < 0.05$ alındığında ise 39 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15: Kemoterapi öncesi ve sonrası örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

p < 0.01 alındığında ise 8 adet farklı miRNA (miR-4638-5p, miR-34a-5p, miR-3663-3p, miR-3935, miR-425-3p, miR-4689, miR-192-5p, let-7d-5p) tespit edildi (Şekil 16).

Kemoterapi sonrası: 4 up regüle, 4 down regüle miRNA.



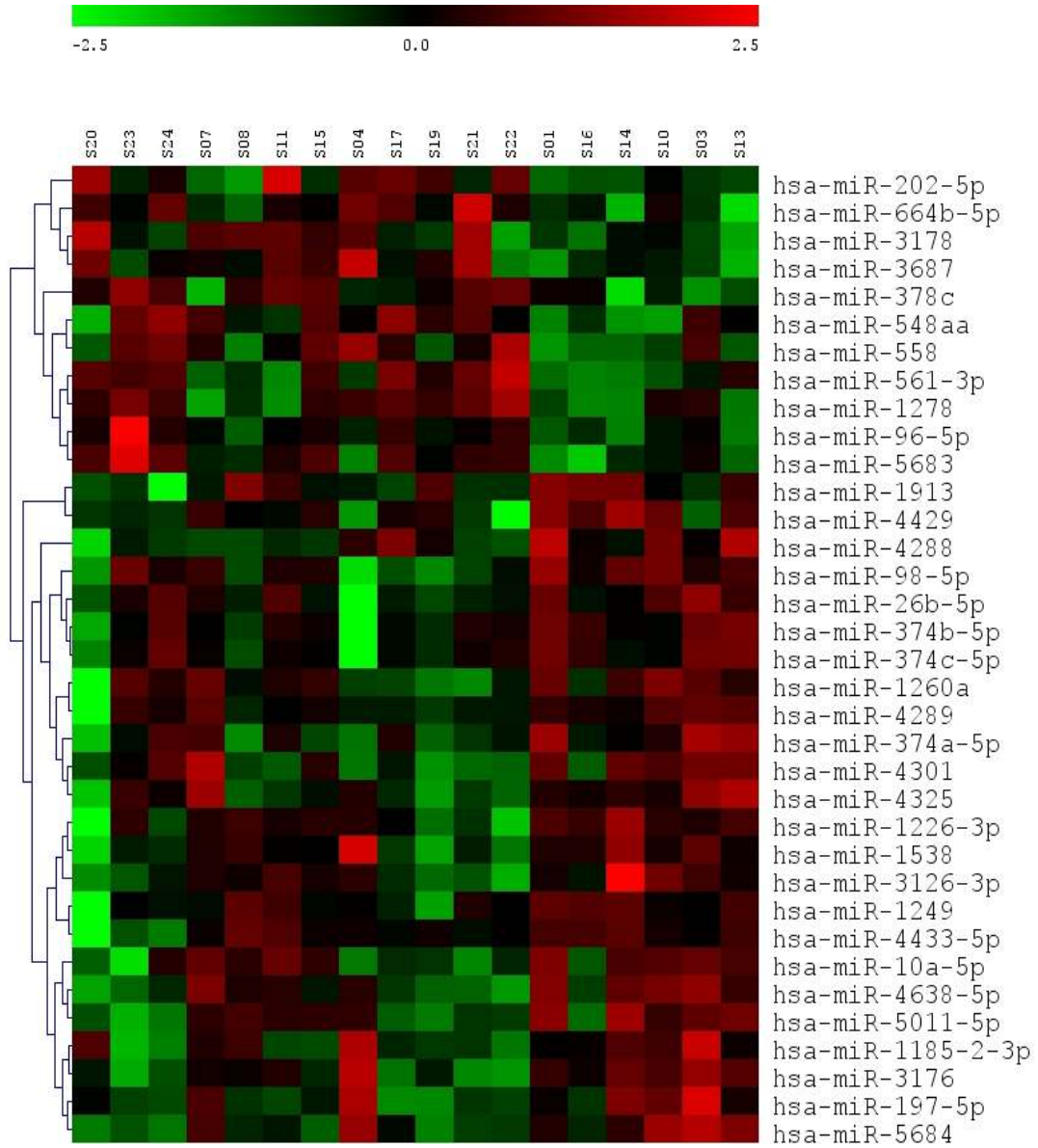
Şekil 16: Kemoterapi öncesi ve sonrası örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map (p<0.01).

III. Analiz:

Grup 5: İyi histoloji (n=10) ile

Grup 6: Kötü histoloji (n=8) karşılaştırıldı.

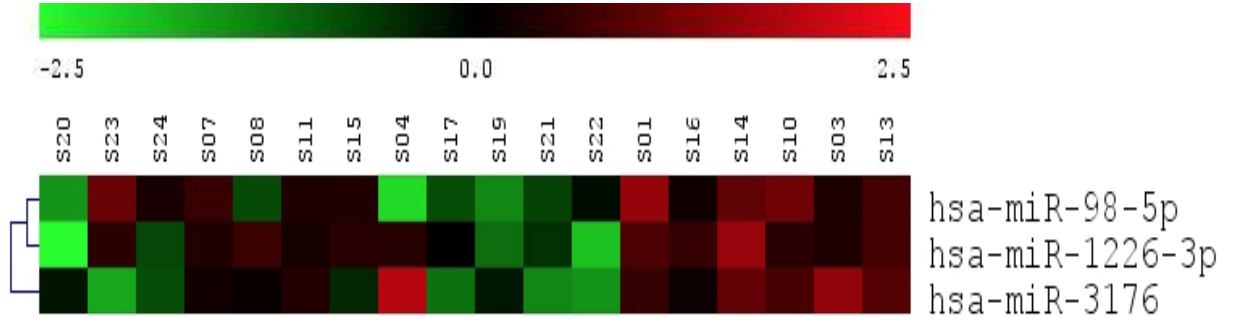
$p < 0.05$ alındığında ise 35 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17: İyi histoloji-kötü histoloji gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

$p < 0.01$ alındığında ise 3 adet farklı miRNA (miR-98-5p, miR-1226-3p, miR-3176) tespit edildi (Şekil 18).

Kötü Histoloji: 3 up regüle miRNA.



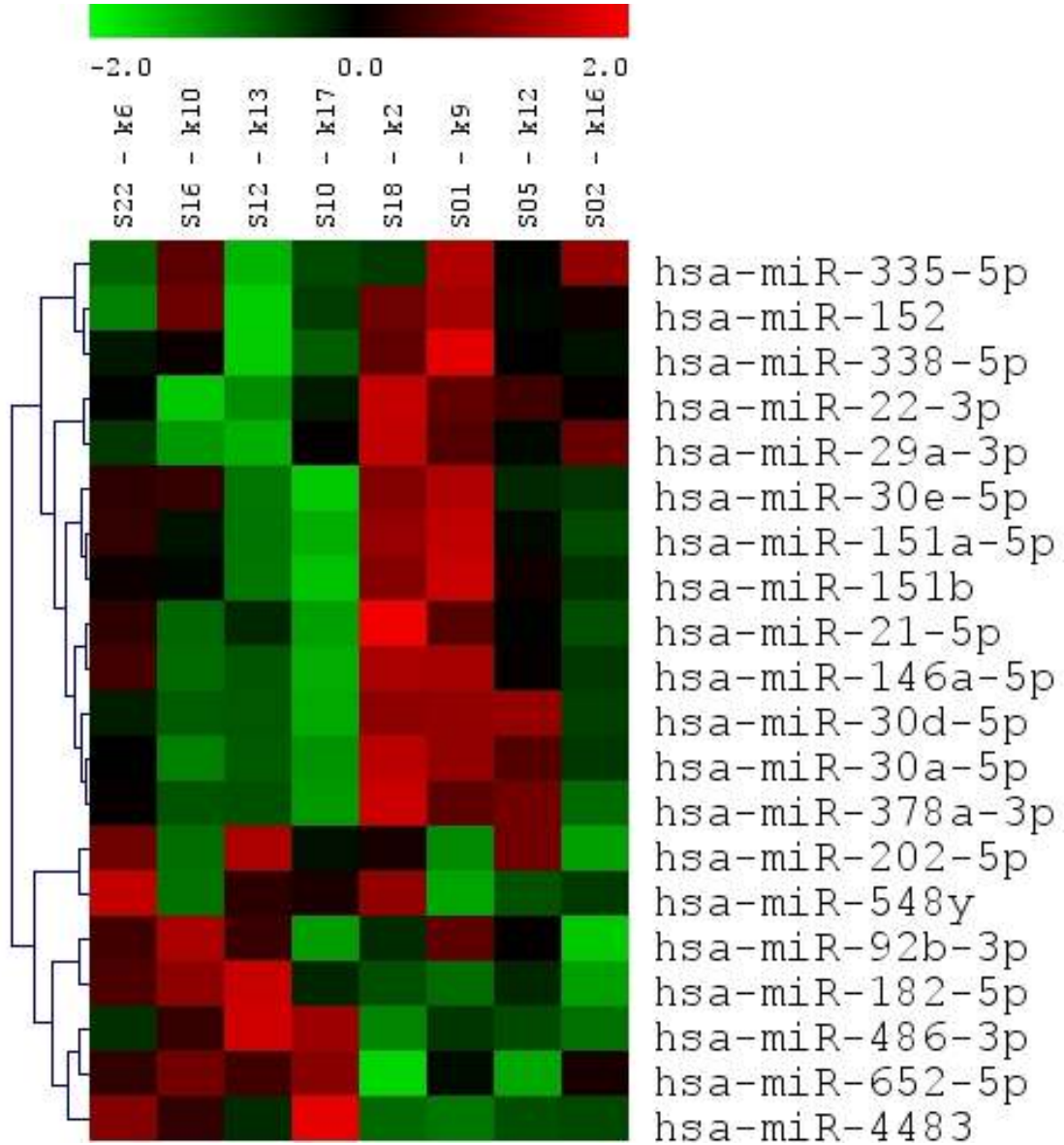
Şekil 18: İyi histoloji-kötü histoloji gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.01$).

IV. Analiz

Grup 7: Nöroblastom (n=4) ile

Grup 8: Ganglionörom (n=4) karşılaştırıldı.

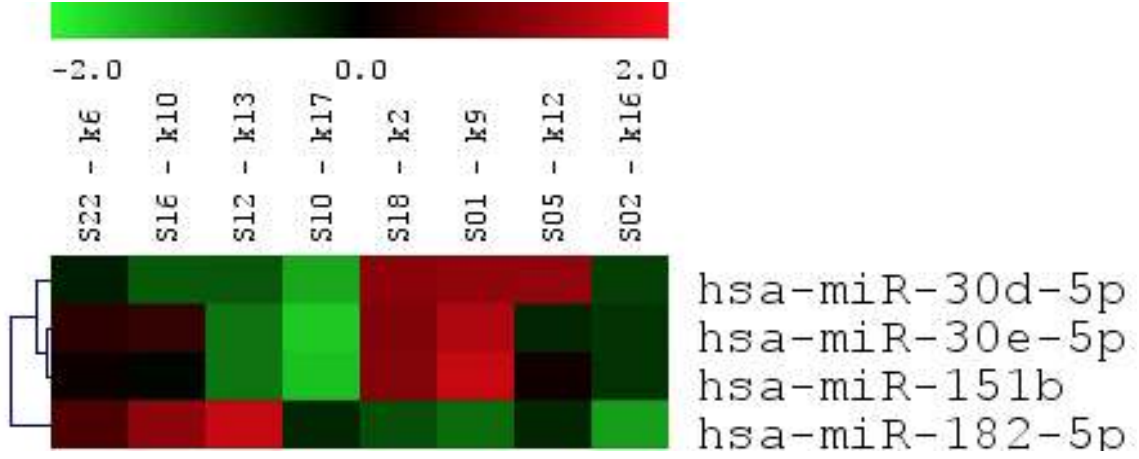
$p < 0.05$ alındığında ise 20 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 19).



Şekil 19: Nöroblastom-ganglionörom gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

p < 0.01 alındığında ise 4 adet farklı miRNA (miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-151b, miR-182-5p) tespit edildi (Şekil 20).

Ganglionörom : 3 up regüle, 1 down regüle miRNA.



Şekil 20: Nöroblastom-ganglionörom gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map (p<0.01)

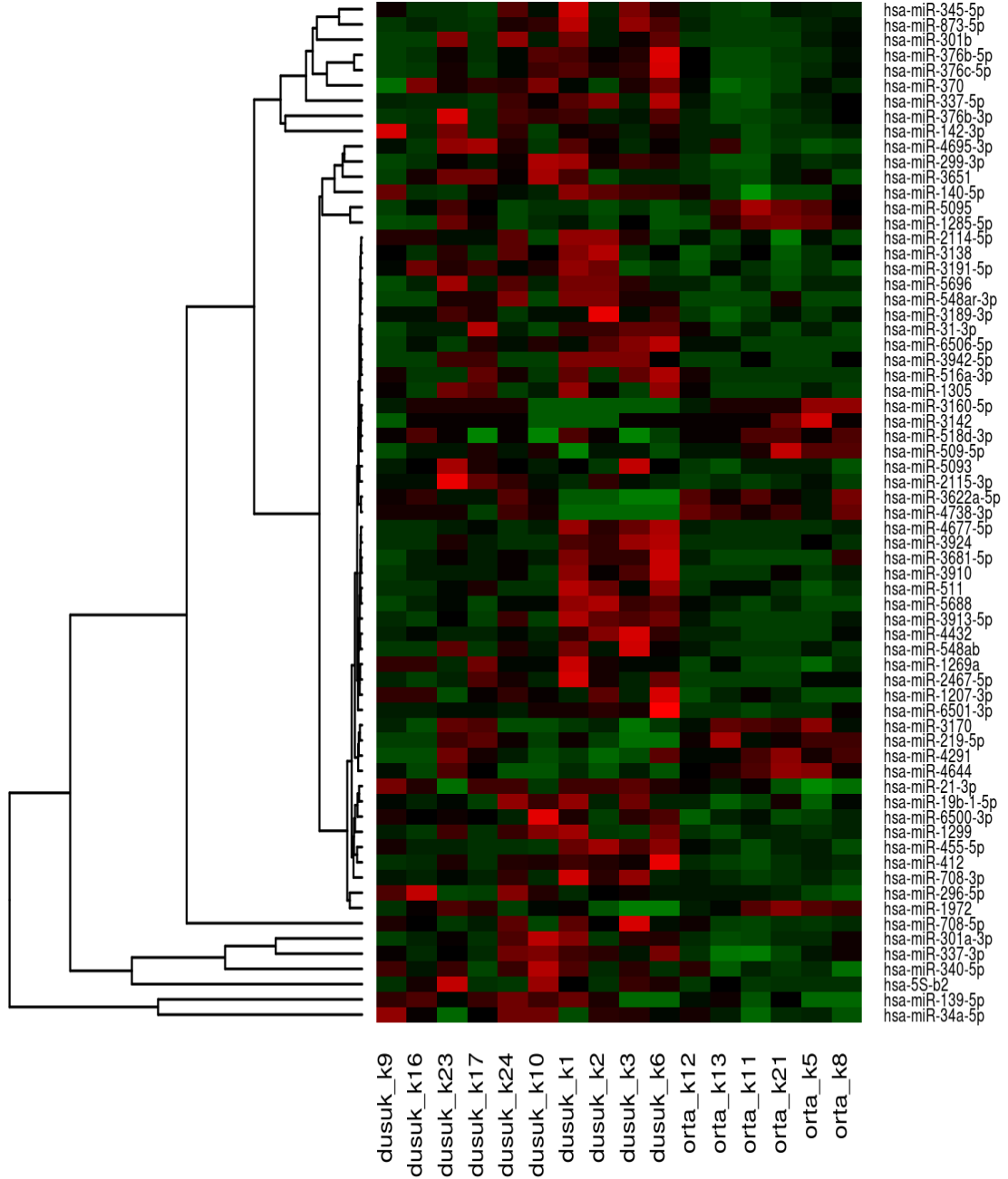
V. Analiz

a) Düşük risk-Orta risk karşılaştırması

Grup 9: Düşük risk (n=10) ile

Grup 10: Orta risk (n=6) karşılaştırıldı.

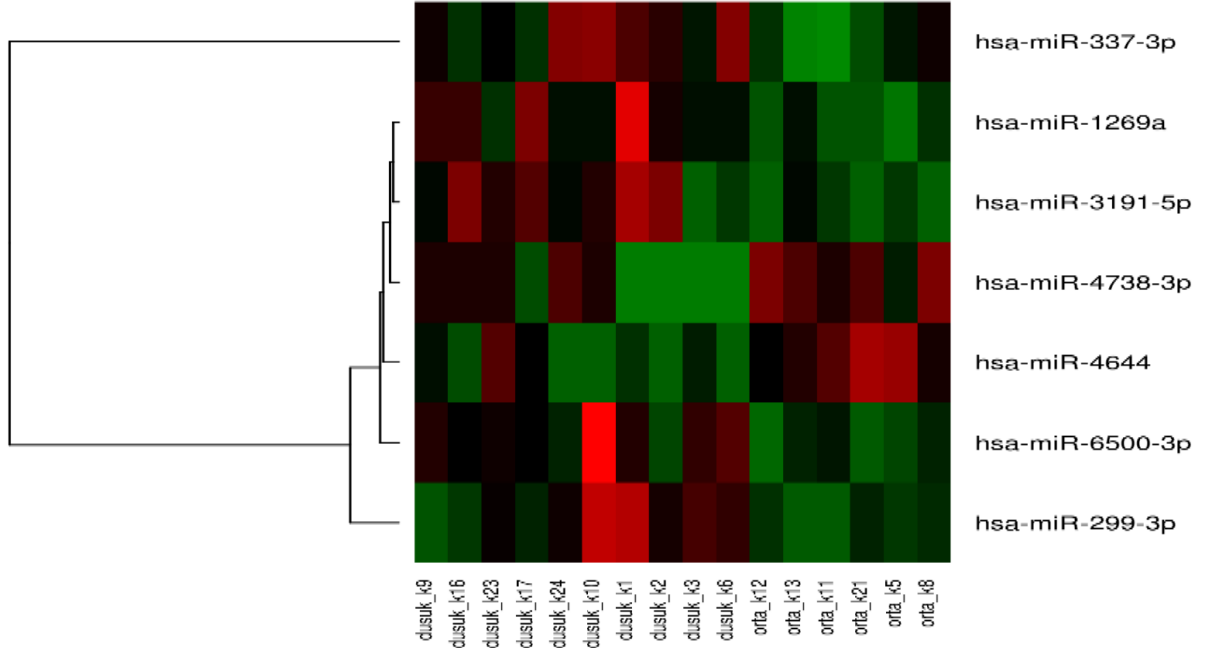
$p < 0.05$ alındığında ise 67 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 21).



Şekil 21: Düşük risk-orta risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

$p < 0.01$ alındığında ise 7 adet farklı miRNA (miR-337-3p, miR-1269a, miR-3191-5p, miR-4738-3p, miR-4644, miR-6500-3p, miR-299-3p) tespit edildi (Şekil 22).

Düşük Risk : 5 up regüle, 2 down regüle miRNA.



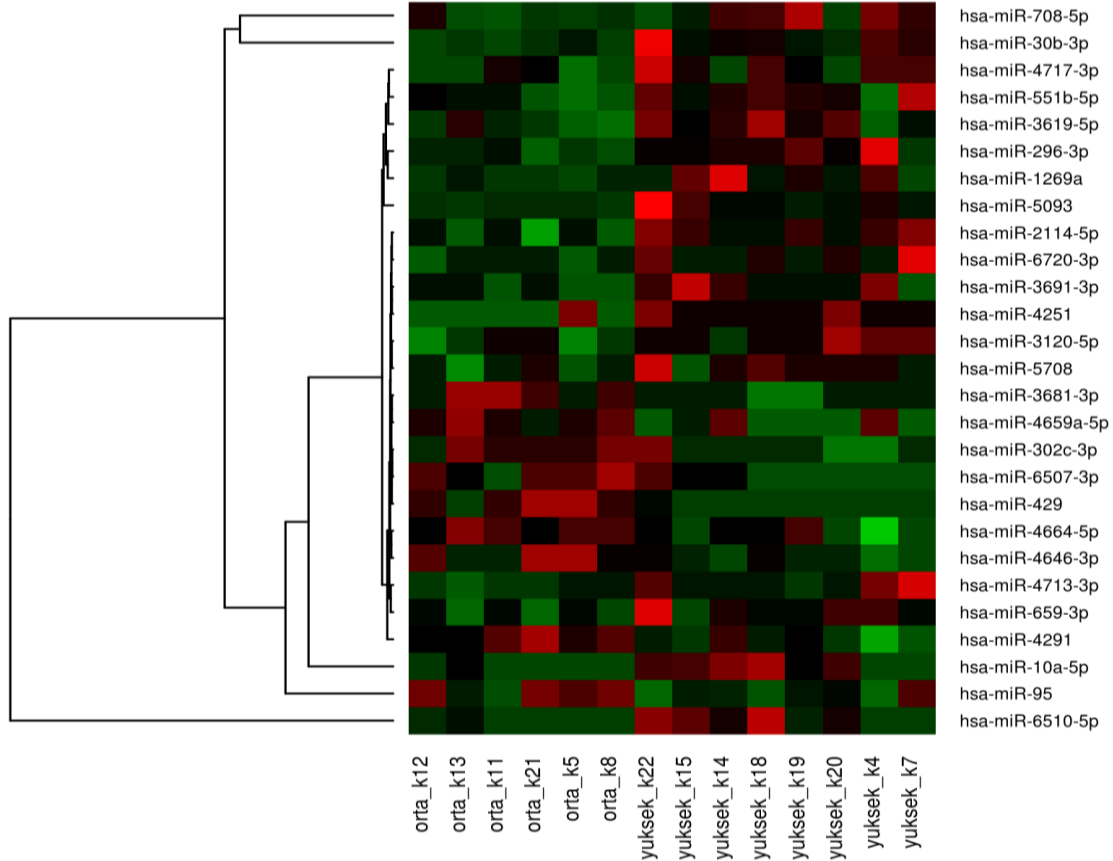
Şekil 22: Düşük risk-orta risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.01$).

b) Orta risk-Yüksek risk karşılaştırması

Grup 10: Orta risk (n=6) ile

Grup 11: Yüksek risk (n=8) karşılaştırıldı.

$p < 0.05$ alındığında ise 27 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 23).



Şekil 23: Orta risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

$p < 0.01$ alındığında ise 1 adet farklı miRNA (miR-2114-5p) tespit edildi (Şekil 24).

Yüksek Risk : 1 up regüle miRNA.



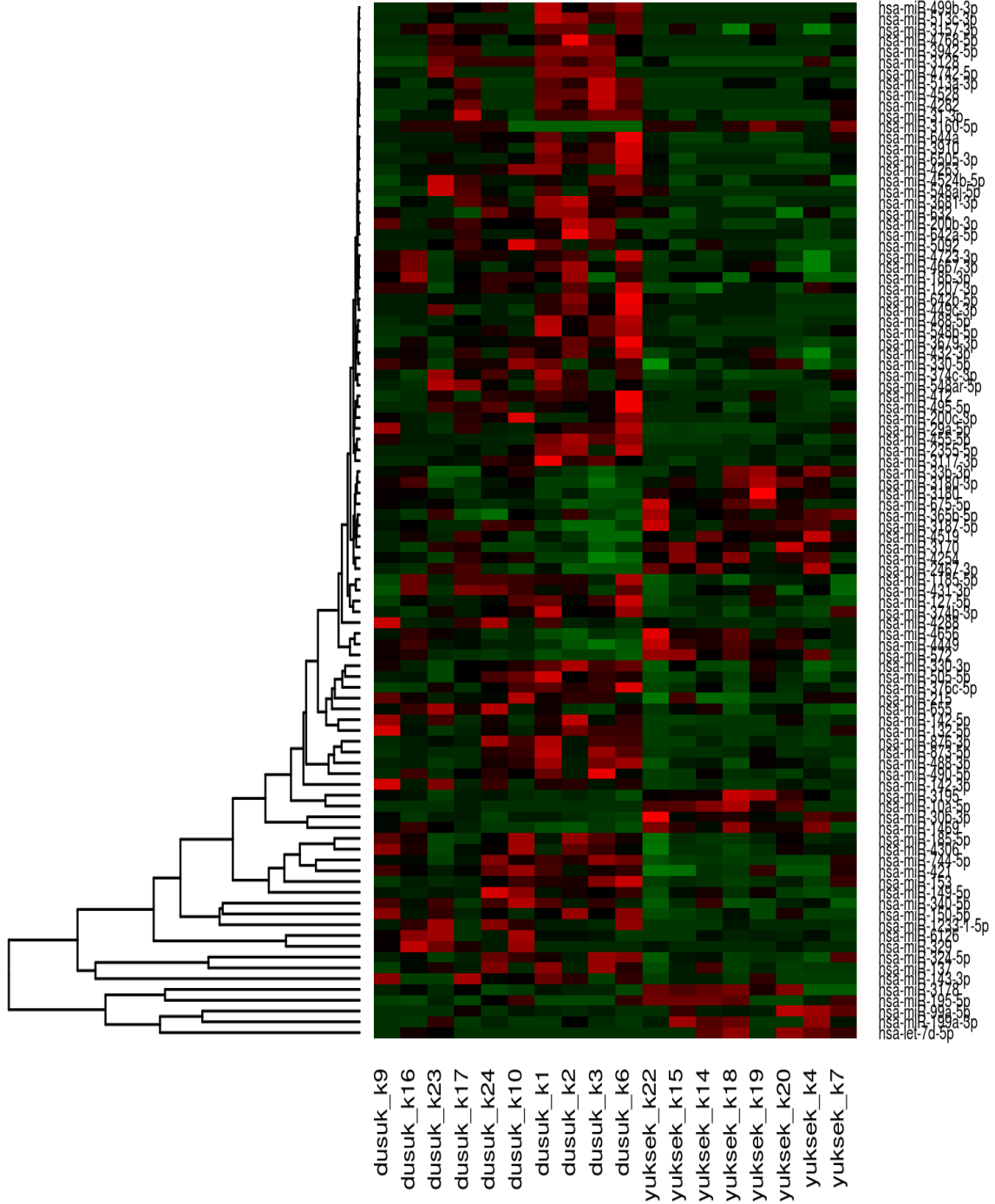
Şekil 24: Orta risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.01$).

c) Düşük risk-Yüksek risk karşılaştırması

Grup 10: Düşük risk (n=10) ile

Grup 11: Yüksek risk (n=8) karşılaştırıldı.

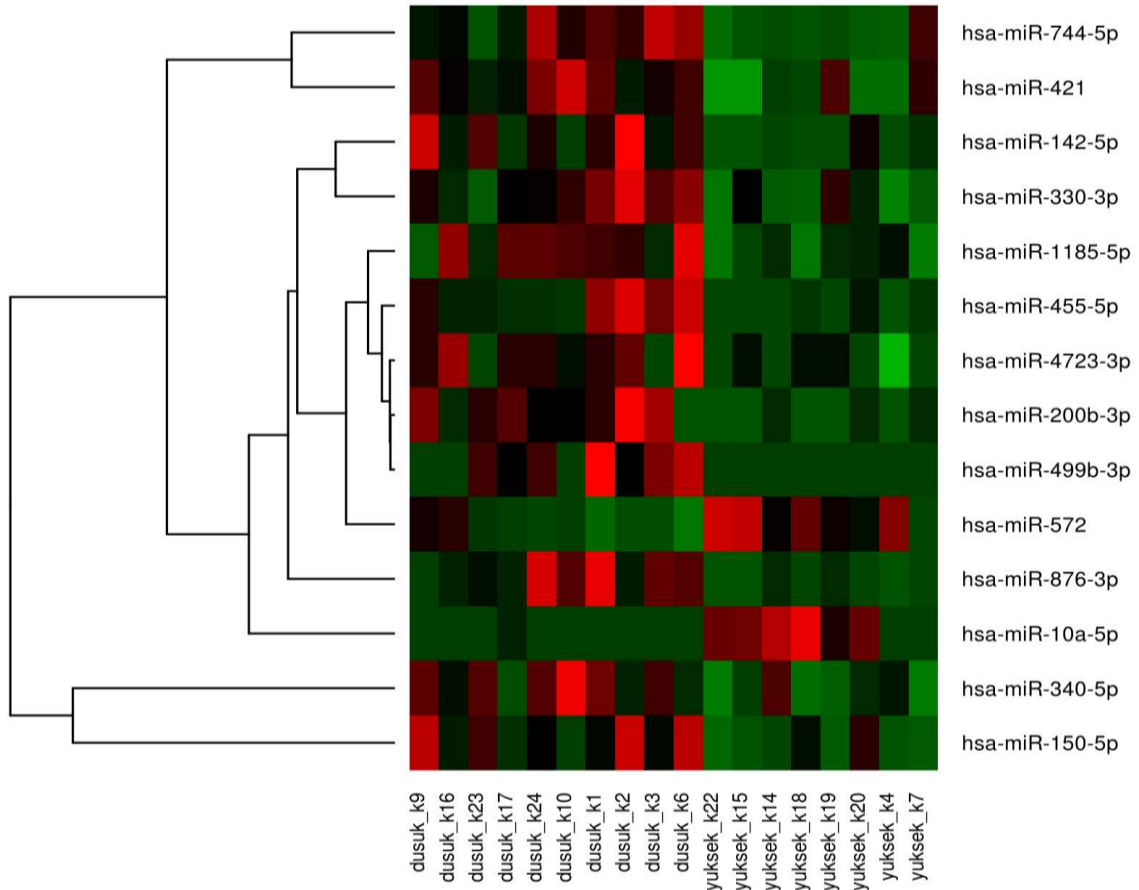
$p < 0.05$ alındığında ise 95 adet farklı miRNA tespit edildi (Şekil 25).



Şekil 25: Düşük risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.05$).

$p < 0.01$ alındığında ise 14 adet farklı miRNA (miR-744-5p, miR-421, miR-142-5p, miR-330-3p, miR-1185-5p, miR-455-5p, miR-4723-3p, miR-200b-3p, miR-499b-3p, miR-572, miR-876-3p, miR-10a-5p, miR-340-5p, miR-150-5p) tespit edildi (Şekil 26).

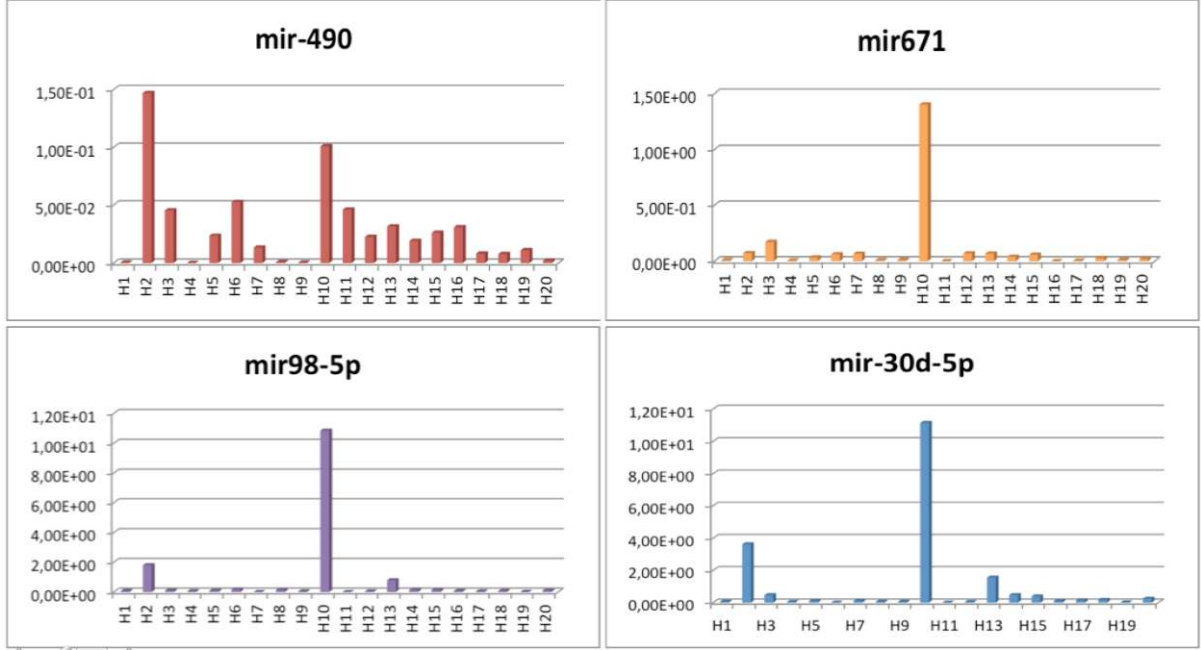
Düşük Risk : 12 up regüle, 2 down regüle miRNA.



Şekil 26: Düşük risk-yüksek risk gruplarındaki örneklerin karşılaştırması sonrası elde edilen miRNA heat-map ($p < 0.01$).

4.6. Eş Zamanlı PCZ analizi (Validasyon)

miR-98-5p, miR-490-3p, miR-671-3p ve miR-30d-5p primerleri ile eş zamanlı PZR'da yapılan validasyon sonuçları Şekil 27 ve Tablo 10'da görülmektedir.



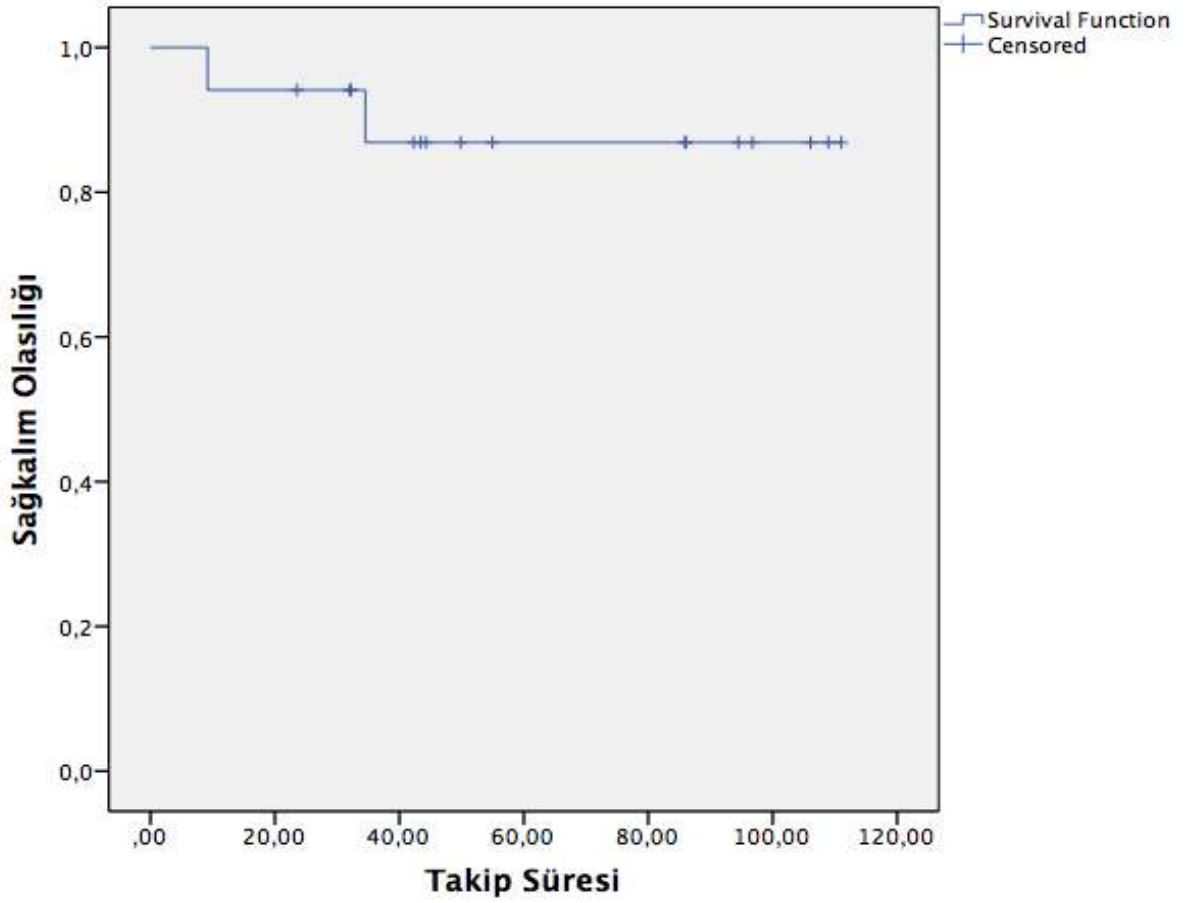
Şekil 27: Eş zamanlı PZR analizi (Validasyon) (miR-490, miR-671, miR-98-5p, miR-30d-5p)

Tablo 10: Validasyon amacıyla yapılan eş zamanlı PZR sonrası miRNA kat değişimleri

miRNA	Kat değişimi
miR-98-5p	23.3 kat
miR-490-3p	1.87 kat
miR-671-3p	2.17 kat
miR-30d-5p	3.403 kat

4.7. SAĞKALIM ANALİZİ

Çalışmamızda kullanılan dokuların ait olduğu hastalar için yapılan sağkalım analizine bakıldığında ortalama sağkalım süresinin 99.5 ay (99.5 ± 7.6), 1 yıllık sağkalım oranının %94 olduğu, 36 aylık sağkalımın % 87 olduğu, 70 ay ve üstü sağkalımını da % 87 olduğu görülmüştür (Şekil 28).



Şekil 28: Çalışmada yer alan nöroblastom hastalarına ait sağkalım olasılığı eğrisi

4.8 Yeni Vakalara Ait Demografik Özellikler

Tablo 11: Yüksek Riskli Hastalara Ait Demografik Özellikler (Yeni vakalar) (K: Kız, E: Erkek)

Vaka No	Cinsiyet	Yaş (ay)	Primer	Metastaz	MYCN	1p	11q	17q	Evre	Patoloji
1	K	96	Sürrenal	+	+	+	-	+	IV	Kötü
2	K	50	Pelvik	-	-	+	-	+	III	Kötü
3	K	66	Sürrenal	+	-	+	+	+	IV	Kötü
4	E	144	Paraspinal	-	-	-	+	-	III	İyi
5	E	18	Sürrenal	-	+	+	-	+	III	Kötü
6	K	84	Sürrenal	+	-	+	-	+	IV	Kötü
7	E	36	Abdominal	+	-	+	-	-	IV	Kötü
8	K	30	Torako-abdominal	+	-	-	-	-	IV	İyi
9	K	21	Sürrenal	+	-	-	-	+	IV	İyi
10	E	19	Sürrenal	+	-	+	-	+	IV	-
11	E	36	Sürrenal	+	-	yo k	-	+	IV	Kötü
12	K	30	Sürrenal	+	-	+	+	+	IV	Kötü
13	K	51	Torako-abdominal	+	-	-	+	+	IV	Kötü
14	E	18	Sürrenal	+	+	+	-	+	IV	Kötü
15	E	24	Sürrenal	+	-	+	+	+	IV	-
16	K	42	Sürrenal	-	+	+	-	-	III	-
17	E	36	Torako-abdominal	+	-	-	+	+	IV	-
18	K	48	Sürrenal	+	-	-	+	+	III	Kötü
19	E	18	Sürrenal	+	+	+	-	+	IV	Kötü
20	E	23	Paraspinal	-	-	+	+	-	III	Kötü
21	K	90	Abdominal	+	-	+	-	-	IV	-
22	E	96	Abdominal	-	-	+	-	+	IV	Kötü
23	K	48	Sürrenal	+	-	-	-	+	IV	İyi
24	E	24	Torako-abdominal	-	-	-	-	+	IV	-

Tablo 12: Düşük Riskli Hastalara Ait Demografik Özellikler (Yeni vakalar) (K: Kız, E: Erkek)

Vaka No	Cinsiyet	Yaş (ay)	Primer	Metastaz	MYCN	1p	11q	17q	Evre	Patoloji
1	E	3	Sürrenal	-	-	-	-	+	I	İyi
2	K	7	Paraspinal	-	-	-	-	-	I	İyi
3	K	1	Abdominal	+	-	-	-	-	IVS	Kötü
4	E	14	Paraspinal	-	-	+	+	-	I	İyi
5	K	168	Servikal	-	-	+	+	-	IIB	Kötü
6	E	10	-	-	-	-	-	-	I	İyi
7	E	60	Abdominal	-	-	-	-	-	I	Kötü
8	K	3	Servikal	-	-	-	+	+	IIA	Kötü
9	E	42	Torakal	-	-	-	-	-	I	İyi
10	K	18	Torakal	-	-	-	-	+	I	Kötü
11	E	6	Abdominal	-	-	-	-	-	I	Kötü
12	K	16	Torakal	-	-	-	-	+	I	Kötü
13	K	13	Sürrenal	-	-	+	+	-	I	İyi
14	K	5	Abdominal	-	-	+	-	-	IIB	Tanımlanmamış

4.9. Yeni Vakalarda Eş Zamanlı PZR Analizi

Yüksek risk ile düşük risk hastalarda miR-98-5p, miR-490-3p, miR-671-3p ve miR-30d-5p için bulunan kat değişim (fold change) sonuçları Tablo 11’de görülmektedir.

Tablo 13: Yüksek risk/düşük risk (yeni vakalarda) miRNA kat değişimleri.

miRNA	Kat değişimi
miR-98-5p	22.5 kat (düşük:1.26/yüksek:0.056)
miR-490-3p	8.38 kat (düşük:31,41/yüksek:3.75)
miR-671-3p	1.956 kat (düşük:0,14/yüksek:0,075)
miR-30d-5p	3.257 kat (düşük:6,57/yüksek:2,018)

4.10. GO ve KEGG ANALİZİ

A) İYİ-KÖTÜ HISTOLOJİ

I. GO Analizi

1. Biyolojik olaylar:

Tablo 14: İyi-kötü histoloji gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması.

	p-değeri
Gelişimsel olayların düzenlenmesi	5.89066E-25
Apoptoz	6.97308E -24
Hücre siklusu	9.10286E-15
Nörojenez	1.26182E-14

2. Moleküler fonksiyonlar:

Tablo 15: İyi-kötü histoloji gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından Karşılaştırılması.

	p-değeri
Çift zincirli DNA bağlama	4.1941E-13
Transkripsiyon aktivatör aktivitesi	8.19668E-12
Protein dimerizasyon aktivitesi	6.1757E-10
Protein tirozin kinaz aktivitesi	2.15297E-7

II. KEGG yolak analizi

Tablo 16: İyi ve kötü histoloji gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması

	p-değeri
Kansere ait yolaklar	7.52144E -18
Prostat kanseri	2.85938E -17
Melanoma	1.93337E -15
Glioma	2.30296E -12

B) NÖROBLASTOM-GANGLİONÖROM

I. GO Analizi

1. Biyolojik olaylar:

Tablo 17: Nöroblastom-ganglionörom gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması.

	p-değeri
Programlı hücre ölümü sürecin düzenlenmesi	1.76839E-65
Hücre proliferasyonunun düzenlenmesi	7.47016E-43
Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	1.84308E-42
Organik substanslara cevap	2.87951E-35

2. Moleküler Fonksiyonlar:

Tablo 18: Nöroblastom-ganglionörom gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması.

	p-değeri
Enzim Bağlama	8.56833E-35
Transkripsiyon aktivatör aktivitesi	9.59649E-24
Sekans spesifik DNA bağlama	1.0506E-16
Protein kinaz aktivitesi	3.32702E-14
Siklin bağımlı protein serin/treonin kinaz düzenleyici aktivitesi	1.15783E-13

II. KEGG yolak analizi

Tablo 19: Nöroblastom ve ganglionörom gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması.

	p-değeri
Kansere ait yolaklar	2.32531E- 56
Pankreas kanseri	1.56077E- 27

C) KEMOTERAPİ ÖNCESİ ve SONRASI

I. GO Analizi

1. Biyolojik olaylar:

Tablo 20: Kemoterapi öncesi ve sonrası gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması.

	p-değeri
Hücre proliferasyonunun düzenlenmesi	4.71331E-16
Mitoz (G1/S geçişi)	3.79552E-14
Hücre siklusu	2.79408E-14
Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	1.14596E-14

2. Moleküler Fonksiyonlar:

Tablo 21: Kemoterapi öncesi ve sonrası gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması.

	p-değeri
Enzim bağlama	8.619E-8
Protein kinaz aktivitesi	4.45228E-8
Transkripsiyon aktivatör aktivitesi	1.86292E-7

II. KEGG yolak analizi

Tablo 22: Kemoterapi öncesi ve sonrası gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması

	p-değeri
Hücre siklusu	2.42758E -20
Kansere ait yolaklar	2.41034E -18

D) DÜŞÜK RİSK ve YÜKSEK RİSK

I. GO Analizi

1. Biyolojik olaylar:

Tablo 23: Düşük risk ve yüksek risk gruplarının GO analizinde biyolojik olaylar açısından karşılaştırılması

	p-değeri
Gen ekspresyonunun pozitif düzenlenmesi	9.76077E-10
Tüp gelişimi	9.76077E-10
Organ morfogenezi	1.96565E-10
Hücre proliferasyonunun düzenlenmesi	6.96662E-9
RNA polimeraz II promoterden transkripsiyon	2.28804E-9

2. Moleküler Fonksiyonlar:

Tablo 24: Düşük risk ve yüksek risk gruplarının GO analizinde moleküler fonksiyonlar açısından karşılaştırılması

	p-değeri
Sekans spesifik DNA bağlama	6.90375E-4
Transkripsiyon kofaktör aktivitesi	5.4622E-3
Transkripsiyon koreseptör aktivitesi	3.974E-2

II. KEGG Analizi

Tablo 25: Düşük risk ve yüksek risk gruplarının KEGG yolağı açısından karşılaştırılması

	p-değeri
Kansere ait yolaklar	1.09509E -13
Prostat kanseri	4.58318E -11

4.11. Klinik Veriler ile miRNA Karşılaştırması

Tablo 26: Klinik bulgular (cinsiyet, yaş, tanı, NMYC, 1qLOH, 11qLOH, 17qgain, metastaz, histoloji, risk sınıflaması, tedavi protokolü) ile $p < 0.01$ de farklı eksprese olan miRNA'ların karşılaştırılması. Artış ve azalışlar oklar ile, Ortalama (Mean) değerleri ise parantez içinde gösterilmiştir (NB: nöroblastom, GNB: ganglionöroblastom).

Cinsiyet	Erkek	Kız	p değeri
miR-4689	↓ (9.0)	↑ (15.46)	0.023
miR-3373	↑ (15.77)	↓ (9.73)	0.037
miR-4738-3p	↓ (7.64)	↑ (16.62)	0.002
miR-299-3p	↑ (17.86)	↓ (7.96)	0.001
miR-499b-3p	↑ (15.32)	↓ (10.12)	0.044
Yaş	0-17 ay	18 ay ve üstü	p değeri
miR-490-3p	↑ (16.44)	↓ (10.13)	0.034
miR-299-3p	↓ (8.78)	↑ (14.73)	0.045
miR-142-5p	↑ (16.78)	↓ (9.93)	0.022
Tanı	NB	GNB	p değeri
miR-338-5p	↓ (9.88)	↑ (18.0)	0.012
miR-132-5p	↓ (10.06)	↑ (17.5)	0.021
miR-663a	↑ (13.79)	↓ (6.92)	0.033
miR-1269a	↓ (9.88)	↑ (18.0)	0.011
miR-3191-5p	↓ (9.44)	↑ (19.25)	0.02
NMYC	Pozitif	Negatif	p değeri
miR-132-5p	↓ (7.94)	↑ (13.29)	0.05
1pLOH	Pozitif	Negatif	p değeri
miR-4689	↓ (8.0)	↑ (13.73)	0.031
miR-337-3p	↑ (14.6)	↓ (7.73)	0.011
miR-4644	↓ (7.55)	↑ (14.14)	0.014
11qLOH	Pozitif	Negatif	p değeri
miR-139-3p	↑ (14.61)	↓ (8.29)	0.02
17q gain	Pozitif	Negatif	p değeri
miR-299-3p	↑ (14.06)	↓ (8.71)	0.05
Metastaz	Var	Yok	p değeri
miR-505-5p	↓ (5.38)	↑ (13.93)	0.027
miR-421	↓ (6.0)	↑ (13.8)	0.044
miR-151b	↓ (5.0)	↑ (14.0)	0.02
miR-192-5p	↓ (4.75)	↑ (14.05)	0.016

Histoloji	İyi	Kötü	p değeri	
miR-490-3p	⬆️ (14.07)	⬇️ (7.0)	0.014	
miR-4499	⬇️ (9.43)	⬆️ (15.13)	0.046	
miR-4738-3p	⬆️ (13.61)	⬇️ (7.81)	0.041	
Risk Sınıfı	Düşük	Orta	Yüksek	p değeri
miR-3191-5p	⬆️ (10.5)	⬇️ (5.17)	-	0.027
miR-6500-3p	⬆️ (11.2)	⬇️ (4.0)	-	0.003
miR-4723-3p	⬆️ (10.3)	⬇️ (5.5)	-	0.046
miR-338-5p	⬆️ (11.8)	-	⬇️ (6.63)	0.041
miR-132-5p	⬆️ (12.6)	-	⬇️ (5.63)	0.001
miR-490-3p	⬆️ (12.3)	-	⬇️ (6.0)	0.013
miR-505-5p	⬆️ (12.15)	-	⬇️ (6.19)	0.018
miR-744-5p	⬆️ (12.7)	-	⬇️ (5.5)	0.004
miR-421	⬆️ (12.4)	-	⬇️ (5.88)	0.01
miR-663a	⬇️ (6.5)	-	⬆️ (13.25)	0.008
miR-4466	⬇️ (7.2)	-	⬆️ (12.38)	0.041
miR-5195-3p	⬇️ (6.85)	-	⬆️ (12.81)	0.018
miR-6724-5p	⬇️ (6.75)	-	⬆️ (12.94)	0.014
miR-30e-5p	⬆️ (11.8)	-	⬇️ (6.63)	0.041
miR-192-5p	⬆️ (12.00)	-	⬇️ (6.38)	0.026

Klinik veriler ile ekspresyonu yüksek mikroRNA'lar karşılaştırıldığında miRNA ekspresyon farklılığının en çok gözlemlendiği miRNA'lar; miR-132-5p, miR-338-5p, miR-421, miR-490-5p, miR-505-5p, miR-663 ve miR-3191-5p oldu (Tablo 24). Bu miRNA'lar arasında da en belirgin farklılık miR-132-5p ve miR-490-5p de olduğu saptandı. En fazla eksprese olan miRNA'lara ait hedef gen sayıları Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27: Gruplar ve klinik verilerin kıyaslanması sonrası en fazla eksprese olan miRNA'ların TarBase 7.0 ve miRDB veritabanlarındaki hedef gen sayılarını gösteren tablo.

	Hedef Gen Sayısı (TarBase 7.0 ve miRDB)
miR-490-3p	43
miR-132-5p	63
miR-425-3p	69
miR-34a-5p	547
miR-let7d-5p	438
miR-30d-5p	843
miR-30e-5p	849
miR-98a-5p	436
miR-744-5p	87

5. TARTIŞMA

Nöroblastom, çocuklukta en yaygın olarak gözlenen ve bebeklerde kanser ilişkili ölümlere en sık sebep olan ekstrakraniyal solid tümör tipidir (36). Nöroblastom otonom sinir sisteminin embriyonel tümörlerindendir ve nöral krest hücrelerinin farklılaşması sırasındaki düzensizlikler ile ortaya çıkan malign bir tümördür (72, 73). Tümörler sempatik sinir sisteminde, genel olarak adrenal medullada veya spinal gangliyonlarda ortaya çıkar. Bu nedenle de kitleler boyun, abdomen, toraks veya pelviste görülebilmektedir (74, 75). Nöroblastom agresif bir tümördür ve tedaviden bağımsız olarak, spontan gerileme veya matürasyon gösterebilmektedir (7,76). En sık metastaz yaptığı bölge kemik iliği olarak tespit edilmiştir. Fakat bunu haricinde kemik, lenf düğümü ve karaciğer metastazı da görülebilmektedir (77). Nöroblastom; spontan olarak baskılanması veya hızlı bir şekilde ilerlemesinden dolayı geniş spektrumlu klinik davranışları ile oldukça dikkat çekici bir tümördür. Bu durumun sebebi olarak tümörün biyolojik ve genetik karakteristiği gösterilmektedir (73). Nöroblastom tümörlerindeki heterojenite nedeniyle tedavi yaklaşımları da farklı alt gruplara ayrılmıştır (74). Nöroblastomlar dahil kanser hastalığı, çoklu genetik ve epigenetik değişimlerle ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Kanser hücrelerinde bozulmuş olan, fakat normal hücrelerin fenotiplerinin kontrolünü sağlayan düzenleyici yolların epigenetik değişimlerinin ve buna bağlı olarak ortaya çıkan bozuklukların anlaşılması ile yeni tedavi olanaklarının sağlanması mümkündür. Kanser türleri üzerine yapılan ve yapılabilecek olan moleküler patolojik yaklaşımlar ile prognoz, tedaviye yanıtın değerlendirilmesi ve nüks riskinin tahmini için klinik ilişkili genetik veya moleküler belirteçler belirlenmelidir. Bu nedenle de nöroblastom da pek çok tümör gibi, genomik araştırmalara konu olmakta ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için ileri çalışmalar yapılmaktadır (78). Son zamanlarda oldukça geniş çalışma alanına yayılmış olan mikroRNA çalışmaları da bu alanda yapılan umut vaadedici çalışmalar arasındadır.

mikroRNA'lar (miRNA), 19-22 nükleotid uzunluğunda, tek iplikçikten oluşan kodlama yapmayan RNA dizileridir. Bugüne dek 4,500'ün üzerinde olgun miRNA tanımlanmıştır (<http://www.mirbase.org>) ve bu miRNA'ların çoğu türler arasında korunmuşluk göstermektedir. İnsanda bulunan protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının ekspresyonu miRNA'lar tarafından post-transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir. miRNA'lar, hedef mRNA dizisinin 3' transle edilmeyen bölgesindeki (3' UTR) hedef komplementer bölgeyi tanıyıp bağlanarak gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel baskılanmasını sağlarlar (79).

p53, MYC ve miyogenin gibi pek çok transkripsiyon faktörünün miRNA'lar tarafından transkripsiyonel kontrole tabi tutulduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (80).

miRNA'lar hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde, proliferasyonda ve hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır. Bu hayati süreçlerdeki rollerinin yanı sıra, immün cevap (81, 82), insülin salgılama (83), nörotransmitter madde sentezi (84), sirkadiyen ritim (85) ve viral replikasyon (86) gibi pek çok hücrel aktivitede de miRNA'ların rolü vurgulanmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar miRNA'ların, hücrel glikoz seviyesinin devamlılığı, kolesterol, trigliserit ve yağ asidi metabolizmasının düzenlenmesi gibi pek çok metabolik süreçte rol aldığını ve düzenlenmesinde önem teşkil ettiğini göstermiştir (87).

Normal hücrel fonksiyonların devamlılığı için genlerin ekspresyonunun yanından miRNA ekspresyonlarının da düzenlenmesi oldukça önemlidir. miRNA'ların hatalı regülasyonu ile kanser dahil olmak üzere pek çok hastalık ortaya çıkmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar miRNA ekspresyonlarının da kontrollü olarak yapıldığını ve bu durum için enhansörlerin (arttırıcı), susturucu elementlerin ve kromatin modifikasyonlarının önemli rolü olduğu belirtilmektedir. Örneğin; hematopoetik tümörlerde, miR-203 lokusu yoğun miktarda DNA metilasyonuna tabi tutulmaktadır. Fakat bu metilasyon profili normal T lenfositlerinde gözlenmemektedir (88).

Yapılan çalışmalar miRNA'ların karsinogenez ve çeşitli tümörlerin agresif ilerleyişinde rolü olduğunu göstermiştir. Bu tümörlere örnek olarak; meme kanseri (89), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (90), prostat kanseri (91) ve ovaryum kanseri sayılabilir (92). miRNA'lar tümörögenез sırasında, gelişim-spesifik veya doku-spesifik olarak transkribe edilebilmektedirler (79). miRNA'lar, kanser üzerindeki etkilerini onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenleyerek yapmaktadırlar (93-95). miRNA'lar tümör biyolojisine pek çok yönden katkıda bulunmaktadır. Bunlar arasında; proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, invazyon, metastaz ve anjiyogenez üzerinde yaptıkları etkileri saymak mümkündür. Pek çok miRNA, tümör dokularında normal doku karşılıklarına kıyasla yüksek veya düşük ekspresyon göstermektedir. Normal ve kanserli dokuların genel gen ekspresyon profilleri kıyaslandığı zaman, pek çok miRNA ekspresyonunun yeniden düzenlenme geçirdiği gözlemlenebilir. Bu nedenle de tümörögenезde veya kanserin ilerleyişinde, hedef genin onkogenik veya tümör baskılayıcı fonksiyonunu düzenleyen tek bir miRNA'nın değişiminden ziyade tüm miRNome'da meydana gelen değişikliklerden bahsetmek daha doğru olacaktır (60). miRNA profili, tümörlerin gelişimsel hattını ve farklılaşma evresini

gösterdiği için, bu profiller zayıf olarak farklılaşan tümörlerin sınıflandırılması için kullanılabilirler (96). Normal doku ve tümör dokusu arasındaki miRNA farklılığına ek olarak, miRNA ekspresyonu kanser tipine, evresine ve diğer klinik değişkenlere göre de farklılık gösterebilmektedir. miRNA ekspresyonundaki bu farklılıklar veya hatalı düzenlemeler farklı mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bunlardan birincisi, miRNA'ları kodlayan bölgelerde meydana gelebilecek olan ve bu nedenle de ekspresyon profillerini değiştirebilecek olan delesyon, amplifikasyon ve translokasyon gibi genomik anormalliklerdir (60). İkincisi; epigenetik faktörlerdir: yapılan çalışmalar ile pek çok kanser türünde, promotör bölgelerde CpG adacıklarında hipermetilasyon varlığı gösterilmiştir ve bu hipermetilasyonun miRNA ekspresyon profili üzerine yaptığı değişimler ortaya konulmuştur. Örneğin miR-9-1 meme kanserinde CpG hipermetilasyonu ile baskılanmış durumdadır (97). Üçüncü mekanizma; miRNA'ların transkripsiyonel düzenlenmesidir. Pek çok miRNA, transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilmektedir. Kanserde etkili olan pek çok miRNA-transkripsiyon faktörü etkileşimi gösterilmiştir. Bunların arasında p53, c-Myc ve E2F'yi saymak mümkündür. Dördüncü mekanizma ise, miRNA işleme aşamalarının regülasyonudur. Durağan haldeki olgun miRNA seviyesi, o miRNA'nın öncülünden işlenme etkinliğine ve stabilitesine bağlıdır. Eğer öncül miRNA'dan işlenme kapasitesi düşük ise miRNA seviyesi düşük olacaktır. Olgun miRNA halini aldıktan sonra halen düşük stabiliteye sahip ise yıkıma giderek miRNA seviyesinde değişiklik ortaya çıkmasına sebep olacaktır. Tüm bu düzenlenme süreçlerinde meydana gelebilecek olan aksaklıklar, miRNA seviyesinde değişikliklere sebep olacaktır (60).

miRNA'lar nöral ve diğer tip hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle de bu sekansların düzenlenmesindeki bozukluklar farklı tümör tiplerinde tümör baskılayıcı veya onkogenik aktivite kazanılmalarına sebep olabilir. Örneğin miR-15 ve miR-16, kromozomun 13q14 bölgesinde yerleşiktir ve kronik lenfosit lösemide genellikle silinmiş ve/veya düşük-regülasyona sahiptir. Böylece tümör baskılayıcı gen gibi işlev göstermektedirler (98). Bazı lenfoma türlerinde 13. kromozomda bulunan mir-17-92 kümesi over-eksprese durumdadır ve onkogenik aktivite göstermektedir (99). miR-21 gibi bazı miRNA'lar ise kanser hücrelerinde apoptoz yolağı bileşenlerini etkileyerek, antiapoptotik etkiye sahip olurlar (100).

Normal gelişimsel süreçteki rolleri düşünüldüğü zaman, miRNA'ların pediatrik kanser türlerinde oldukça etkili olacağını düşünmek olağandır. Çünkü pediatrik malignite

durumlarında gelişimsel yolaklarda pek çok bozulmalar gerçekleşmektedir. Literatüre bakıldığı zaman, nöroblastom dokularındaki miRNA profilinin çıkarılmasını hedefleyen bazı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile hem miRNA ekspresyonlarının hatalı regüle olmasının nöroblastom patogenezinde etkili olabileceği hemde farklı koşullar altında kıyaslamalı olarak ekspresyon farklılıkları saptanmıştır (66). Bu tez çalışmasında parafine gömülü halde bulunan insan nöroblastom tümör dokularından RNA izolasyonu yapılmış ve ardından mikroarray çalışması ile dört analiz yapılmıştır. Her bir analizde ikişer grup mevcuttur ve bu gruplar arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları kıyaslanmıştır. Spesifik analizler sonrasında ($p < 0.01$) iyi ve kötü differansiasyon kıyaslandığında 25 miRNA, kemoterapi öncesi ve sonrası kıyaslandığında 8 miRNA, iyi ve kötü histoloji karşılaştırmasında 3 miRNA, nöroblastom ve ganglionnöroblastom karşılaştırmasında 4 miRNA, düşük ve orta risk karşılatırılmasında 7 miRNA, orta ve yüksek risk kıyaslandığında 1 miRNA, düşük ve yüksek risk karşılaştırıldığında 14 miRNA farklı eksprese olarak bulunmuştur. De Preter ve ark'nın (71) yaptığı çalışmaya kıyasla çok sayıda farklı eksprese miRNA saptanmıştır. Bununla birlikte çalışmamızda bulduğumuz miR-572'nin farklı ekspresyonu De Preter'in çalışması ile uyumluydu.

Guo ve ark. farede primer ve metastatik nöroblastom tümör dokularının miRNA ekspresyon profillerini kıyaslayarak nöroblastom metastazında görevli olabilecek olan miRNA'ları saptamayı amaçlamışlar ve bunun sonucunda 54 adet miRNA'nın anlamlı olarak farklı ekspresyona sahip olduğunu saptamışlardır (101). Bizim yaptığımız çalışmanın sonuçlarına (I. analiz sonucuna) göre, iyi differansiye olan grup ile kötü differansiye grup arasında ($p < 0.05$ iken) 167 adet farklı eksprese olan miRNA tespit edilmiştir. Nöroblastom açısından bakıldığı zaman, tümör dokusunun differansiasyon derecesi ne kadar çok artarsa o kadar az metastaz yapacağı düşünülmektedir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada Guo ve ark. farelerde yaptığı analiz sonuçlarına kıyasla daha fazla miRNA farklılığı saptanmıştır. Çalışmamızda $p < 0.01$ alındığında ise aynı gruplar arasında 25 adet farklı eksprese olan miRNA tespit edilmiştir. Bunların 10 tanesi up regüle iken, 15 tanesi down regüle olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada miR-10b, miR-29a/b ve miR-335' nin metastatik nöroblastom tümörlerinde up-regüle olduğu bulunmuştur. Bu miRNA'ların up-regülasyonu ile metastazın indüklendiği saptanmıştır. Bu nedenle de bu miRNA'ların metastazı indükleyen miRNA'lardan bazıları olduğu düşünülmüştür. Bunun aksine; miR-7, miR-338-3p ve the let-7 ailesi metastatik gruplarda down-regüle olan miRNA'lardan olarak bulunmuştur (102). Bizim yaptığımız

çalışmada ise let-7 ailesine ait olan hsa-let-7d-5p miRNA'larının ikinci analizde yani kemoterapi öncesi ve kemoterapi sonrasının kıyaslanmasının yapıldığı analizde, bu miRNA'ların iki grup arasında farklı ekspresyonlara sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca nöroblastom ve gangliyonörom kıyaslamasının yapıldığı dördüncü analizde ise hsa-miR-29a-3p ve hsa-miR-335-5p'nin bu iki grup arasında farklı ekspresyonları saptanmıştır ($p < 0.05$). Çalışmamızda klinik veriler ile yapılan analizlerin tamamı değerlendirildiğinde en fazla eksprese olan miRNA'ların miR-490 ve miR-132 olduğu görülmüştür.

Qu ve ark.ları yapmış oldukları çalışma ile heparanazın (HPSE) nöroblastomda yüksek miktarda eksprese olduğunu göstermişlerdir (103). HPSE, endojen endoglikozidazdır ve tümör büyümesini, invazyonu, metastazı ve anjiogenezi tetiklemektedir. Daha sonra yapmış oldukları diğer çalışmaları ile ise, taze insan nöroblastom dokularında ve hücre hatlarında miRNA-558'nin up-regüle edildiğini ve bu durumun HPSE ekspresyonu ile korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu durumun sebebi olarak; miR-558'in HPSE promoter bölgesinde bağlanma bölgesine sahip olmasından ve HPSE' nin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlamasından kaynaklı olduğunu ortaya çıkarmışlardır (104). Bizim yaptığımız çalışmada ise hsa-miRNA-558 ekspresyon farklılığı III. analizde yani iyi ve kötü histoloji gruplamasının yapıldığı analizde gözlemlenmiştir.

Bazı araştırmacılar nöroblastomda önemli rol oynayan spesifik miRNA'lar üzerine odaklanan çalışmalar gerçekleştirmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalar, miR-34a ve miR-17-92 kümesinin en sık rapor edilen miRNA'lardan olduğunu göstermiştir. Welch ve ark. miR-34a'nın primer nöroblastom dokularında ve hücre hatlarında, normal adrenal dokuya göre daha düşük seviyede eksprese olduğunu saptamışlardır. Welch ve ark. bu miRNA'nın üç farklı nöroblastom hücre hattına tekrar aktarılmasını gerçekleştirdikleri deneyler ile, hücre proliferasyonunda düşüş saptamışlardır. Bu durumun sebebi olarak kaspaz-bağımlı apoptotik yolağın aktivasyonu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle de miR-34a'nın nöroblastom tümörogenesi için süpresör olarak davranabileceğine değinmişlerdir (67). miR-17-92 kümesi, Oncomir-1, onkogenik potansiyele sahiptir ve nöroblastom patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Schulte ve ark. miR-17-92 kümesinin ve miR-181 ailesinin, iyi özellikler gösteren nöroblastomda over-eksprese olduğunu, miR-542-5p ve miR-628'in de iyi özellikli nöroblastomlarda eksprese olduğunu fakat kötü özellikli nöroblastomlarda mevcut olmadığını saptamışlardır (105). Yapılan diğer bir çalışma ile hücre hatları ve insan nöroblastom doku örnekleri analiz edilmiş ve üç adet nöral miRNA'nın, miR-9, miR-125 ve miR-125b, primer

nöroblastom tümörlerinde down-regüle olduğunu saptamışlardır. Bu miRNA'ların hücre proliferasyonu üzerine etkisinin olduğu da aynı çalışmada gösterilmiştir (68). Bunun yanı sıra diğer bir çalışmada nöroblastom dokusunda, kanser olmayan komşu dokuya kıyasla, miR-27b'nin down-regüle olduğu saptanmıştır. miR-27b, nöroblastomda tümör baskılayıcı olarak işlev gösteren önemli bir miRNA'dır. Bunu, PPAR γ 'nın (peroksizom proliferatörleri ile aktive edilmiş reseptör γ) tümör-tetikleyici fonksiyonunu inhibe ederek yapmaktadır. Böylece artan oranda inflamatuvar cevap tetiklenmiş olmaktadır (106). Ayrıca miR-29a, miR-29b ve miR-29c'nin normal dokulara kıyasla nöroblastom dokularında down-regüle olduğu saptanmıştır (107).

Yapılan bir çalışmada miR-145 ekspresyonu hem insan nöroblastom tümör dokusunda hem de kültüre edilmiş olan nöroblastom hücre hatlarında, normal dorsal gangliyonlara kıyasla down-regüle edilmiş olarak saptanmıştır (108). Ayrıca miR-145'in overekspresyonu ile nöroblastom hücre hatlarında büyümenin, invazyonun, metastazın ve anjiyogenezin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak baskılandığı bulunmuştur (108). Bizim çalışmamızda dördüncü analizde bulunan gangliyonörom ve nöroblastom gruplarını içeren kıyaslamada $p < 0.05$ iken 20 adet farklı miRNA ekspresyonu saptanmıştır. Bu değer $p < 0.01$ alındığında 4'e düşmektedir. Bir başka çalışmada ise miR-152 ve miR-338'ün pek çok nöroblastom örneğinde ve nöroblastom hücre hatlarında, adrenal bezlere kıyasla over-eksprese olduğu, miR-200b'nin ise hafif bir şekilde down-regüle olduğu saptanmıştır (109). Swarbrick ve ark. miR-380-5p'nin primer nöroblastom örneklerinde insan beynine kıyasla over-eksprese olduğunu ancak bu ekspresyonun bireyin yaşı veya tümör evresi ile ilişkili olmadığını saptamışlardır. Aynı çalışmada embriyonik kök hücre ve nöroblastom hücrelerinde endojen miR-380-5p inhibisyonunun p53 indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (110).

Bu çalışmalara ek olarak nöroblastom differansiyasyonunu ve miRNA'lar arasındaki etkileşimi göstermek adına da bazı çalışmalar yapılmıştır. Nöral krest hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonu ve differansiyasyonun bozulması nöroblastom gelişimi için sebep olarak görülmektedir (111). Pek çok miRNA'nın nöroblastom farklılanmasında görevli olduğu gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak; miR-7, miR-17-92, miR-18a, miR-10a, miR-10b, miR-34a, miR-340, miR-124, miR-214, miR-338 ve miR-125b sayılabilir (111). Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmada $p < 0.05$ alındığında üçüncü analizde yani iyi histoloji ile kötü histolojinin kıyaslamasının yapıldığı gruplar arasında farklı ekspresyon gösteren 35 miRNA arasından bir tanesinin de miR-10a'nın ekspresyon farklılığı olduğu saptanmıştır. Dördüncü

analizde ise yani nöroblastom ve ganglinörom kıyaslamasının yapıldığı gruplar arasında $p < 0.05$ iken farklı ekspresyon gösteren 20 miRNA arasından bir tanesinin de miR-338' nin ekspresyonu olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızla ilgili genel bir değerlendirme yapıldığında, klinik veriler ile ekspresyonu yüksek mikroRNA'lar karşılaştırıldığında miRNA ekspresyon farklılığının en çok gözlemlendiği miRNA'lar; miR-132-5p ve miR-490-3p oldu. Her iki miRNA'nın da yüksek risk grubunda down regüle olduğu saptandı. Özellikle miR-132-5p'in MYCN pozitifliğinde de down regüle olduğu gözlemlendi. Buna karşın ise iyi differansiye grupta artmış olduğu görüldü. Hedef gen analizine (TarBase v7.0) (Tablo 25) bakıldığında miR-132-5p'nin antiapoptotik genlerden biri olan bcl-2'yi de hedeflediği saptandı. MYCN pozitifliğinde bu miRNA'nın düşük olmasının bcl-2 ekspresyonunu arttırdığı ve tümörün apoptozunu önleyerek tümörü büyütebileceğini düşündük. Aynı şekilde miR-490-3p'nin de iyi differansiye grupta artış gösterdiği ve bununla birlikte iyi histoloji grupta, düşük riskli grupta ve 0-17 ay arası yaş aralığındaki grupta artış olduğu saptandı. Hedef gen analizinde miR-490-3p'nin hücre siklusunda antiapoptotik ve bir protoonkogen olan Jun'u hedeflediğini gördük. Analizlerde en fazla ekspresyonu gözlenen miRNA'lardan biri olan miR-425-3p'nin de iyi differansiye ve kemoterapi sonrası gruplarda artmış olduğunu saptadık. Bu miRNA histonların modifikasyonunu düzenleyen genlerden ve histon H4'ü proteinini kodlayan HIST1H4E'yi hedefleyip epigenetik düzenlemelerde etkili olmaktadır. Çalışmamızda farklı eksprese olan miRNA'lardan miR-34a-5p, let-7d, miR-30d, miR-30e, miR-98-5p ve miR-744-5p'nin de MYCN'i hedef aldığı belirlendi. Literatüre baktığımızda da MYCN ile negatif korrelasyon bildirilen bu miRNA'lardan miR-34a kemoterapi sonrası artmış, let-7d ise kemoterapi sonrası azalmıştır. miR-30d ve miR-30e'nin nöroblastom grubuna kıyasla gangliyonörom grubunda artmış olduğu görüldü. MYCN dahil çok sayıda geni etkileyen miR-744-5p ise iyi differansiye ve düşük riskli gruplarda artmış olarak saptandı. miR-98-5p ise validasyon amaçlı ve yeni vakaların incelenmesi amacıyla yapılan eş zamanlı PZR incelemelerinde en fazla kat değişikliğine sebep olan miRNA oldu. Bununla birlikte miR-98-5p kötü histolojiye ait dokuların bir bölümünde artmış iken bir bölüm dokuda azalmış olarak saptandı. Literatürle uyumlu olarak MYCN'i hedefleyen miRNA'ların çoğunlukla MYCN ile negatif korelasyon içinde olduklarını gözlemledik.

Genel olarak bakıldığı zaman, bu çalışmamızda, yapılan her bir analiz için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan pek çok miRNA ekspresyon farklılığı gözlemlendi. Bu farklı ekspresyon profillerinin her biri yukarıda da değinildiği gibi farklı mekanizmalar tarafından

düzenleniyor olabilir. Kıyaslandığı gruba göre farklı ekspresyon gösteren bu miRNA'lar o tipteki tümör için veya o evre için tanımlayıcı birer biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler.

Çalışmanın devamında tüm analizler (I-V. analiz) için yapılan Gene Ontology (GO) analizlerinin sonuçları, gruplar arasında farklı ekspresyon gösteren miRNA'ların ne kadar önemli hücresel işlevlerde rol aldığına bir kanıttır. Bunlar arasında; gelişimsel olayların düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, transkripsiyon, hücre siklusu, embriyolojik gelişim, apoptoz ve nörogenez gibi biyolojik olaylar ve protein dimerizasyon aktivitesi protein bağlanma, çift zincirli DNA bağlama ve serin-treonin kinaz gibi moleküler fonksiyonlar bulunmaktadır. Tüm bu sonuçlar miRNA'ların hücre içi ve hücre dışı ne kadar önemli fonksiyonlara sahip olduğunun bir göstergesidir. KEGG yolak analizlerinde farklı eksprese olan miRNA'ların oluşturduğu en yüksek skorlar kanser yolağına aittir. Bununla birlikte kemoterapi öncesi ve sonrası analizinde hücre siklusu yolağı da en yüksek skoru almıştır.

miRNA'ların ekspresyonu dinamiklidir. Yani pek çok miRNA erken evre tümör gelişimi sırasında yeniden düzenlenmektedir ve kanserin ilerleme periyodunda zamanla up-regüle veya down-regüle olmaktadır (112, 113). miRNA ekspresyon profillemesi, sinir sisteminin embriyonel ve farklılaşmış olan dokularının karakterizasyonu için (114), kanser hücrelerini normal dokulardan ayırt etmek için (115) ve evreleme işlemleri için ayırt edici olarak kullanılabilir. Ayrıca, artmış hastalık riski taşıyan bireylerin tanımlanması için de miRNA'ların kullanılabileceği düşünülmektedir (116).

miRNA'ların kanser gelişimi ve ilerlemesindeki etkili rollerinin ortaya çıkması sonucunda, klinik uygulamalarda kullanımları ve yeni birer biyobelirteç olarak değerlendirilme adaylıkları söz konusudur. Tüm bu nedenlerden dolayı miRNA'lar tümörögenез mekanizmalarının araştırılması için yeni bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar ve bu tez, miRNA temelli stratejilerin nöroblastom tanı, prognoz ve tedavi amaçlı olarak potansiyel kullanımlarını gündeme getirmektedir. Bu durum miRNA'ların antikanser terapileri için yeni hedefler olmasına yol açmaktadır. Mirna Therapeutics firmasının Haziran 2014 yılında başlattığı faz I klinik çalışmada primer karaciğer kanseri, solid tümörler ve hematopoetik tümörlerin tedavisinde miRNA-34 (mRX-34)'nın lipozomal enjeksiyon ile kullanımı bunun en güzel örneğidir (117).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nöroblastom çoğu zaman tam kürün elde edilemediği ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerektiren bir çocukluk çağı tümörüdür. Kişiye özel, hedefe yönelik tedaviler ve epigenetik tedaviler kanser tedavi stratejilerini değiştirmiştir. Spontan regresyondan metastaza kadar geniş bir prognostik yelpazeye sahip nöroblastom hastalarında tedaviyi ve prognozu iyileştirmek için mikroRNA profilleri ile birlikte hedef gen analiz çalışmaları arttırılmalı ve her ikisi birlikte (miRNA ve mRNA) değerlendirilmelidir. Bu tedavilere ışık tutması bakımından çalışmamızda klinik, histolojik derece, differansiyasyon ve tedavi durumları açısından farklı olan nöroblastom hasta dokularında mikroRNA ekspresyon profilleri ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda klinik veriler ile mikroRNA'lar karşılaştırıldığında en belirgin farklılık miR-132 ve miR-490' de görüldü. Yüksek riskli ve düşük riskli yeni hastaların tümör dokuları arasında en çok kat değişimi de miR-98-5p' de belirlendi. Farklı eksprese olan miRNA'lar için yapılan yolak analizinde de bu miRNA'ların en çok olarak kanser yolağını hedefledikleri saptandı.

Çalışmadaki bütçe kısıtlılığı örnek sayısını sınırlandırmamıza neden olmuştur. Bu sebeple ileride yapılacak çalışmalarda örneklem grupları genişletilmeli ve aynı zamanda sonuçların benzerliği ve tekrarlanabilirliği gösterilmelidir. Geniş hasta sayıları ile yapılan analizlerin sonrasında benzer şekilde farklı eksprese olan miRNA'lar biyobelirteç açısından değerlendirilebilir. Yine çalışmamızda klinik verilerin (cinsiyet, yaş, tanı, moleküler belirteç, risk sınıfı gibi) analizinde daha yüksek hassasiyette ($p < 0.01$) farklı eksprese olan miRNA'ların karşılaştırılması yapılmıştır. İleride planlanacak çalışmalarda bütçe miktarı arttırılarak mikroarray profillemeye ile bu veriler de karşılaştırılabilir.

Bununla birlikte farklı eksprese olan miRNA'lara ait antagomir veya miRNA mimikler ile önce hayvan çalışmaları sonrasında da faz 1-3 hasta çalışmaları ile yeni tedavi stratejileri geliştirilebilir. Bu nedenle bu konu açısından çalışmamız bir ön çalışma olarak değerlendirilebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar özellikle prognoz ve tedavideki biyobelirteç çalışmalarına ve bu alandaki literatüre önemli bir katkı sağlayabilir.

Ayrıca hastaların kan örnekleri ile karşılaştırma yapılamadığından ileriki çalışmalarda doku düzeyleri ile birlikte hastalara ait kan örneklerinde de miRNA mikroarrayleri yapılarak prognostik ve tanısal belirteç değerlendirmeleri ve hedefleri güçlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Gurney JG, Davis S, Severson RK, Fang JY, Ross JA, Robison LL. Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer* 1996; 78:532-41.
2. Gurney JG, Ross JA, Wall DA, Bleyer WA, Severson RK, Robison LL. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19:428-32.
3. Aksoylar S, Nöroblastom. *Klinik Gelişim*, 2007, 20 (2) 62-72.
4. Gurney JG, Ross JA, Wall DA, et al. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19:428.
5. Demirkaya M, Sevinir B. Nöroblastom. *Güncel Pediatri* 2006; 3: 128-132.
6. <http://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq> (National Cancer Institute (NCI) Neuroblastoma Treatment for health professionals)
7. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007 Jun 23;369(9579):2106-20.
8. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):349-63.
9. Gregorio A, Corrias MV, Castriconi R, Dondero A, Mosconi M, Gambini C, Moretta A, Moretta L, Bottino C. Small round blue cell tumours: diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule. *Histopathology*. 2008 Jul;53(1):73-80.
10. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 5th ed, Philadelphia: Lippincott-Roven, 2006; p. 933-970.
11. Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR, Urbanek M, Shusterman S. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6651-8.
12. Maris JM, Brodeur GM. Genetics. *Neuroblastoma. Pediatric Oncology* 2005, pp 21-26.
13. American Society of Clinical Oncology, Cancer.Net, Neuroblastoma-Childhood: Risk Factors (<http://www.cancer.net/cancer-types/neuroblastoma-childhood/risk-factors>)
14. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct; 75 (4):727-30.
15. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHOX2B>

16. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, Pei D, Sharma B, Vetharoy WR, Hallsworth A, Ahmad Z, Barker K, Moreau L, Webber H, Wang W, Liu Q, Perez-Atayde A, Rodig S, Cheung NK, Raynaud F, Hallberg B, Robinson SP, Gray NS, Pearson AD, Eccles SA, Chesler L, George RE. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2012 Jul 10;22(1):117-30.
17. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2002 Jul-Aug;22(4):911-34.
18. Patoloji Dernekleri Federasyonu Pediatrik ve perinatal patoloji grubu Değerlendirme Standartları ve Kılavuzları, 2010, 31- 36 (<http://www.turkpath.org.tr/>).
19. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2002 Jul-Aug;22(4):911-34.
20. Stanford University, Surgical Pathology Criteria, Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma and Ganglioneuroma (<http://surgpathcriteria.stanford.edu/srbc/neuroblastoma-ganglioneuroblastoma-ganglioneuroma/printable.html>)
21. Dogan G, Ocalan K, Solak O. Mediastinal Ganglionöroma: Olgu Sunumu. *Kocatepe Tıp Dergisi Kocatepe Medical Journal* 13: 37-41/ Ocak 2012.
22. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) NÖROBLASTOM-2009 Tedavi Protokolü (http://www.tpog.org.tr/pdf/15_09_2009.pdf)
23. Van Roy N, De Preter K, Hoebeeck J, Van Maerken T, Pattyn F, Mestdagh P, Vermeulen J, Vandesompele J, Speleman F. The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Med*. 2009 Jul 27;1(7):74. doi: 10.1186/gm74.
24. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYCN>
25. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991 Mar 8;251(4998):1211-26.
26. Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol*. 2001 Dec;54(12):897-910.
27. Altungoz O, Aygun N, Tumer S, Ozer E, Olgun N, Sakizli M. Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p36 status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 15;172(2):113-119.

28. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313(18):1111-1116.
29. Spitz R, Hero B, Skowron M, Ernestus K, Berthold F. MYCN-status in neuroblastoma: characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification. *Eur J Cancer* 2004; 40(18):2753-2759.
30. Lutz W, Stohr M, Schurmann J, Wenzel A, Lohr A, Schwab M. Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 1996; 13:803-12.
31. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:405-14.
32. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1900-8.
33. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Oct 1;3(10):a014415.
34. 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 Apr 14;24(16):2684-94.
35. Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer L. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*. 1997 Sep; 61(3):642-50.
36. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):203-16.
37. American Society of Clinical Oncology, Cancer.Net, Neuroblastoma-Childhood:Overview, <http://www.cancer.net/cancer-types/neuroblastoma-childhood/stages-and-groups>
38. Castel V1, García-Miguel P, Cañete A, Melero C, Navajas A, Ruíz-Jiménez JI, Navarro S, Badal MD. Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS)

- and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting. *Eur J Cancer*. 1999 Apr;35(4):606-11.
39. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3756s1_07_REYNOLDS/sld004.htm
40. Mullassery D, Dominici C, Jesudason EC, McDowell HP, Losty PD. Neuroblastoma: contemporary management. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2009 Dec;94(6):177-85.
41. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros VR. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.
42. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. Elegans*. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2654-9.
43. <http://www.mirbase.org/index.shtml>
44. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391, 806–811.
45. Dell'aversana C, Altucci L. miRNA-mediated deregulation in leukemia. *Front Genet*. 2012 Nov 15;3:252.
46. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957–66.
47. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051–60.
48. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415–9.
49. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231–5.
50. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95–8.
51. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834–8.

52. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61.
53. Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Development of Small RNA Delivery Systems for Lung Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2015 Mar 6;16(3):5254-5270.
54. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55.
55. Iwasaki S, Sasaki HM, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tadakuma H, Tomari Y. Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex. *Nature*. 2015 Mar 30.
56. Felekis K, Touvana E, Stefanou Ch, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010 Oct;14(4):236-40.
57. Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA*. 2006 Jul;12(7):1161-7. Epub 2006 May 31.
58. Pritchard CC, Heather H, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics* 2012, 13, 358-369.
59. Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem*. 2009 Jun;394(4):1117-24.
60. Lee YS, Dutta A . MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:199-227.
61. Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther*. 2007 Dec;15(12):2070-9.
62. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv*. 2008;452(1):1-10.
63. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007 Feb 1;302(1):1-12.
64. Cheng CJ, Slack FJ. The Duality of OncomiR Addiction in the Maintenance and Treatment of Cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass)*. 2012;18(3):232-237.
65. Stallings RL. MicroRNA Involvement in the Pathogenesis of Neuroblastoma: Potential for MicroRNA Mediated Therapeutics. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(4):456-462.

66. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):976-83.
67. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2007 Jul 26;26(34):5017-22.
68. Laneve P, Di Marcotullio L, Gioia U, Fiori ME, Ferretti E, Gulino A, Bozzoni I, Caffarelli E. The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 8;104(19):7957-62.
69. Tivnan A, Foley NH, Tracey L, Davidoff AM, Stallings RL. MicroRNA-184-mediated inhibition of tumour growth in an orthotopic murine model of neuroblastoma. *Anticancer Res.* 2010 Nov;30(11):4391-5.
70. Verissimo CS, Molenaar JJ, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E. Neuroblastoma therapy: what is in the pipeline?. *Endocrine-Related Cancer* 2011; 18 R213–R231.
71. De Preter K, Mestdagh P, Vermeulen J, Zeka F, Naranjo A, Bray I, Castel V, Chen C, Drozynska E, Eggert A, Hogarty MD, Izycka-Swieszewska E, London WB, Noguera R, Piqueras M, Bryan K, Schowe B, van Sluis P, Molenaar JJ, Schramm A, Schulte JH, Stallings RL, Versteeg R, Laureys G, Van Roy N, Speleman F, Vandesompele J. miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7684-92.
72. Morandi F, Corrias MV, Pistoia V. Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Jan;1335:23-31.
73. Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Olsen L, Pahlman S. A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest.* 1996; 75:659–75.
74. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010, 10;362(23):2202-11.
75. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR. *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999.
76. Davidoff AM. Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery* 2012; 21, (1): 2–14.

77. Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE, DeClerk YA. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer research* 1998; May 15;58(10):2209-16.
78. Speleman F, De Preter K, Vandesompele J. Neuroblastoma genetics and phenotype: a tale of heterogeneity. *Semin Cancer Biol.* 2011 Oct;21(4):238-44.
79. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861–874.
80. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:126-139.
81. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol* 2007;85:458–62.
82. Calame K. MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity* 2007;27:825–7.
83. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226–30.
84. Greco SJ, Rameshwar P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15484–9.
85. Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, Nakazawa T, Shimizu K, Okamura H, Impey S, Obrietan K. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 2007;54:813–29.
86. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309:1577–81.
87. Rottiers V, Naar AM: MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:239-250.
88. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, Croce CM, Fernández-Piqueras J, Malumbres M. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13:496-506.
89. Schwarzenbacher D, Balic M, Pichler M. The role of microRNAs in breast cancer stem cells. *Int J Mol Sci* 2013;14:14712-14723.
90. Xie Y, Todd NW, Liu Z, Zhan M, Fang H, Peng H, et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;67:170-176.

91. Gandellini P, Giannoni E, Casamichele A, Taddei ML, Callari M, Piovan C, Valdagni R, Pierotti MA, Zaffaroni N, Chiarugi P. miR-205 hinders the malignant interplay between prostate cancer cells and associated fibroblasts. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 1;20(7):1045-59.
92. Di Leva G, Croce CM. The role of microRNAs in the tumorigenesis of ovarian cancer. *Front Oncol* 2013;3:153.
93. Cho WC. MicroRNAs in cancer—from research to therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805:209–217.
94. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:259–269.
95. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:857–866.
96. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
97. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, Kreipe H. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol*. 2008 Jan;214(1):17-24.
98. 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;99:15524–9.
99. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11755–60.
100. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65:6029–33.
101. Guo J, Dong Q, Fang Z, Chen X, Lu H, Wang K, Yin Y, Cai X, Zhao N, Chen J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Identification of miRNAs that are associated with tumor metastasis in neuroblastoma. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 9, 446–452.

102. Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene*. 2010 Feb 18;29(7):937-48.
103. Zheng LD, Tong QS, Tang ST, Du ZY, Liu Y, Jiang GS, Cai JB. Expression and clinical significance of heparanase in neuroblastoma. *World J Pediatr*. 2009 Aug;5(3):206-10.
104. Qu H, Zheng L, Pu J, Mei H, Xiang X, Zhao X, Li D, Li S, Mao L, Huang K, Tong Q. miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase. *Hum Mol Genet*. 2015 Jan 23. pii: ddv018.
105. Schulte JH, Marschall T, Martin M, Rosenstiel P, Mestdagh P, Schlierf S, Thor T, Vandesompele J, Eggert A, Schreiber S, Rahmann S, Schramm A. Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:5919–5928.
106. Lee JJ, Drakaki A, Iliopoulos D, Struhl K. MiR-27b targets PPARgamma to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2012; 31:3818–3825.
107. Xu H, Cheung IY, Guo HF, Cheung NK. MicroRNA miR- 29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res* 2009; 69:6275–6281.
108. Zhang H, Pu J, Qi T, Qi M, Yang C, Li S, Huang K, Zheng L, Tong Q. MicroRNA-145 inhibits the growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells through targeting hypoxia-inducible factor 2 alpha. *Oncogene* 2014; 33:387–397.
109. Ragusa M, Majorana A, Banelli B, Barbagallo D, Statello L, Casciano I, Guglielmino MR, Duro LR, Scalia M, Magro G, Di Pietro C, Romani M, Purrello M. MIR152, MIR200B, and MIR338, human positional and functional neuroblastoma candidates, are involved in neuroblast differentiation and apoptosis. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88:1041–1053.
110. Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, Chanthery Y, Lim L, Ashton LJ, Judson RL, Huskey N, Blelloch R, Haber M, Norris MD, Lengyel P, Hackett CS, Preiss T, Chetcuti A, Sullivan CS, Marcusson EG, Weiss W, L'Etoile N, Goga A. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN amplified neuroblastoma. *Nat Med* 2010; 16:1134–1140.
111. Zhi F, Wang R, Wang Q, Xue L, Deng D, Wang S, Yang Y. MicroRNAs in neuroblastoma: small-sized players with a large impact. *Neurochem Res*. 2014 Apr;39(4):613-23.

112. White NM, Bao TT, Grigull J, Youssef YM, Girgis A, Diamandis M, Fatoohi E, Metias M, Honey RJ, Stewart R, Pace KT, Bjarnason GA, Yusef GM. miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: Biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *J Urol*. 2011 Sep;186(3):1077-83.
113. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting non-invasive and early stage disease. *Oncologist*. 2010;15(7):673-82.
114. Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol*. 2007;8(8):R173.
115. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: Short RNAs go a long way. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):586-91.
116. Osaki M, Takeshita F, Ochiya T. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers*. 2008 Nov;13(7):658-70.
117. A Multicenter Phase I Study of MRX34, MicroRNA miR-RX34 Liposomal Injection, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971>

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Raporu (EK 1)

Karar No:2011/19-10		Tarih:09.06.2011			
AÇIKLAMA		Prof.Dr.Nur OLGUN'un sorumluluğu olduğu "Nöroblastom MükürRNA İhtkusu" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI		Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği - Iyı Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>B. Önvural</i>
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEÜ Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>B. Üstün</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>O. Açıkgoz</i>
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>M. Malkoç</i>
Prof.Ph.D.Zuhul BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEÜ Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Z. Bahar</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOĞMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>N. Sarıoğlu</i>
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>O. Topalak</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>E. Böber</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>H. Baskın</i>
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>S. Akar</i>
Doç.Dr.Makdûdes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>M. Güneli</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKUTUK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>A. Özkutuk</i>
Doç.Dr.Tpı TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>T. Tekmek</i>
Prof.Ph.D.Meltem Kotlu GURSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>M. Gürsel</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İktisat Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>I. Çelikdemir</i>

8.2. Laboratuvar Kullanım İzin Belgesi (EK2)



TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı



Sayı : 51202101 / 63
Konu :

04.06.2015

İlgili Makama;

Prof.Dr. Nur OLGUN'un yöneticisi olduğu, laboratuvar sorumluluğunu Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'ın gerçekleştireceği, "Nöroblastom Mikro RNA ilişkisi" isimli araştırmanın Laboratuvar Çalışmalarının Temel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında uygulanması uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji AD Bşk.

Mithatpaşa Caddesi No:1606 İnciraltı 35340 İzmir
Tel: 0(232) 412 8201 Fax: 0(232) 278 9495
e-posta: temelonkoloji@deu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için
Gülperi ÇANKAYA
Tel.: 412 8201



8.3. Özgeçmiş ve Yayın Listesi

ÖZGEÇMİŞ

Prof. Dr. Kemal ERGİN

TC Kimlik No / Pasaport No:	15833397616
Doğum Yılı:	1973
Yazışma Adresi:	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD , 09010 Aydın/Türkiye
Telefon:	256-2253166
e-posta:	kemalergin@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Adnan Menderes Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Histoloji ve Embriyoloji	Tıpta Uzmanlık	2002
Türkiye	Ege Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıp	Lisans	1996

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Adnan Menderes Üniversitesi	Türkiye	Aydın	Tıp Fakültesi	Doç. Dr.	2010-2015
Adnan Menderes Üniversitesi	Türkiye	Aydın	Tıp Fakültesi	Yrd. Dr.	2004-2010

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Embriyoloji, kök hücre, mikroRNA

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			3
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			7
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			59
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		6
	Doktora		1
	Uzmanlık	1	

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi Poster Sunumu Üçüncüsü	Türk Oftalmoloji Derneği	2014

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Çakmak H1, Ergin K, Bozkurt G, Kocatürk T, Evliçoğlu GE. The effects of topical everolimus and sunitinib on corneal neovascularization. <i>Cutan Ocul Toxicol.</i> 2015 Apr 13;1-7.
Kocaturk T1, Ergin K, Cesur G, Evlicoglu GE, Cakmak H. The effect of methimazole-induced postnatal hypothyroidism on the retinal maturation and on the Sirtuin 2 level. <i>Cutan Ocul Toxicol.</i> 2015 Mar 11;1-5.
Ek RO, Serter M, Ergin K, Cecen S, Unsal C, Yildiz Y, Bilgin MD. Protective effects of citicoline on TNBS-induced experimental colitis in rats. <i>Int J Clin Exp Med.</i> 2014 Apr 15;7(4):989-97. eCollection 2014.
Yildiz, Y., H. Kose, S. Cecen, K. Ergin , E.M. Demir, M. Serter, "Protective Effects of Leflunomide on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury : Leflunomide against intestinal ischemia-reperfusion", <i>Dig Dis Sci.</i> , 2010 Feb;55(2):245-52.
Yildiz, Y., M. Serter, RO Ek, K. Ergin , S. Cecen, EM Demir, C. Yenisey, "Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on intestinal ischemia-reperfusion injury", <i>Dig Dis Sci.</i> , 54 (4), 738-744 (2009).
Ergin, K. , E. Gürsoy, Y. Başımoğlu Koca, H. Başaloğlu, K. Seyrek, "Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-beta2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary", <i>Cytokine</i> , 43 (2), 209-14 (2008).
Ek, R.O., M. Serter, K. Ergin , Y. Yildiz, S. Cecen, T. Kavak, C. Yenisey, "The Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on TNBS-induced Colitis in Ovariectomized Rats," <i>Dig Dis Sci.</i> , 53 (6), 1609-1617 (2008).
Gürsoy, E., K. Ergin , H. Başaloğlu, Y. Koca, K. Seyrek, "Expression and localisation of Bcl-2 and Bax proteins in developing rat ovary," <i>Res. Vet. Sci.</i> , 84 (1), 56-61 (2008).
Ergin, K. , H. Aktuğ, H. Başaloğlu, H.K. Başaloğlu, M. Yilmaz, M. Turgut, "The effect of leptin on adrenal glands in rats with streptozotocin-induced diabetes: an experimental study," <i>Anal. Quant. Cytol. Histol.</i> , 29 (5), 291-295 (2007).
Turgut, M., S. Erdogan, K. Ergin , M. Serter, "Melatonin ameliorates blood-brain barrier permeability, glutathione, and nitric oxide levels in the choroid plexus of the infantile rats with kaolin-induced hydrocephalus," <i>Brain Res.</i> , 1175 , 117-125 (2007).
Aktuğ, H., K. Ozdedeli, B. Altay, I. Cüreklibatir, O. Yilmaz, S. Albay, K. Ergin , M. Turgut, "Postpubertal testicular/epididymal epithelial thickness alterations in unilateral epididymal/vasal obstruction of prepubertal rats," <i>Arch Androl.</i> , 52 (6): 417-421 (2006).

Tez ve Tez ile İlişkili Yayınlar ve Bildiriler:

1. Kemal Ergin, S. Aktaş, Z. Altun, G. Dınız, N. Olgun. Nöroblastom mikroRNA ilişkisi (Poster). 20. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 2013, Bildiri Özetleri Kitabı, s.299

2. Kemal Ergin, S. Aktaş, Z. Altun, G. Dınız, N. Olgun. Expression profiling of microRNAs in neuroblastoma tumors in different stages and histology. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR), Münih, 2014, Poster sunumu (no: 442).

3. Kemal Ergin, S. Aktaş, Z. Altun, G. Dınız, N. Olgun. Expression profiling of microRNAs in neuroblastoma tumors in different stages and histology (Abstract). European Journal of Cancer, vol: 50, supplement 5, July, 2014, S106.