

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOM MOLEKÜLER TEMELİNİN
KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI: YÜKSEK
RİSK GRUBU, YÜKSEK RİSK VE ULTRA-
YÜKSEK RİSK GRUBU OLARAK
SINIFLANDIRILABİLİR Mİ?**

AYŞE BANU DEMİR

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
İZMİR-2016**

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970101

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOM MOLEKÜLER TEMELİNİN
KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI: YÜKSEK
RİSK GRUBU, YÜKSEK RİSK VE ULTRA-
YÜKSEK RİSK GRUBU OLARAK
SINIFLANDIRILABİLİR Mİ?**

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

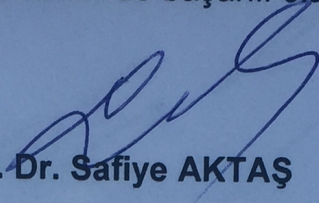
AYŞE BANU DEMİR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2014.KB.SAG.16 sayı ile desteklenmiştir.)

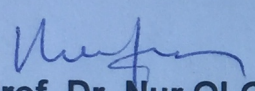
TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970101

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Ayşe Banu Demir
'NÖROBLASTOM MOLEKÜLER TEMELİNİN KLİNİK ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI: YÜKSEK RİSK GRUBU, YÜKSEK RİSK VE ULTRA-
YÜKSEK RİSK GRUBU OLARAK SINIFLANDIRILABİLİR Mİ?' konulu
Yüksek Lisans tezini 21.06.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

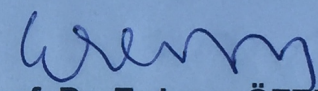
BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Nur OLGUN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Erdener ÖZER

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Kemal ERGİN

YEDEK ÜYE

Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Nöral Krest Hücre Diferensiyasyonu	6
2.3. Nöroblastom	8
2.3.2. Klinik Belirtileri	8
2.3.3. Tümör Histolojisi	8
2.3.4. Sınıflandırılması	9
2.3.5. Genetiği	10
2.3.5.1. Germ hücrelerindeki genetik değişiklikler	10
2.3.5.2. Somatik hücrelerdeki genetik değişiklikler	11
2.3.5.2.1. 1p Delesyonu	11
2.3.5.2.2. Kromozom 2p kolu amplifikasyonu	11
2.3.5.2.3. 11q Kaybı	12
2.3.5.2.4. 17q Kazancı	12

2.3.5.2.5. Nöroblastomda hedef olabilecek diğer kromozomal bölgeler	12
2.3.5.2.6. ALK1, ETV5, HIF1a, HIF1b,H2AX ve ATRX Genlerinin	13
2.3.6. Nöroblastomda Genom-düzeyinde yapılan çalışmalar	13
2.3.7. Prognostik Faktörler	13
2.3.7.1. Nötrofin reseptörleri	14
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	15
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	15
3.4. Çalışma Materyali	15
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	15
3.6. Veri Toplama Araçları	16
3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	16
3.6.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	16
3.6.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	16
3.6.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
3.6.2. Doku örneklerinin Toplanması ve saklanması	17
3.6.3. DNA indeksi analizi.....	18
3.6.4. DNA izolasyonu ve Moleküler inceleme	18
3.6.5. Ekspresyon Analizleri	20
3.6.5.1. RNA Ekstraksiyonu.....	20
3.6.5.2. cDNA Sentezi	21
3.6.5.3. Eş-zamanlı PCR Analizleri:	21
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	22
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	24
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	24

3.10. Etik Kurul Onayı.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. Hastaların Risk Sınıflarının Belirlenmesi	26
4.2. ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a, H2AFX ve ETV5 genlerinin ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	31
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49
8.EKLER.....	62
8.1. Etik Kurul Onayı.....	62
8.2. Özgeçmiş.....	66

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Uluslar arası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS) (90).....	9
Tablo 2. INRG Tedavi öncesi Evreleme Şeması (55,96).....	10
Tablo 3. PCR Reaksiyon Aşamaları.	22
Tablo 4. Düşük risk grubu hastaların, risk sınıflamasında kullanılan moleküler ve klinik verileri	28
Tablo 5. Yüksek risk grubu hastaların, risk sınıflamasında kullanılan moleküler ve klinik verileri	29
Tablo 6. Düşük risk grubu hastaların değerlendirilen gen ekspresyon değerleri. (Çalışmayan örnekler “0” rakamı ile ifade edilmiştir. Bu örnekler, hesaplamalara dahil edilmemiştir).....	31
Tablo 7. Yüksek risk grubu hastaların değerlendirilen gen ekspresyon değerleri ...	33

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Trunk nöral Krest Hücrelerinin A) Oluşumu, B) Göç Yolakları C) Medial Yolak türevleri (102)	7
Şekil 2: Projenin genel akış şeması.....	24
Şekil 3: Nöroblastom kısıtlı yeterli örnek imprintinin Toludin mavi boyası ile boyanmış görüntüsü.	26
Şekil 4: Nöroblastom yeterli örnek imprintinin Toludin mavi boyası ile boyanmış görüntüsü.....	27
Şekil 5: Otolitik örnek imprintinin Toludin mavi boyası ile boyanmış görüntüsü.	27
Şekil 6: Blastik hücreler arasında iri ganglion benzeri, bazıları multinükleer hücreler içeren dokundurma preparatı.	27
Şekil 7. Yüksek ve düşük risk grubu ALK ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.036)	35
Şekil 8. Yüksek ve düşük risk grubu ATRX ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.000)	35
Şekil 9. Yüksek ve düşük risk grubu HIF1a ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.013)	36
Şekil 10. Yüksek ve düşük risk grubu HIF2a ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.007)	36
Şekil 11. Yüksek ve düşük risk grubu H2aFX ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.005)	36
Şekil 12. Yüksek ve düşük risk grubu ETV5 ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.090)	37
Şekil 13. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların ALK1 ekspresyon profili. ...	38
Şekil 14. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların ATRX ekspresyon profili. .	39
Şekil 15. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların HIF1a ekspresyon profili. .	40
Şekil 16. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların HIF2a (EPAS) ekspresyon profili.	41
Şekil 17. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların H2aFX ekspresyon profili. .	42
Şekil 18. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların ETV5 ekspresyon profili. ...	43

KISALTMALAR

NB : Nöroblastom

GNB: Ganglionöroblastom

GN: Ganglionörom

PKMH : Periferik Kan Mononükleer Hücreler

DI : DNA İndeksi

RNA: Ribonükleik Asit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

PCR : Polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

ATRX: X'e bağlı Alfa Talesemi/Mental retardasyon Sendromu

HIF1a: Hipoksia indükleyici Faktör 1

HIF2a (EPAS): Hipoksia indükleyici Faktör 2

H2AFX: H2A Histon ailesi, Üye X

ETV5: ETS Variant 5

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında sağlanan maddi desteklerle yapılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) komisyonuna, Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'na ve bu çalışmada emeği geçen herkese teşekkür ederiz.



ÖZET

NÖROBLASTOM MOLEKÜLER TEMELİNİN KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI: YÜKSEK RİSK GRUBU, YÜKSEK RİSK VE ULTRA-YÜKSEK RİSK GRUBU OLARAK SINIFLANDIRILABİLİR Mİ?

MSc. PhD. Ayşe Banu Demir

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji
Anabilim Dalı, İZMİR

Nöroblastom simpatik sinir sisteminin nöral krestinden köken alan, en sık görülen pediatrik nöroendokrin tümörüdür. Nöroblastik tümörler, farklı tedavi sonuçlarına neden olan, ekstrem heterojenite göstermektedir. Nöroblastom, düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç ana risk sınıfı ile kategorize edilmektedir. Hastaların risk kategorisinin belirlenmesinde, moleküler değerlendirmeler giderek önem kazanmıştır. Son zamanlarda nöroblastom tedavi protokolünü etkileyebilecek farklı genlerin literatüre girmesi ile risk sınıflandırmalarının da alt gruplara ayrılıp ayrılamayacağı gündeme gelmiştir. Bu çalışma ile, yüksek risk grubu içinde çok kötü prognoz gösteren hastalarda, bu hastaların 'ultra-yüksek risk' olarak ayrı bir alt-gruba ayrılmasında rol oynayabilecek bazı genlerin ekspresyonları araştırılmıştır. Bu amaçla, TPOG (Türk Pediatrik Onkoloji Grubu) protokolü kapsamında gerçekleştirilen nöroblastom klinik ve moleküler analizlerin sonuçları değerlendirilerek, sırasıyla yirmi beş ve yirmi dokuz tane, düşük ve yüksek risk grubu hastası seçilmiş ve analiz edilmiştir. Seçilen hastalarda, ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a (EPAS), H2AFX ve ETV5 genlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. Bu genlerin, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, 11q kaybı ve ALK dışındaki genlerin ise 17q kazancı ile ilişkili olmadığı bulunmuştur. ALK ekspresyonunun 17q kazancı pozitif hastalarda daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0.018$). ETV5 dışında genlerin, yüksek risk grubunda anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Ultra-yüksek risk ve yüksek risk grubu hastaları karşılaştırıldığında, ALK ekspresyonunun ultra-yüksek risk grubunda daha fazla ($p=0.027$), ATRX geninin ise yüksek risk grubu hastalarda

daha az eksprese olduğu (p=0.01) bulunmuştur. Elde edilen verilere göre, ALK geninin yüksek risk grubu içerisinde “ultra-yüksek risk” alt grubunun ayrımında belirteç olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, yüksek risk, ultra-yüksek risk, ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a (EPAS), H2AFX, ETV5



ABSTRACT

ASSESSMENT OF CLINICAL IMPORTANCE OF MOLECULAR BASIS OF NEUROBLASTOMA: CAN HIGH RISK GROUP BE CATEGORIZED AS HIGH RISK AND ULTRA-HIGH RISK?

MSc. PhD. Ayşe Banu Demir

Corresponding Address: Dokuz Eylul University, Institute of Oncology,
Department of Basic Oncology, İZMİR

Neuroblastoma is the most common pediatric neuroendocrine tumor that arise from the neural crest of sympathetic nervous system. Neuroblastic tumors exhibit extreme heterogeneity, which results in different therapy outcomes. Neuroblastoma is mainly categorized into three risk groups as low, intermediate and high. Molecular evaluation has come into prominence for determination of the risk categories. Recently, identification of new genes that may affect the therapy outcome, raised the possibility of the presence of sub-risk groups. With this study, we aimed to assess the expression of some genes that may play role in identification of “ultra-high risk” group of patients. We analyzed, twenty-five and twenty-nine, low- and high- risk group of patients, respectively, who were chosen according to molecular and clinical data of routine Turkish Society of Pediatric Oncology (TPOG) 2009-protocol. Expression of ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a (EPAS), H2AFX and ETV5 genes were evaluated among these patients. No significant relation was found between these genes and status of MYCN amplification, 1p loss, 11q deletion and 17q gain, except ALK, which is found to be highly expressed in patients with 17q gain($p=0.018$). All genes found to be highly expressed in high-risk group compared to low-risk group, except ETV5. When “ultra-high-risk” and high-risk groups were compared, ALK found to be highly expressed in “ultra-high- risk” group($p=0.027$) significantly, while ATRX found to be highly expressed in high-risk group($p=0.01$). Our results show that, ALK can be a candidate gene that may be used to distinguish the “ultra-high risk” subgroup among high risk group of patients.

Keywords: Neuroblastoma, high risk, ultra-high risk, ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a (EPAS), H2AFX, ETV5





1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nöroblastom (NB) nöral krestten köken alan, sempatik sinir sisteminden orijinli embriyonik sinir hücrelerinden oluşan çocukluk çağının sık görülen ekstrakranial solid malign tümördür (1,2,3). Multimodal tedavilerde gelişmelere karşın ileri evre hastalıkta sağkalım kötüdür (4). NB spontan regresyondan agresif multimodal tedaviye karşın progresyona dek klinik heterojenite göstermektedir. N-myc amplifikasyonu NB'da agresif ve proliferatif tümörlerde görülür ve yüksek risk kriteridir. (5). Birçok hedef geni düzenleyerek hücre proliferasyonunu uyan transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle üzerinde pek çok çalışma devam etmektedir. Günümüze kadar yapılan araştırmalar, NB risk sınıflandırılmasında sadece N-myc amplifikasyonunun değil, bazı kromozomlardaki değişimlerin de önemli rol oynadığını gösterilmiştir. NB risk sınıflandırılmasında rol oynayan gen değişimlerinin bazı örnekleri, N-myc amplifikasyonunun yanısıra 1p36 kaybı, 11q23 kaybı ve 17q25 dengesiz kazanımıdır (10-14). Bu gen değişiklikleri ile birlikte, DNA indeksi de risk sınıflandırması açısından önem arz etmektedir.

Son zamanlarda NB tedavi protokolünü etkileyebilecek farklı genlerin literatüre girmesi ile risk sınıflandırmalarının da alt gruplara ayrılıp ayrılamayacağı gündeme gelmiştir. Özellikle yüksek risk grubuna giren NB tümörlerinin davranışlarında heterojenite gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda, yüksek risk grubu NB hastalarının, ultra-yüksek risk ve yüksek risk grubu olmak üzere ikiye ayrılıp ayrılamayacağı araştırmacılar arasında gündeme gelmiştir.

Yapılan rutin nöroblastom moleküler analizleri sırasında kötü ilerleme gösteren hastaların kalan örnekleri ile yapılacak olan moleküler düzeydeki analizlerin, kontrol grubu (düşük risk ve orta risk sınıfı) hastalarının analizleri ile karşılaştırılması sonucu, NB yüksek risk grubu hastaların; ultra-yüksek risk ve yüksek risk olarak iki sınıfa ayrılmasında rol oynayabilecek belirteçlere bakılmıştır. Yapılan genetik analizler (7, 8, 9) ile yüksek risk grubu nöroblastom seyrindeki heterojenitede etkili olabilecek hedef genler ve moleküler mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Nöroblastom yüksek risk grubu hastalarında bulunabilecek olası ALK, ATRX, HIF1a HIF1b ve H2AX ifadenme farklılıkları ile NB hastalarının klinik bulguları

karşılaştırılarak, böyle bir sınıflandırma ayrımı yapmada rol oynayabilecek hedef bir gen olup olmadığı araştırılmıştır.

İmmünglobülin süper ailesi üyesi 4 (IGSF4/ TSLC1/ CADM1/ SynCAM) nöral doku spesifik bir immünglobülin benzeri hücre adhezyon molekülüdür. Kanserde ilk defa küçük hücreli dışı akciğer kanserinde tümör süpresör olarak karakterize edilmiş ancak tümör gelişimini nasıl baskıladığı henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır. IGSF4 geninin susturulması çeşitli kanserlerde allelik kayıplar ve promotor metilasyonu ile gerçekleştirilmiştir (25, 26). IGSF4, aktif durumdaki NK ve CD8+ T hücreleri üzerinde eksprese olan CRTAM reseptörünün ligandıdır ancak T hücre immünitesindeki rolü bilinmemektedir. IGSF4 'ün glioblastomda tümörün büyüme ve gelişmesi ile invaziv özelliğini baskılayan özelliği gösterilmiştir (27). Yetişkin T hücreli lösemi/ lenfomada (ATLL) yeni bir hücre yüzey belirteci olarak tanımlanan IGSF4 'ün serumda yüksek seviyelerinin kötü prognozla ilişkilendirildiği tespit edilmiştir (28). Ayrıca CADM1'in tümör hücrelerini CD8+ T hücre immün mekanizmalarına karşı duyarlı hale getirerek metastazı önlediği gösterilmiştir (29). Bu çalışmanın bir kolunda da nöroblastom olgularının imprint örneklerinde immünfloresan boyama ile IGSF4 ekspresyonlarını tespit ederek, klinik ve moleküler parametreler ile ilişkisi belirlenmiş ve prognostik açıdan değerlendirilmiştir.

Bu çalışma ile bulunan gen ifadenme farklılığının, nöroblastom progresyonu ve tedavi şeklinde Türk toplumu için önem taşımasının yanısıra, global bir önem de taşımaktadır. Yüksek risk grubunun alt gruba ayrılmasında rol oynayabilecek aday bir moleküler durumun belirlenmesi, hastaların tedavi protokolünü daha etkili kılacaktır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Nöroblastom, çocukluk çağının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Primordial nöral krest hücrelerinden köken alan bu kanser türü, tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. Bir yaş altındaki çocukların en sık görülen tümörü olan nöroblastom, çocukluk yaş grubunda santral sinir sistemi tümörlerinden sonra ikinci sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon

ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır.

Son zamanlarda hastalığın seyrinde etkili olduğu belirtilen farklı gen ve mekanizmalar doğrultusunda, bu mekanizmaların Türk toplumu için de geçerliliğinin araştırılması ve özellikle yüksek risk grubuna giren hastaların belirli gen ifadenmelerinin aydınlatılması, risk gruplarının belirlenmesi ve tedavi protokolünün seçimi konusunda yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle hastalığın prognozunu belirleme ve tedavi yönteminin kararlaştırılması açısından, hastalığın moleküler biyolojisinin daha iyi anlaşılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada nöroblastom moleküler biyolojisinin aydınlatılmasına yönelik genetik düzeyde araştırma yapılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda yüksek risk grubuna giren nöroblastom hastalarında, son zamanlarda tedavi protokolünü etkilediği belirlenen ve önemli olduğu düşünülen ALK, ATRX, ETV5, HIF1a, HIF1b ve H2AX genlerinin RNA seviyesinde ifadenme analizleri değerlendirilmiş, yüksek risk grubunun, ultra-yüksek risk ve yüksek risk olarak ayrılmasında rol oynayabilecek belirteç bir genin varlığı araştırılmıştır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

NB tedavi protokolünü etkileyebilecek farklı genlerin literatüre girmesi ile risk sınıflandırmalarının alt gruplara ayrılıp ayrılamayacağı son zamanlarda önem arz etmiştir. Özellikle yüksek risk grubuna giren NB tümörlerinin davranışlarında heterojenite gözlemlenmektedir. Bu nedenle, yüksek risk grubu NB hastalarının, ultra-yüksek risk ve yüksek risk grubu olmak üzere ikiye ayrılacağı düşünülmektedir. Yapılan son çalışmalarda, bazı genlerin ifadenme farklılıklarının yüksek risk grubunda tedavinin yanıtını değiştirebileceğini göstermiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak, yüksek risk tedavi yanıtında önemli olabileceği düşünülen ALK, ATRX, ETV5, HIF1a, HIF1b ve H2AX genlerinin ekspresyon profillerinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, Türkiye'nin çeşitli devlet, üniversite ve vakıf hastanelerinin Onkoloji merkezlerinden TPOG (Türk Pediatrik Onkoloji Derneği) aracılığı ile, nöroblastom tanısı almış olan hastalardan gönderilen nöroblastom tümör doku örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerde yapılan ön moleküler analiz ve

klinik bilgileri birleştirilmiş ve kötü prognoz gösteren yüksek risk grubu 29 hasta örneği ile düşük risk grubuna giren 25 hasta örneği seçilmiştir.

Çalışmanın hipotezi, yüksek risk grubu hastalarında, tedaviye yanıt vermeyen/ ilerleyici hastalık gösteren “ultra-yüksek risk” sınıfı hastalarında; ALK, ATRX, ETV5, HIF1a, HIF1b ve H2AX genlerinin ekspresyon profilinin, yüksek risk hastalarının ekspresyon profilinden farklı olacağıdır. Ayrıca yüksek risk grubu ve düşük risk grubu hastalarında bu genlerin farklı ekspresyon göstereceği düşünülmüştür.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Çok hücreli organizmalardaki hücreler, kendilerini regüle etmelerinin yanı sıra, hücreler arası sinyal iletimini kordine ederek tüm organizma seviyesindeki davranışı da regüle ederler. Mutasyon gibi çeşitli moleküler bozukluklar, bu kordinasyonun deregülasyonuna neden olabilmektedir. İnsan vücudunda bulunan milyarlarca hücre, hergün mutasyonlarla karşılaşmakta, fakat hücreye seçici bir avantaj sağlamadığı müddetçe, hücredeki “koruma-sistemleri” ile elimine edilmektedir (30). Kanser, tek bir hücreden köken alan, deregülasyonun tek hücreye büyüme avantajı sağladığı klonal bir olgudur (30). Kontrol edilemeyen hücre büyümesi, “tümör” adı verilen hücre kütlelerinin oluşması ile sonuçlanabilmektedir. Bazı tümörler kötü gelişim göstermezler. Vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar ve kolayca ortadan kaldırılabilmektedirler. Bu tür tümörler “benin tümörler” olarak adlandırılırlar. Buna karşın bazı tümörler kötü gelişim göstermektedirler. Diğer dokuları da ele geçirip, vücudun farklı bölgelerine sıçrayabilirler. Bu tür tümörler “malin tümörler” olarak adlandırılırlar. Bazı kanserler ise, örneğin kan kanserleri gibi, tümör oluşumu göstermezler.

Kanserin, 100’den fazla farklı tipi bulunmaktadır ve köken aldığı organ ve hücre tipine göre adlandırılırlar. Örneğin, karsinom, iç organları çevreleyen doku ya da deriden köken alan kanser tiplerine verilen ad iken, lenfoma ve myelom, bağışıklık sistemi hücrelerinden köken alan kanserlerdir.

Kanser, tek bir hastalıktan ziyade, kontrol edilemeyen hücre büyümesi sonucu oluşan hastalıklar grubu olarak tanımlanabilir. Kanseri insidans oranları değerlendirildiğinde, kanser dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye’deki ölüm nedenleri arasında da kanser yine ikinci sıradadır. Türkiye’de her yıl ortalama 148.000 kişi kanser tanısı almaktadır.

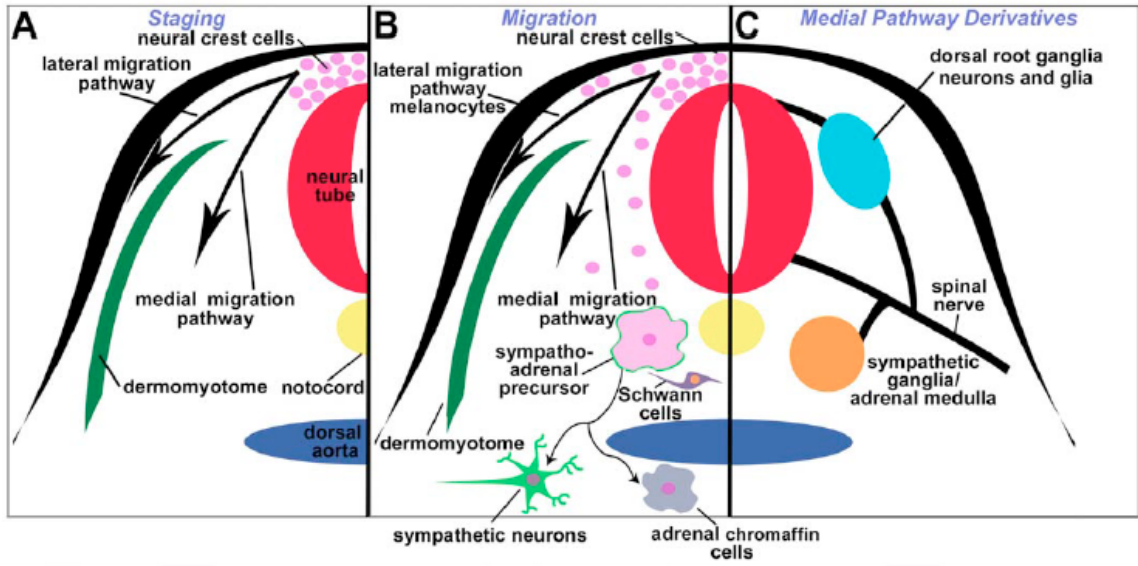
Nöroblastom, çocukluk çağıının en sık görülen ekstrakraniyel tümörüdür. Nöral krest hücre diferansiyasyonunun bozukluğu olarak da görülebilen nöroblastomun daha iyi anlaşılabilmesi için, normal nöral hücre diferensiyasyonunu anlamak önem arz etmektedir.

2.2. Nöral Krest Hücre Diferensiyasyonu

Nöral krest hücreleri, genişleyerek çok büyük sayıda farklılaşmış hücre tipi oluşturmak için göç ederler. Bu hücre tipleri; sensör, sempatik ve parasempatik sinir sistemi glial hücreleri ve nöronlarını; adrenal bezin epinefrin üreten hücrelerini; epidermin pigment içeren hücrelerini; ve baş bölgesinin birçok iskelet ve bağ doku elementlerini içermektedir (105). Nöral krest hücrelerinin hangi hücre tipine farklılaşacağı, hangi bölgeye göç ettiği ve yerleştiği ile ilgilidir.

Nöral krest hücreleri 4 ana fonksiyonel gruba ayrılabilir. **Kraniyel (Sefalik) nöral krest hücreleri**, kraniyofasiel mezenkimi oluşturmak için dorsolateral olarak göç eder ve kıkırdak, kemik, kraniyel nöronlar, glia ve yüz bağ dokusunu oluşturur. Bu hücreler, faringial kavislere ve keselere girerek, timik hücreleri ve orta kulak kemiklerini oluştururlar. **Trunk nöral krest hücreleri** 2 ana yolağı kullanarak göç ederler. Renk sentezleyen melanositleri oluşturacak olan hücreler, dorsolateral olarak ektoderme göç ederler ve karın bölgesinin ventral bölgesine kadar ilerlerler. İkinci göç yolağı, hücrelerin vebtrolateral olarak skleretomun anterier kısmına doğru göç ettiği yolaktır. Bu hücreler, sensör nöronları içeren dorsal kök gangliayı oluştururlar. Bu hücreler ventral olarak göç etmeye devam ederek, sempatik gangliayı, adrenal medulla'yı ve aortu çevreleyen sinir gruplarını oluştururlar. **Vagal ve sakral nöral krest hücreleri**, bağırsağın parasempatik ganglia'sını oluştururlar. Bu nöral krest hücrelerin göçünün gerçekleşmemesi, enterik ganglianın ve dolayısıyla bağırsak peristaltik hareketlerin yokluğu ile sonuçlanır. Kardiak nöral krest hücreleri, kraniyel ve trunk nöral krest arasında yer alır. Bu hücreler, melanositleri, nöronları, kıkırdak ve bağ dokuyu oluşturabilmektedir. Bu nöral krest bölgesi ek olarak kalpten çıkan geniş damarların muskulokonektif doku duvarını oluşturmaktadır (105).

Normal trunk nöral krest hücreleri nöral tüpün dorsal yönünden ayrılıp, nöral tüpe doğru ventral olarak göç eder ve lokal sinyaller doğrultusunda differensiyasyona başlar (Şekil 1) (102). Bazıları sempatik ganglia ya da adrenal medullanın sempatik nöron-benzeri kromafin hücre nöronlarına farklılaşırlar. Nöronlar komşu nöral-krestten köken alan hücrelerin Schwann hücrelerine ve satellit hücrelere farklılaşmasını tetikler.



Şekil 1. Trunk nöral Krest Hücrelerinin A) Oluşumu, B) Göç Yolakları C) Medial Yolak türevleri (102)

Normal nöral krest hücreleri, kendi kendilerini yenileyebilme ve birden çok hücre tipine dönüşebilme yetenekleri ile karakterizedir (102,103). Kök hücre özellikleri, farklılaşmış nöral krest derivativleri tarafından tekrar kazanılabilir (104). Hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme ve birden çok hücre tipine dönüşebilme yeteneği, birçok kanser tipinde bulunan kök-hücre-benzeri hücrelerde bulunan bir özelliktir. Tümör kök hücreleri, matür hücrelerin, genetik yada epigenetik sinyaller ile dediferensiye olması ile ya da gelişmekte olan hücrelerin genetik yada epigenetik birtakım bozuklukları biriktirmesi ile oluşabilmektedir.

Nöroblastom için hangi modelin geçerli olduğu henüz bilinmemektedir. Fakat, çocukluk çağı tümörü olması, embryonel nöral krest karakterinde protein ekspresyonu ve post-trasnlasyonel modifikasyonların korunması, ikinci modeli desteklemektedir. Nöroblastom tümörleri yada hücre hatları, nöron- ve Schwann hücre-benzeri hücrelerin yanı sıra, kök-hücre benzeri hücreler de barındırmaktadır (102).

2.3. Nöroblastom

2.3.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Nöroblastom, embriyonik nöral krestte yapılarından oluşan, sempatik ganglia ve adrenal medulla tümörüdür (102). Çoğu NB tümörleri, indifferansiye sempatik sinir hücreler olan nöroblastlardan oluşmaktadır. Primer tümörler, periferik sinir sisteminin lokalize olduğu bölgelerde bulunmaktadır. Nöroblastomların yaklaşık %50'si adrenal medulladan köken alırken, diğerleri torakal ya da abdominal paraspinal sempatik ganglia ya da pelvik gangliada oluşur. NB'de metastazlar genelde lenf nodu, kemik ve kemik iliğinde görülmektedir. NB yüksek oranda heterojenite gösteren bir tümördür.

Nöroblastom görülme sıklığı, 7000 canlı doğumda 1 olarak belirlenmiştir ve Türkiyede her yıl yaklaşık 110-120 yeni vaka nöroblastom tanısı almaktadır. Ortalama diaqnoz yaşı 18 aydır ve vakaların %40'ı 1 yaşından önce tanı alırken, 10 yaşına kadar hemen hemen hepsi tanı almaktadır (31).

2.3.2. Klinik Belirtileri

Nöroblastom semptomları, tümörün boyutuna, bulunduğu yere, vücudun diğer bölgelerine yayılma derecesine ya da tümörün hormon salgılayıp salgılamadığına göre, çok geniş farklılıklar gösterebilmektedir. Abdominal kitle, diarre, ateş, yüksek kan basıncı ve ağrı, hastalarda gözüken semptomlardan bazılarıdır. Öksürük, nörolojik bazı eksiklikler, idrar yapamama, görülen diğer klinik belirtiler arasında bulunabilmektedir. Buna karşın, hiç semptomu bulunmayan hastalar da mevcuttur.

2.3.3. Tümör Histolojisi

Çoğu nöroblastom, nöral diferensiyasyonu az olan ya da hiç olmayan, küçük, yuvarlak hücreleri içeren, indifferansiye tümörlerdir. Klasifikasyon tablosu, Shimada ve arkadaşlarının (1984) histopatolojik özellikler ile tümörün klinik davranışını ilişkilendirmeleri ile oluşturulmuştur (48). Nöroblastomun tedaviye iyi yanıt veren ya da vermeyen formunun sınıflandırılması için; nöroblast diferensiyasyonunun derecesi, Schwannian stroma içeriği, çekirdek patolojisi ve tanı yaşı kullanılmaktadır.

2.3.4. Sınıflandırılması

Uluslar arası Nöroblastoma Sınıflandırma Sistemi (INSS), yapılan klinik çalışmaların dünya çapında karşılaştırılabilmesi için, 1986 yılında oluşturulmuş, 1993 yılında güncellenmiştir (49,50). INSS, nöroblastom tanılı çocukların klinik, radyografik ve cerrahi değerlendirmelerini kullanmaktadır.

Tablo 1. Uluslar arası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS) (90)

Evre I	Tümör köken aldığı organa sınırlı, makroskopik tam rezeksiyon. Mikroskopik tümör artığı olabilir veya olmayabilir. İpsi ve kontrateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre IIa	Ünilateral tm, tam olmayan makroskopik rezeksiyon. İpsi ve kontrateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre IIb	Ünilateral tm, makroskopik tam veya tam olmayan rezeksiyon ipsilateral bölgesel lenf nodu tutulumu var, kontrateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre III	Orta hattı aşan tm±regional lenf nodu tutulumu Unilateral tm.+kontrateral lenf nodu tutulumu var Orta hat tm+bilateral lenf nodu tutulumu
Evre IV	Yaygın hastalık, uzak metastazlar (uzak lenf nodu, kemik iliği, kemik, karaciğer ve/veya diğer organlar).
Evre 4S	Evre 1 ve 2 gibi lokalize primer tm. Yaş<365 gün. Sadece karaciğer, cilt ve/veya kemik iliği yayılımı (tümör hücreleri <%10 olmalı) var.

Tedavi öncesi risk stratifikasyonlarına ortak bir yaklaşım geliştirmek amaçlı, Uluslar arası Nöroblastom Risk Grubu Evreleme sistemi (INRGSS) yayımlanmıştır (51). Bu sınıflama cerrahi rezeksiyondan ziyade tümör görüntülemelerine dayanmaktadır. (Tablo 2). Uluslararası Nöroblastom Risk Grubu (INRG) evreleme sisteminde NB tümörlerini sınıflandırmada; INRGSS, yaş, histoloji, tümör diferansiyasyonu, MYCN durumu, 11q delesyonu varlığı/yokluğu ve tümör hücre ploidi verileri kullanılmaktadır.

Tablo 2. INRG Tedavi öncesi Evreleme Şeması (55,96)

INRG stage	INRGSS Description	Age (months)	Histologic category	Grade of tumor differentiation	MYCN	11q-del	Ploidy	Pretreatment risk group
L1/L2			GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1	Localized tumor not involving vital structures as defined by the list of image-defined risk factors ¹ and confined to one body compartment		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low
					Amp			K High
L2	Locoregional tumor with presence of one or more image-defined risk factors	<18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
						Yes		G Intermediate
				Differentiating	NA	No		E Low
						Yes		
		≥18	GNB nodular; neuroblastoma	Poorly differentiated or undifferentiated	NA			H Intermediate
					Amp			N High
M	Distant metastatic disease (except stage MS)	<18			NA		Hyperdiploid	F Low
		<12			NA		Diploid	I Intermediate
		12 to <18			NA		Diploid	J Intermediate
		<18			Amp			O High
		≥18						P High
MS	Metastatic disease in children younger than 18 months with metastases confined to skin, liver, and/or bone marrow	<18			NA	No		C Very low
						Yes		Q High
					Amp			R High

GN, ganglioneuroma; GNB, ganglioneuroblastoma; Amp, amplified; NA, not amplified

2.3.5. Genetiği

2.3.5.1. Germ hücrelerindeki genetik değişiklikler

Nöroblastom vakalarının küçük bir kısmı otozomal dominant olarak aktarılmaktadır (32,33). Nöroblastomlarda, %1-2 oranında aile öyküsü görülmektedir (34). Ailesel öyküsü olan vakalar, sporadik vakalara göre daha erken yaşta teşhis almaktadır ve çoğunlukla birden fazla primer tümörleri vardır. Bu ailesel vakalarda, PHOX2B geninde mutasyonlar bulunmuştur (35-38). Son zamanlarda anaplastik lenfoma kinaz geni (ALK) de majör ailesel predispozisyon geni olarak belirlenmiştir (39,40). NB, nöral krestten köken alan ve anormal gelişim ile ilgili olan başka hastalıklarla (örneğin Hirschsprung hastalığı) birlikte de oluşabilir.

2.3.5.2. Somatik hücrelerdeki genetik değişiklikler

2.3.5.2.1. 1p Delesyonu

1p kromozom kolunun delesyonu ilk olarak 1977'de Brodeur ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (52). 1p delesyonu nöroblastom vakalarının %20-35'inde bulunmaktadır (53-57). Bu aberasyon aynı zamanda MYCN amplifikasyonu ile ilişkilidir ve agresif tümörlerin %70'inde bulunmaktadır. Delesyon bölgeleri genelde büyüktür ve 1p kolunun son kısmını içerirler. Birçok araştırma grubu, bu delesyon içerisindeki en küçük ortak bölgeyi bulmaya çalışmıştır. 1p36.31 bölgesindeki kromatin yeniden modelleme ailesi üyesi olan CHD5, nöroblastomda tümör süpresör olarak görev almaktadır (58). Bu gen genelde sinir sisteminde eksprese olmaktadır ve 1p delesyonu olan NB hücre hatlarında ve tümörlerinde düşük ekspresyona sahiptir. 1p36 bölgesindeki bir diğer gen olan KIF1B, nöroblastomda haploinsafisient tümör süpresör gen olarak fonksiyon gösterdiği belirtilmiştir (59,60).

2.3.5.2.2. Kromozom 2p kolu amplifikasyonu

Kromozom 2p24 bölgesinin amplifikasyonu, nöroblastom tümörlerinin %15-30'unu oluşturmaktadır (54,55,61). Amplifiye olan bölge genelde birden fazla gen içermektedir ve MYCN geni, amplifikasyon için hedef gen olarak düşünülmektedir. MYCN normalde embriyonik gelişimde eksprese olan bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. MYCN amplifikasyonu, ileri evre hastalık ile ilişkilidir (62).

Son zamanlarda, ALK geni de, DNA mutasyonları ve gen amplifikasyonları tarafından hedef olarak gösterilen majör predispozisyon ailesel geni olarak gösterilmektedir (39,40). ALK aberasyonları, sporadik nöroblastom vakalarında da bulunmuştur (39,40,63-65). ALK 2p23.2 bölgesinde lokalizedir ve çoğunlukla primer NB vakalarının %15-25'inde görülen 2p kazanç bölgesinde bulunmaktadır. ALK geninintirozin kinaz domain mutasyonları, sporadik NB vakalarının %6-12'sinde görülürken, ALK gen amplifikasyonu %3-5 oranında görülmektedir. ALK geni, onkogeneizde rol oynayan çeşitli kromozomal translokasyonlar ve inversiyonlarda rol almaktadır. ALK'yı içeren füzyon proteinlerinin, anaplastik büyük hücreli lenfomalarda, diffuz büyük B-hücreli lenfomalarda ve enflamatuar myofibroblastik tümörlerde rol oynadığı gösterilmiştir (66-69). Bir süredir kinaz inhibitörlerinin

spesifik kanser terapisi hedefi olmaları nedeni ile de (70), ALK, nöroblastom terapi stratejileri için ilgi çekici bir hedef olmuştur.

2.3.5.2.3. 11q Kaybı

11. kromozomun uzun kolunda ki kromozomal materyalin kaybı, NB2lerin %20-35'inde bulunmaktadır (54,55,71,72). 11q delesyonu, çoğunlukla MYCN amplifikasyonu bulunmayan ileri evre tümörlerde görülmektedir (54,71). Bu bölgede bulunan ve nöral hücrelerin sinaptik oluşumunda rol oynayan hücre adezyon molekülü CADM1, hedef tümör süpresör geni olarak düşünülmektedir (73).

2.3.5.2.4. 17q Kazancı

17. kromozomun uzun kolunun kazancı, nöroblastomların %50'sinde görülmekte ve en sık genetik değişim olarak gösterilmektedir (54,55,74-76). 17q'daki kırılma noktası değişkenlik göstermektedir fakat 17q kolunun son kısmını her zaman içermektedir. Bu bölgede bulunan bir ya da birden fazla genin dosaj etkisinin, seçici avantaj sağladığı hipotez edilmektedir (77). Önerilen aday genler arasında BIRC5, NME1 ve PPM1D genleri bulunmaktadır (78-80). 17q'daki dengesiz kazanç, genelde kromozom 1 ve 17 arasında dengesiz translokasyon ile oluşmakta ve 1p delesyonu ile 17q kazancı ile sonuçlanmaktadır (81).

2.3.5.2.5. Nöroblastomda hedef olabilecek diğer kromozomal bölgeler

14. kromozomun q kolundaki delesyon, özellikle ileri evre vakalarda görülmekle beraber, NB vakalarının yaklaşık %20'sinde görülmektedir. Delesyonda koruna bölge 14q23-32 olarak gösterilmektedir (72,82,83). Kromozom 3p'deki heterozigosite kaybı da yaklaşık olarak NB vakalarının %15'inde gösterilmiştir (84,85). Kromozom 3p22 bölgesindeki tümör süpresör gen varlığı ve bu bölgenin NB hücre hatlarında homozigotik olarak kayıp olması, bu bölgenin hedef bölge olabileceği düşündürmektedir (86).

2.3.5.2.6. *ALK1, ETV5, HIF1a, HIF1b,H2AX ve ATRX Genlerinin Nöroblastomdaki rolleri*

Son zamanlarda risk sınıflandırılmalarında, tedaviye yanıt farklılıklardan dolayı, özellikle yüksek risk grubunu, ultra-yüksek risk ve yüksek risk olarak 2 farklı alt risk grubuna ayırabilecek belirteçler aranmaktadır. Yapılan son çalışmalarda, bazı genlerin ifadenme farklılıklarının yüksek risk grubunda tedavinin yanıtını farklılaştırdığını ileri sürülmüştür (91,92). Örneğin Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) F1174L mutasyonunun, MYCN amplifikasyonuna sebebiyet verdiği gösterilmiştir (92). DNA hasarı tamirinde rol oynayan genlerden H2AX'in proliferen olan hücre hatlarında foci oluşturduğu gözlemlenmiştir (93). ALK sinyal yolağının alt hedef molekülleri arasında bulunan ve hücre proliferasyonunda rol oynayan ETV5 geninde nöroblastom kötü seyrinde rol oynadığı üzerinde durulmaktadır (94). ATRX geninin yüksek risk grubu nöroblastom vakalarının genetik temelinde rol oynadığı da yine son çıkan çalışmalar arasındadır (95).

2.3.6. *Nöroblastomda Genom-düzeyinde yapılan çalışmalar*

Genom-düzeyi ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), kromozom 6p22 bölgesinin NB gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bölgede bulunan SNP yada varyantların, agresif NB ile ilişkili olabileceği bulunmuştur (87). Nöroblastom gelişiminde rol oynayabileceği düşünülen ikinci bir lokus, BARD1 genini barındıran 2p35 bölgesidir. (88). BARD1 gen ürünü, BRCA1 tümör süpresör aktivitesi için gereklidir. Nöroblastom gelişiminde rol oyanayabilecek üçüncü bir aday bölge ise MBPF23 genini içeren 1p21.1 bölgesidir (89).

2.3.7. *Prognostik Faktörler*

Hastalığın tedavi olma olasılığı, teşhis yaşına, hastalığın yaygınlığına ve tümör biyolojisine göre farklılık göstermektedir. 1 yaşından küçük hastalar genelde daha iyi prognoz göstermektedir (41).

Tedaviye iyi yanıt veren hastalardaki NB tümörleri, daha çok triploide-yakın karyotipte ve birkaç yeniden segmental düzenlemelerin olduğu tümörlerdir. Agresif tümörler ise, yeniden kromozomal düzenlemelerin bulunduğu, diploide-yakın karyotiptedirler.

2.3.7.1. Nötrofin reseptörleri

TrkA, B ve C gibi tirozin kinaz reseptörleri, normal nöral gelişimde esansiyel rol oynamaktadır. Nöroblastomda, yüksek TrkA ekspresyonu, muhtemelen apoptoz ve differensiyasyonu regüle ettiği için, tedaviye iyi yanıt belirteci olarak kullanılmaktadır (42-44). TrkC de, MYCN amplifikasyonu olmayan düşük evreli nöroblastom vakalarında eksprese olmaktadır (45,46). Buna karşın, TrkB ekspresyonu, MYCN amplifikasyonu ve ileri hastalık ile ilişkilidir (47). Düşük evreli tümörlerde TrkB ekspresyonu yoktur ya da kesilmiş formu ekspresedir.



3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma, ilaç dışı girişimsel olmayan bir klinik araştırmadır. Araştırma, kontrollü ve tek kör bir çalışma olarak tasarlanmış ve gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma 04.02.2013 tarihinde literatür taraması ile başlamış, 21.06.2016 tarihinde tez savunması ile sonlandırılmıştır. Araştırma, çalışma için gerekli biyogüvenlik düzeylerine uygun donanımına sahip Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışmanın evreni olarak, Türkiye'nin çeşitli devlet, üniversite ve vakıf hastanelerinin Onkoloji merkezlerinden nöroblastom tanısı almış 18 yaş altı hastalar seçilmiştir. Bu dokular içerisinde seçilen, düşük risk grubuna giren 25 hasta ve yüksek risk grubuna giren 29 hasta çalışmanın örneklemi oluşturmuştur. Çalışmanın bir kısım analizleri için, yüksek risk içerisinde, indüksiyon tedavisine yanıt vermeyen 5 hasta 'ultra-yüksek risk' grubu olarak belirlenmiş ve belirli analizler bu grupta ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Bu araştırmada, Türkiye'nin çeşitli devlet, üniversite ve vakıf hastanelerinin Onkoloji merkezlerinden 01.12.2012 - 25.11.2015 tarihleri arasında nöroblastom öntanısı ve kesin tanısı almış olan hastalarından gönderilen taze nöroblastom tümör doku örnekleri kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışma kapsamında bakılan ALK, ETV5, HIF1a, HIF2a, ATRX ve H2AFX genlerinin ekspresyonları araştırmanın bağımsız değişkenlerini oluştururken, 'yüksek-risk' ve 'ultra-yüksek risk' sınıflandırmaları araştırmanın bağımlı değişkenlerini oluşturmaktadır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.6.1.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar Air Flow (Nüve)
Inver Mikroskop (Olympus)
Işık Mikroskobu (Nikon)
Soğutmalı Santrifüj (Heraus)
4°C Buzdolabı (Arçelik 450 lux)
(-20°C) Dondurucu (Ufuk)
(-80°C) Dondurucu (Thermo Science)
Akım Sitometri Cihazı (BD Accuri C6)
Nano-Real-time PCR Cihazı (Roche)
Motorlu Pipet (Isolab)
Motorlu Pipet (DiaMed)
Vorteks (IKA)

3.6.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Steril Pipetler (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Greiner)
Pipet Uçları (mavi ve sarı)
15 ml vida kapaklı Konik Tüp (Falkon)
50 ml vida kapaklı Konik Tüp (Falkon)
Polistren Akım Sitometri Tüpü (5 ml)
Steril Pastör Pipeti (Greiner)
Lam /Lamel (Biolab)

3.6.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPML-1640 Hücre Besiyeri Ortamı (Biochrom F1215)
Fetal dana serumu (Biochrom S0113)
L–Glutamin (Biochrom K0282)
Penisilin / Streptomisin (Biochrom A213)
DiMetil Sülfoksit (Aplchem A3670)
SynCam-FITC konjüge İHC Kiti (Novus)

Nmyc, 1p36, 11q23, 17q25 PCR Deteksiyon Seti

Steril PBS (Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen) (Sigma)

DNA İzolasyon Kiti (Roche)

TriPure RNA İzolasyon solüsyonu (Roche)

cDNA sentez kiti (Roche)

PCR ALK Ekspresyon Seti

PCR ETV5 Ekspresyon Seti

PCR ATRX Ekspresyon Seti

PCR HIF1A Ekspresyon Seti

PCR HIF1B Ekspresyon Seti

PCR H2AX Ekspresyon Seti

Etanol (Sigma)

İzopropanol (Sigma)

Deionize edilmiş H_2O

Kloroform

Lizin

3.6.2. Doku örneklerinin Toplanması ve saklanması

Bu çalışmada Türkiye'deki 23 farklı üniversite ve vakıf hastanesinin Pediatrik onkoloji merkezlerinden NB öntanısı ile gönderilmiş ve NB tanısı almış olan, TPOG tarafından klinik verileri kayıt altında olan hastalarından gönderilen tümör doku örnekleri kullanılmıştır. Örnekler, bu merkezlere önceden gönderilmiş olan, manuel pipet yardımı ile hazırlanıp porsiyonlanmış doku transfer solüsyonu (RPMI+%1 L-Glutamin + %1 penisilin-streptomisin) içinde, hasta onam ve gönüllü bilgilendirme formları ile birlikte, soğuk zincir kargo ile laboratuvarımıza gelmiştir. Çalışma sırasında, toplanmış olan 54 olgu örneğinin, lizinli mikroskop lamalarına doku imprinti yapıp, tümör hücresi yeterliliği Giemsa boyama ile değerlendirilmiştir. Tümör hücresi açısından yeterli görülen örneklerden DNA ve RNA izolasyonu için 1,5ml'lik eppendorf tüpleri içine bistüri ile kesilerek bir miktar doku alınmış, kalan doku örnekleri yine 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisinde, -80°C 'de saklanmıştır. Dokunun içinde geldiği transfer ortamında bulunan tümör hücreleri ise dondurma ortamında saklanmıştır (RPMI+ %1 penisilin-streptomisin+ DMSO).

3.6.3. DNA indeksi analizi

Dokunun içerisinde geldiği transfer solüsyonu 2000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifujlenerek, doku ortam hücreleri elde edilmiştir. Elde edilen doku ortam hücreleri, dondurma ortamı (95% RPMI complete (%88 RPMI+%10 FBS+ %1 L-Glutamine+%1 penisilin- streptomisin) +%5 DMSO) içerisinde süspansiyon edilerek, DNA indeks değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Bu hücreler DNA indeks analizi yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. DNA indeksi akım sitometri ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde hücre membranı lipidleri non-iyonik deterjanlar ile çözülerek, hücre sitoskeleti ve nükleer proteinleri tripsin ile yok edilip, hücre RNA enzimatik olarak degrade edilmiş ve nükleer kromatin yapısı spermine ile stabilize edilmiştir. Propidyum iyodid sitokiyometrik olarak temiz ve izole edilmiş nükleusa bağlandıktan sonra, örnek akım sitometri ekipmanına verilmiştir. Propidyum iyodid ile boyanmış olan nükleus ilk olarak floresan ışığı 580 ve 650 nm dalga boyları arasında yayacaktır. İkili 585/42 filtreli ekipman donanımına sahip FACScan floresan 2 (FL2) detektörü boyanan hücreler tarafından 564 ve 606 nm arasında yayılan ışığı analiz etmiştir. Sonuç olarak elde edilen floresan histogramlarında DNA aneuploidi varlığı tespit edilmiştir. Aynı doku üzerinden elde edilen normal hücreler ya da periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) referans olarak kullanılarak DNA aberasyonu derecelendirilmiştir. DNA indeksi, anormal G0/ G1 popülasyonundaki relatif DNA içeriğinin modunun normal G0/ G1 popülasyonundaki relatif DNA içeriğine bölünmesi ile elde edilmiştir.

3.6.4. DNA izolasyonu ve Moleküler inceleme

Dokulardan DNA izolasyonu, kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları, spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve bu örnekler eş-zamanlı (Real-time) PCR reaksiyonu ile N-MYC amplifikasyonu, 1p36 LOH, 11q23 delesyonu ve 17q25 kazancı açısından değerlendirilmiştir. Bu bölgelerdeki kazanım ya da kayıpların tespiti için bu bölgelere özgü tasarlanmış işaretli prob içeren primer ve enzim karışımları kullanılmıştır. NMYC eş zamanlı PCR'ı için, 2p24.3 bölgesinde bulunan NMYC genine özgü dizayn edilmiş 5'-GTGCTCTCCAATTCTCGCCT-3' ve 5'-GATGGCCTAGAGGAGGGCT-3' primer çifti ile '5'-FAM-CACTAAAGTTCCTTCCACCCTCTCCT-TAMRA-3' Taqman probunu

içeren enzim karışımı kullanılmıştır. NMYC amplifikasyon değerlendirmesi için yine aynı kromozomda 2p13.3 bölgesinde bulunan NAGK (N-acetylglucosamine kinase) geni referans alınmıştır. NAGK geni için 5'-TGGGCAGACACATCGTAGCA-3' ve 5'-CACCTTCACTCCCACCTCAAC-3' primer çifti ile '5'-VIC-TGTTGCCCCGAGATTGACCCGGT-TAMRA-3' ' Taqman probunu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. Eş zamanlı PCR çalışmalarındaki 1p36 LOH analizi için, 1p36.33 bölgesinde bulunan GNB1 (Guanine nucleotide binding protein (G protein)) geni için dizayn edilmiş olan 5'-AGCCAGTGGCAAATGCATT-3' ve 5'-TCTCTGCAGCCCTACCATTGA-3' primer çifti ve '5'-FAM-AGCAAATCAAGACATCATGTAAACGCTCA-BBQ(tamra)' TaqMan probunu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. Bu bölgedeki kayıp, yine aynı kromozom üzerinde, 1p13.1 bölgesinde bulunan NGFB (nerve growth factor (beta polypeptide)) geni referans alınarak değerlendirilmiştir. NGFB geni için 5'-TTCTATCCTGGCCACACTGAG-3' ve 5'- TTCTGACTTGCCCTCTCAGGT-3' primer çifti ile 5'-FAM(VIC)- TTG CCA AGG TCC TCC CTC TGC AGC T-BBQ(tamra) Taqman probunu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. 11q23 delesyon analizi için, 11q23.3 bölgesinde bulunan ARCN1 (Archain 1) genine özgü dizayn edilmiş olan 5'- ATCTGGAGGCAGCACAGCT -3' ve 5'-TACACTGGATTATACCTGGCTGG-3' primer çifti ile '5'-FAM-CCATGATCACAGAGACCATCATTGAAA-BBQ(tamra)' Taqman probunu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. Bu bölgedeki delesyon yine aynı kromozom üzerinde 11p11.2 bölgesinde bulunan MYBPC3 (myosin binding protein C, cardiac) geni referans alınarak değerlendirilmiştir. MYBPC3 geni için 5'-TGGTGTACGAGATGCGCGTC-3' ve 5'-TCACCGATAGGCATGAAGGG-3' primer çifti ile '5'-FAM(VIC)- TCAACGCCATCGGCATGTCCAGG-BBQ(tamra)' Taqman probunu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. 17q kazanç analizi için, 17q25 bölgesinde bulunan Survivin genine özgü dizayn edilmiş 5'-GGGCTGCCACGTCCAC-3' ve 5'-GTCGTCATCTGGCTCCCA-3' primer çifti ile '5'-FAM-TTCATCCACTGCCCCACTGAGAACGA-TAMRA-3' ' Taqman probunu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. Bu bölgedeki kazanç, aynı kromozom üzerinde 17p13.1 bölgesinde bulunan TP53 geni referans alınarak değerlendirilmiştir. TP53 geni için 5'-TGTCCTTCCTGGAGCGATCT-3' ve 5'-

CAAACCCCTGGTTTAGCACTTC -3' primerleri ile '5'-(FAM)Yakima yellow-CAGCCCCCGGCTCCGCTAGA-TAMRA-3' ' Taqman probu içeren enzim karışımı kullanılmıştır. Her bir ilgili bölgedeki kayıp ya da kazanç, o bölge için referans alınan genin kopya sayısı ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tüm PCR reaksiyonları, 8'li PCR tüpleri içerisinde hazırlanıp, nano realtime PCR cihazı (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için relatif kantitasyon yapılmıştır. Relatif kantitasyon delta, delta cycle threshold (CT) analiz yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Kalibratör olarak sağlıklı referans DNA kullanılmıştır. Bu sonuçlar diğer bir kantitasyon yöntemi olan absolute kantitasyon yönteminde yine referans DNA standartları kullanılarak teyit edilmiştir. Buna göre N-myc amplifikasyonu değerlendirilirken ratio değeri 10'dan büyük ise n-myc amplifikasyonu "pozitif" olarak ifade edilmiştir. 1pLOH ve 11q delesyonu değerlendirilirken ratio değerleri 0.5'in altında olanlar için 1pLOH ve 11q delesyonu "pozitif" olarak ifade edilmiştir. 17q kazanımı değerlendirilirken ratio değeri 1.1' den büyük ise 17q kazanımı "pozitif" olarak ifade edilmiştir.

3.6.5. Ekspresyon Analizleri

3.6.5.1. RNA Ekstraksiyonu

Dokulardan RNA izolasyonu TriPure izolasyon solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yöntem:

- 1) 1ml TriPure solüsyonu RNA izolasyonu için ayrılan dokuların üzerine eklenmiştir.
- 2) Dokular bu solüsyon içerisinde homojenitör ile homojenize edilmiştir.
- 3) Homojenatlar 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 4) Örneklerin üzerine 200 µl Kloroform eklenmiştir.
- 5) 15 saniye boyunca örnekler el ile ters yüz edilerek karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 6) 12000g'de 15 dk 4°C'de sentrifuj yapılmıştır.
- 7) Sentrifuj sonrası oluşan 3 fazdan en üst şeffaf faz yeni bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.
- 8) 500µl izopropanol eklenmiş ve el ile ters yüz edilerek karıştırılmıştır.
- 9) 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- 10) 12000g'de 10 dakika 4°C'de sentrifuj yapılmıştır.
- 11) Supernatant uzaklaştırılmıştır.
- 12) 1ml %75'lik etanol pelletin üzerine eklenmiştir.
- 13) 7500g'de 5 dakika 4°C'de sentrifuj yapılmıştır.
- 14) Etanol pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır.
- 15) RNA pelleti nükleaz-barındırmayan suda süspansiyon edilmiş (30-50µl) ve analize kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.6.5.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için kit kullanılmıştır.

Yöntem:

- 1) 1µg RNA örneği olacak şekilde RNA örneği PCR tüplerine alınmıştır.
- 2) Üzerine 1 µl oligo(dT)₁₈ primer solüsyonu ve karışımı 13 µl'ye tamamlayacak miktarda ultra saf su eklenmiştir.
- 3) 65°C'de 10 dakika inkübasyon yapılmıştır.
- 4) Inkübasyon sonra karışımın üzerine 4µl 5X Reaksiyon solüsyonu, 0,5µl RNaz inhibitörü, 2µl 10mM'lık nükleotid karışımı ve 0,5µl 20U/ml'lik ters transkriptaz enzimi eklenmiştir.
- 5) Karışım 30 dakika 55°C'de ve 5 dakika 85°C'de inkübe edilmiş ve sentezlenmiş olan cDNA'lar analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.6.5.3. Eş-zamanlı PCR Analizleri:

ALK, ATRX, ETV5, HIF1A, HIF2A ve H2AFX genlerinin ekspresyon durumlarının değerlendirilmesi için gerçekleştirilen eş zamanlı PCR analizleri, LightCycler 480 (Roche) Real-time cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak actin-beta geni kullanılmıştır. ALK geni için, 5'-TGGGGCAGAGCGTTCTAA-3' ve 5'-CAGCTGAGGTGTTGAGAAGGA-3' primer çifti; ATRX geni için, 5'-TCATCAGAAGAATCTGAAGAAACAAG-3' ve 5'-TTTTATCTGTGTTTTGATTCATTGC-3' primer çifti ; ETV5 geni için, 5'-TGCCTGAAAACCAGTATCCAT-3' ve 5'-GGGCGATTATCTCCAGGAAC-3' primer çifti ; HIF1A geni için, 5'-GAACCTGATGCTTTAACTTTGCT-3' ve 5'-TCTGTGTCGTTGCTGCCAA-3' primer çifti; HIF2A (EPAS) geni için 5'-CATCTACAACCCTCGCAACC-3' ve 5'-CAATCTCACTCAGGACGTAGTTGA-3'

primer çifti ve H2AFX geni için, 5'-CGGCAGTGCTGGAGTACC-3' ve 5'-GGATGATTGCGTCTTCTTG-3' primer çifti kullanılmıştır. Tüm örnekler duplike çalışılmıştır. Bulgular için ortalamaları alınmıştır.

Tablo 3. PCR Reaksiyon Aşamaları.

Program Name denaturasyon							
Cycles 1		Analysis Mode None					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name cycling							
Cycles 5		Analysis Mode None					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
65	None	00:00:30	2.20		60	1	1
72	None	00:00:01	4.40		0	0	0
Program Name qpcr							
Cycles 45		Analysis Mode Quantification					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
60	None	00:00:30	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0
Program Name cooling							
Cycles 1		Analysis Mode None					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın ön literatür taraması

Şubat 2013 – Temmuz 2013 tarihleri arasında yapılmıştır.



Araştırmanın etik kurul onayının alınması

Eylül 2013 tarihinde gerçekleştirilmiştir.



Rutin analizler için tarafımıza gönderilen doku örneklerinin toplanması ve

Toplanan örneklerin DNA izolasyonları

Eylül 2013- Kasım 2015 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.



DNA kullanılarak rutin olarak yapılan moleküler incelemeler (Nmyc amplifikasyonu, 1p36 delesyonu, 11q23 delesyonu, 17q25 kazanımı ve DNA ploidi çalışmaları)

Eylül 2013-Kasım 2015 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.



Hasta evreninden, araştırma örnekleminin seçimi

Mart 2015 tarihinde gerçekleştirilmiştir.



Seçilen örneklerin dokularından RNA izolasyonu

Mart 2015 ve Kasım 2015 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.



Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi

Mart, 2015 ve Kasım, 2015 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.



ALK1, ETV5, HIF1a, HIF2a, H2AFX, ATRX genlerinin ekspresyon analizleri

Mart, 2015 ve Ocak, 2016 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.



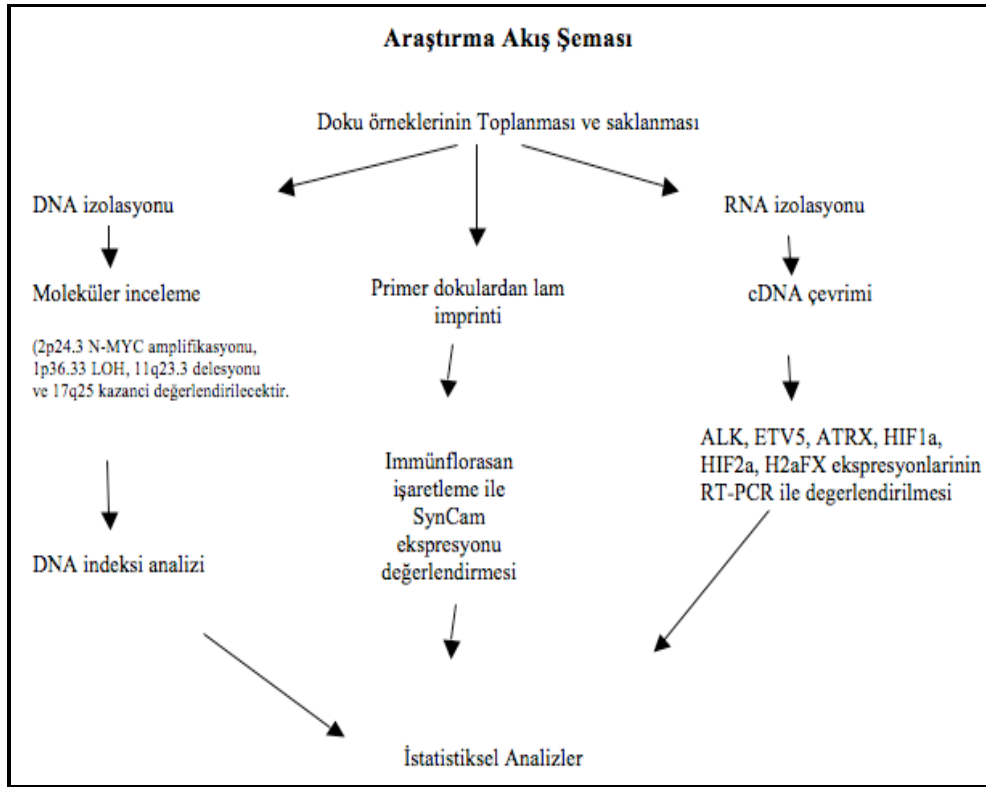
Verilerin düzenlenmesi ve istatistiksel analizlerin yapılması

Ocak, 2016- Şubat,2016 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.



Tez savunması **Haziran, 2016** tarihinde gerçekleştirilmiştir.

Araştırmanın akış şeması, Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2: Projenin genel akış şeması.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Gruplar arası gen ekspresyon analizleri, SPSS.15 programında, “Mann-Whitney-U” nonparametrik testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SynCam ekspresyon analizleri için, parametrik “Independent Sample T-Test” kullanılmıştır. Tüm analizlerde, P değerinin 0,05 den düşük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu araştırmanın sınırlılıkları arasında öncelikle hasta sayısı gelmektedir. Klinik veri girişinin düzenli olmaması sebebi ile tüm hastaların hasta risk sınıfları tarafımızca belirlenememiştir. Risk sınıfı belirlenebilmiş hastalar arasından çalışma örneklemini seçilebilmiş ve grupların hasta sayısı 30’un altında kalmıştır. Bu nedenle bazı analizler için non-parametrik testler uygulanmıştır. Hasta sayısının her iki grup için de 30’u aşması, araştırma verilerinin güvenilirliğini kuvvetlendirecektir. Ayrıca

'ultra-yüksek risk' olarak tanımlanan grup içerisinde sadece 5 hasta bulunmuştur. En az 7 kişinin olması verilerin istatistiksel anlamlılığını arttıracaktır.

Araştırmanın bir diğer sınırlılığı genlerin sadece RNA düzeyinde bakılabilmiş olmasıdır. Bulunan verilerin protein düzeyi konfirmasyonu, analizleri daha anlamlı kılacaktır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi etik kurulunun, 26.09.2013 tarihinde verdiği etik kurul onayı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

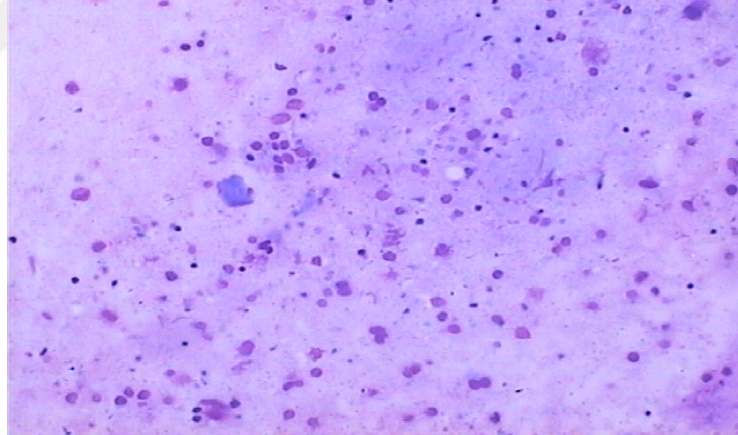


4. BULGULAR

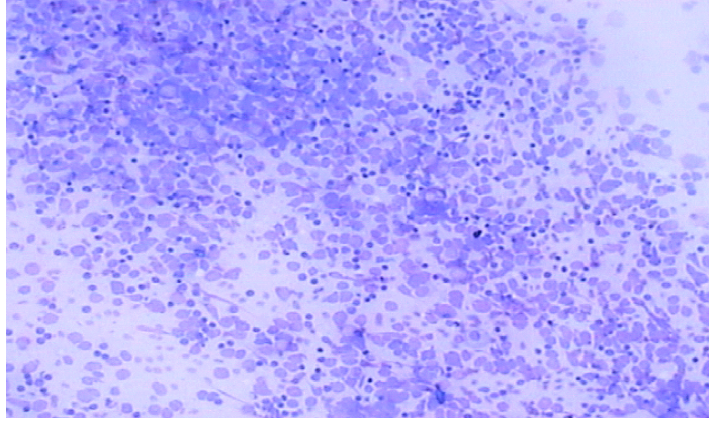
4.1. Hastaların Risk Sınıflarının Belirlenmesi

TPOG (Türk Pediatrik Onkoloji Grubu) 2009-protokolü kapsamında gerçekleştirilen nöroblastom klinik ve moleküler analizlerin sonuçları değerlendirilerek, sırasıyla 25 ve 29 tane düşük ve yüksek risk grubu hastası seçilmiş ve analiz edilmiştir.

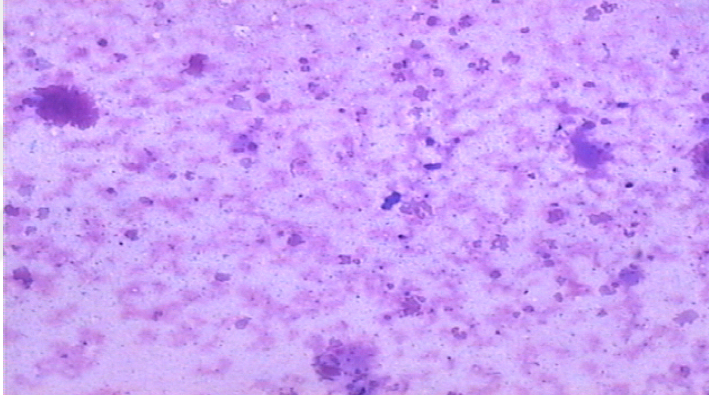
Gelen doku örneklerinden moleküler çalışma yapılmadan önce, doku örneklerinin lizinli lamlara imprintleri yapılmıştır. Bu lamlar Toludin mavi boyası ile boyanmış ve tümör hücresi yeterliliği açısından değerlendirilmiştir. Tümör hücresi yeterli olan (Şekil 2), yeterli olmayan (Şekil 3), otolitik hücreye sahip olan (Şekil 4) ve ganglionöroblastom hücre özelliği taşıyan (Şekil 5) örnekler değerlendirilip, moleküler analiz için yeterli görülen örnekler analize alınmıştır. Örneklerin tümör olup olmadıkları uygun markırlarla konfirme edilmiştir.



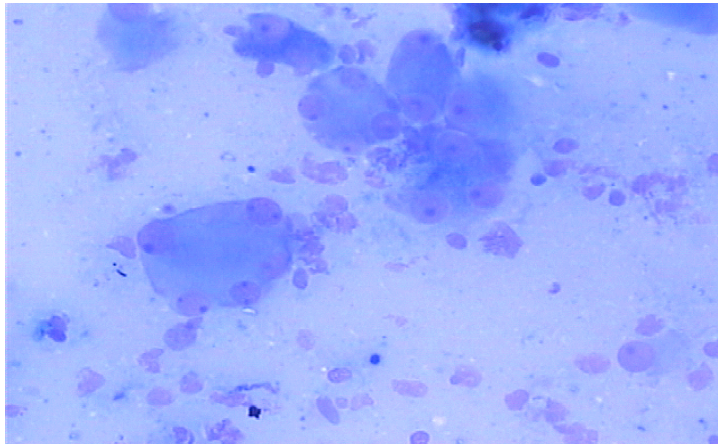
Şekil 3: Nöroblastom kısıtlı yeterli örnek imprintinin Toludin mavi boyası ile boyanmış görüntüsü.



Şekil 4: Nöroblastom yeterli örnek imprintinin Toludin mavi boyası ile boyanmış görüntüsü.



Şekil 5: Otolitik örnek imprintinin Toludin mavi boyası ile boyanmış görüntüsü.



Şekil 6: Blastik hücreler arasında iri ganglion benzeri, bazıları multinükleer hücreler içeren dokundurma preparatı.

Moleküler analiz sonuçlarında, MYCN amplifikasyonu, 1p36 kaybı, 11q23 kaybı ve 17q25 kazancı ile birlikte DNA ploidi değerlendirilirken, klinik verilerde hastanın yaşı, hastalığın evresi ve tümörün patolojisi değerlendirilmiştir. Seçilen düşük risk ve yüksek risk hastalarının risk grubu sınıflaması için kullanılan moleküler ve klinik verileri sırasıyla, Tablo 4 ve Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 4. Düşük risk grubu hastaların, risk sınıflamasında kullanılan moleküler ve klinik verileri

DÜŞÜK RİSK GRUBU										
NB Kod	Cinsiyet	yaş (ay)	Primer	Nmyc amp.	1p LOH	11q Del	17q Kazanç	DNA ploidi	Evre	Patoloji
37	Erkek	3	Sürrenal	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	<1	I	iyi
41	Kız	7	paraspinal abdominal	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	<1	I	iyi histoloji
63	Kız	1	Abdominal Sürrenal tek taraflı	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	1	IVS	kötü histoloji
144	Erkek	14	Paraspinal abdominal	Negatif	pozitif	Pozitif	Negatif	.	I	iyi
145	Kız	168	Servikal	Negatif	pozitif	Pozitif	Negatif	<1	IIB	Kötü
154	Erkek	60	Abdominal Sürrenal tek taraflı	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	.	I	kötü histoloji
182	Kız	3	Servikal	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	<1	IIA	kötü
183	Erkek	42	Torakal	Negatif	negatif	Pozitif	Pozitif	1	I	iyi histoloji
184	Kız	18	Torakal	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	.	I	kötü
194	Erkek	6	Abdominal Sürrenal tek taraflı	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	.	I	kötü histoloji
198	Kız	16	Torakal	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	.	I	kötü
224	Kız	13	Sürrenal	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	>1	I	iyi
239	Erkek	24	Paraspinal (Abdominal)	Negatif	pozitif	Pozitif	Negatif	1	I	iyi
315	Kız	5	Abdominal sürrenal tek taraflı	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	>1	IIB	iyi
324	Kız	6	Servikal (Kum saati:2)	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	1	IIA	iyi

363	Erkek	3	Abdominal Paraspinal	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	1	I	iyi
365	Erkek	4	.	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	1	I	iyi
367	Erkek	15	Abdominal sürrenal tek tarafı (Kum saati:2)	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	1	IIB	iyi
390	Erkek	25	Abdominal sürrenal tek tarafı (Kum saati:2)	Negatif	negatif	Pozitif	Pozitif	.	I	kötü
409	Erkek	2	Abdominal sürrenal tek tarafı	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	1	I	kötü
411	Erkek	22	Abdominal sürrenal tek tarafı	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	.	IIB	Kötü
413	Kız	11	Abdominal sürrenal tek tarafı (Kum saati:2)	Negatif	pozitif	Negatif	Pozitif	1	IIB	Kötü
415	Kız	37	Abdominal sürrenal tek tarafı	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	1	I	iyi
465	Erkek	0	Primeri bilinmeyen	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	1	IIB	Kötü
474	Erkek	5	Abdominal sürrenal tek tarafı	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	<1	I	iyi

Tablo 5. Yüksek risk grubu hastaların, risk sınıflamasında kullanılan moleküler ve klinik verileri

YÜKSEK RISK GRUBU										
NB Kod	Cinsiyet	yaş (ay)	Primer	Nmyc amp.	1p LOH	11q Del	17q Kazanç	DN A plo idi	Ev re	Patoloji
7	Kız	96	Sürrenal	Pozitif	pozitif	Negatif	Pozitif	.	IV	Kötü
25	Kız	50	Pelvik	Negatif	pozitif	Negatif	Pozitif	.	III	Kötü
26	Kız	66	Sürrenal	Negatif	pozitif	Pozitif	Pozitif	>1	IV	Kötü
27	Erkek	144	Paraspinal	Negatif	negatif	Pozitif	Negatif	.	III	iyi

			abdominal							
29	Erkek	18	Sürrenal	Pozitif	pozitif	Negatif	Pozitif	1	III	Kötü
39	Kız	9	pelvik	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	<1	IV	kötü histoloji
44	Kız	84	Sürrenal	Negatif	pozitif	Negatif	Pozitif	<1	IV	kötü
78	Kız	84	Bilinmeyen	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	<1	IV	kötü
82	Erkek	36	Abdominal sürrenal	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	<1	IV	kötü histoloji
102	Kız	30	Torako-Abdominal	Negatif	negatif	Negatif	Negatif	.	IV	iyi histoloji
110	Kız	21	Sürrenal	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	>1	IV	iyi
132	Erkek	19	Sürrenal	Negatif	pozitif	Negatif	Pozitif	.	IV	kötü
146	Erkek	36	Sürrenal	Negatif	.	Negatif	Pozitif	>1	IV	Kötü
176	Kız	30	Sürrenal	Negatif	pozitif	Pozitif	Pozitif	1	IV	kötü
202	Kız	51	Torako-Abdominal	Negatif	negatif	Pozitif	Pozitif	1	IV	kötü
203	Erkek	18	Sürrenal	Pozitif	pozitif	Negatif	Pozitif	1	IV	Kötü
207	Erkek	24	sürrenal	Negatif	pozitif	Pozitif	Pozitif	1	IV	kötü
255	Kız	42	Sürrenal	Pozitif	pozitif	Negatif	Negatif	.	III	iyi
263	Erkek	36	Torako-abdominal	Negatif	negatif	Pozitif	Pozitif	.	IV	kötü
274	Kız	48	Sürrenal	Negatif	negatif	Pozitif	Pozitif	1	III	kötü
275	Erkek	18	Sürrenal	Pozitif	pozitif	Negatif	Pozitif	1	IV	Kötü
281	Erkek	23	Paraspinal abdominal	Negatif	pozitif	Pozitif	Negatif	>1	III	Kötü
287	Kız	90	Abdominal sürrenal tek taraflı	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	1	IV	Kötü
303	Erkek	96	Abdominal Sürrenal tek taraflı	Negatif	pozitif	Negatif	Pozitif	1	IV	kötü histoloji
306	Kız	48	Sürrenal	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	1	IV	iyi
340	Erkek	24	Torakal ve Torako-abdominal	Negatif	negatif	Negatif	Pozitif	<1	IV	Tanımlanmayan Nöroblastom
379	Kız	56	Abdominal paraspinal	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	.	IV	Kötü
438	Kız	35	Abdominal sürrenal tek taraflı (Kum Saati:2)	Negatif	pozitif	Negatif	Negatif	>1	IV	Kötü

442	Erkek	53	Abdominal sürrenal tek taraf� (Kum Saati:2)	Pozitif	pozitif	Negatif	Pozitif	1	IV	Kötü
-----	-------	----	--	---------	---------	---------	---------	---	----	------

4.2. ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a, H2AFX ve ETV5 genlerinin ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Seçilen hastalarda, ALK, ATRX, HIF1a, HIF2a (EPAS), H2AFX ve ETV5 genlerinin ekspresyonlarına bakmak için, taze dokulardan RNA izolasyonu ve cDNA çevirimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinde, eř-zmanlı PCR kullanılarak, genlerin ekspresyonu değerlendirilmiştir. Referans gen olarak beta-aktin geni kullanılmıştır. Tablo 6 ve Tablo 7’de hedef genlerin, beta-aktin genine göre normalize edilmiş ekspresyon değerleri belirtilmiştir. Belirtilen değerler, 2 tekrarlı verilerin ortalamasıdır.

Tablo 6. Düşük risk grubu hastaların değerlendirilen gen ekspresyon değerleri. (alışmayan örnekler “0” rakamı ile ifade edilmiştir. Bu  rnekler, hesaplamalara dahil edilmemiştir)

DüşüK RISK GRUBU									
NB Kod	Cinsiyet	yaş (ay)	Primer	ALK	ATRX	HIF1a	HIF2a (EPAS)	H2AFX	ETV
37	Erkek	3	Sürrenal	0	5,49E-02	0,19275	9,88E-03	1,04E-02	0
41	Kiz	7	paraspinal abdominal	5,53E-04	2,81E-03	7,43E-03	4,90E-04	4,89E-04	1,13E-03
63	Kiz	1	Abdominal Sürrenal tek taraf�	3,48E-04	9,78E-02	0,1649	9,01E-03	4,39E-03	4,99E-03
144	Erkek	14	Paraspinal abdominal	9,05E-05	0,1089	2,75E-02	9,46E-03	7,26E-03	5,70E-04
145	Kiz	168	Servikal	7,17E-04	7,51E-03	8,78E-03	4,17E-03	3,07E-03	5,39E-04
154	Erkek	60	Abdominal S�rrenal tek taraf�	0	4,27E-02	8,39E-02	7,80E-03	1,31E-02	0

182	Kiz	3	Servikal	0	0,09955	0,32015	1,40E-02	5,74E-03	5,22E-03
183	Erkek	42	Torakal	4,64E-05	7,87E-02	6,98E-02	6,30E-03	3,92E-03	2,29E-03
184	Kiz	18	Torakal	1,07E-03	3,76E-03	6,55E-03	2,03E-03	1,53E-03	3,38E-03
194	Erkek	6	Abdominal Sürrenal tek tarafli	1,21E-03	1,44E-02	3,35E-02	5,82E-03	5,00E-03	5,84E-03
198	Kiz	16	Torakal	1,26E-04	1,51E-03	3,16E-03	1,10E-03	4,38E-04	2,60E-04
224	Kiz	13	Sürrenal	2,34E-03	4,09E-03	1,79E-02	8,92E-04	3,05E-04	1,26E-03
239	Erkek	24	Paraspinal (Abdominal)	2,25E-03	6,30E-03	4,72E-02	3,79E-03	1,86E-03	3,45E-03
315	Kiz	5	Abdominal sürrenal tek tarafli	3,86E-05	1,23E-02	2,19E-02	6,61E-03	4,69E-03	1,53E-03
324	Kiz	6	Servikal (Kum saati:2)	2,54E-05	2,63E-02	5,95E-02	4,15E-03	5,54E-03	2,82E-04
363	Erkek	3	Abdominal Paraspinal	4,22E-04	2,34E-03	8,95E-03	2,80E-03	6,42E-04	2,95E-04
365	Erkek	4	.	5,42E-05	2,22E-02	4,12E-02	1,97E-02	9,24E-03	3,76E-04
367	Erkek	15	Abdominal sürrenal tek tarafli (Kum saati:2)	2,27E-05	4,28E-03	1,46E-02	9,15E-03	6,62E-03	1,20E-04
390	Erkek	25	Abdominal sürrenal tek tarafli (Kum saati:2)	5,28E-05	6,30E-03	1,97E-02	9,11E-03	4,73E-03	2,00E-04
409	Erkek	2	Abdominal sürrenal tek tarafli	3,05E-06	2,99E-03	3,73E-03	8,66E-03	1,47E-02	0
411	Erkek	22	Abdominal sürrenal tek tarafli	2,86E-03	1,43E-03	8,54E-03	5,95E-04	7,36E-04	4,54E-04
413	Kiz	11	Abdominal sürrenal tek tarafli (Kum	2,71E-04	1,54E-02	3,18E-02	7,61E-03	1,69E-02	8,09E-04

			saati:2)						
415	Kız	37	Abdominal sürrenal tek tarafli	1,41E- 04	2,83E-02	9,16E- 02	1,84E-03	7,00E- 04	3,77E- 03
465	Erkek	0	Primeri bilinmeyen	0	9,51E-03	3,85E- 02	7,85E-03	6,20E- 03	0
474	Erkek	5	Abdominal sürrenal tek tarafli	6,01E- 05	1,82E-02	9,26E- 02	1,64E-02	1,62E- 02	0

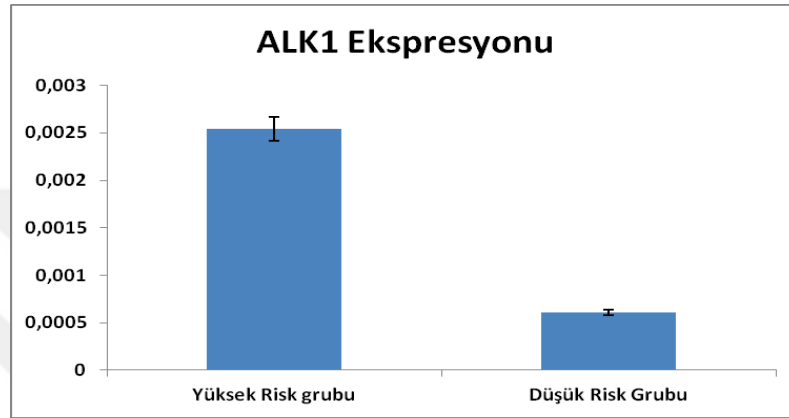
Tablo 7. Yüksek risk grubu hastaların değerlendirilen gen ekspresyon değerleri

YÜKSEK RISK GRUBU									
NB Kod	Cinsiy et	yas (ay)	Primer	ALK	ATRX	HIF1a	HIF2a (EPAS)	H2AFX	ETV
7	Kız	96	Sürrenal	1,72E- 04	0,36645	1,22E- 02	3,70E- 02	1,01E-02	0
25	Kız	50	Pelvik	4,05E- 04	0,0988	2,28E- 01	6,62E- 03	1,28E-02	0
26	Kız	66	Sürrenal	3,83E- 03	7,04E- 03	1,12E- 02	2,36E- 03	5,49E-04	6,31E- 04
27	Erkek	144	Paraspinal abdominal	2,59E- 04	4,62E- 02	8,00E- 02	9,04E- 03	7,29E-03	0
29	Erkek	18	Sürrenal	1,07E- 02	2,62E- 02	1,51E- 01	5,18E- 03	1,16E-02	1,41E- 02
39	Kız	9	pelvik	1,42E- 05	0,14445	7,18E- 02	9,97E- 03	9,37E-03	3,73E- 04
44	Kız	84	Sürrenal	8,51E- 03	1,30E- 02	4,43E- 02	1,76E- 03	1,43E-03	7,11E- 03
78	Kız	84	Bilinmeyen	9,43E- 03	3,87E- 02	5,26E- 01	1,25E- 02	2,15E-02	4,10E- 03
82	Erkek	36	Abdominal sürrenal	1,00E- 03	5,59E- 02	1,58E- 01	1,36E- 02	1,02E-02	5,02E- 04
102	Kız	30	Torako- Abdominal	0	0,349	7,66E- 01	2,42E- 02	1,08E-02	0
110	Kız	21	Sürrenal	0	0,11505	2,08E- 01	1,45E- 02	1,11E-02	0,00E+0 0
132	Erkek	19	Sürrenal	0	8,54E- 02	2,66E- 01	1,38E- 02	3,50E-02	0
146	Erkek	36	Sürrenal	0	0,1542	4,33E- 01	3,50E- 02	1,05E-02	0
176	Kız	30	Sürrenal	0	0,2667	1,82E-	8,49E-	1,23E-02	0

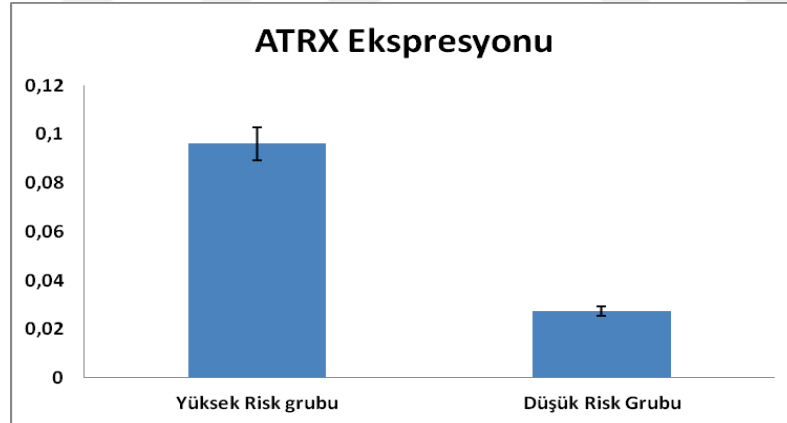
						01	03		
202	Kız	51	Torako- Abdominal	5,19E- 03	6,19E- 02	3,21E- 01	1,18E- 02	1,00E-02	2,17E- 03
203	Erkek	18	Sürrenal	8,34E- 04	4,15E- 02	1,83E- 01	7,56E- 03	4,91E-03	1,05E- 03
207	Erkek	24	sürrenal	1,68E- 04	1,27E- 02	2,10E- 02	5,48E- 03	2,44E-03	5,35E- 03
255	Kız	42	Sürrenal	0	0,227	1,68E- 01	2,76E- 02	1,33E-02	0
263	Erkek	36	Torako- abdominal	0	3,31E- 03	4,07E- 02	0,1588	3,48E-02	0
274	Kız	48	Sürrenal	0	0,1189	1,16E- 03	2,12E- 02	5,82E-02	0
275	Erkek	18	Sürrenal	0	3,76E- 02	0,3558	1,66E- 02	1,43E-02	0
281	Erkek	23	Paraspinal abdominal	2,07E- 04	6,59E- 02	5,73E- 02	1,01E- 02	1,21E-02	0
287	Kız	90	Abdominal sürrenal tek tarafı	0	1,63E- 01	1,25E- 01	6,79E- 03	8,28E-03	0
303	Erkek	96	Abdominal Sürrenal tek tarafı	0	3,13E- 02	1,75E- 02	1,68E- 02	1,75E-02	2,52E- 03
306	Kız	48	Sürrenal	9,57E- 04	2,41E- 02	6,84E- 02	1,68E- 03	1,44E-03	6,36E- 03
340	Erkek	24	Torakal ve Torako- abdominal	1,78E- 04	0,1605	1,14E- 02	6,95E- 03	1,99E-03	1,35E- 03
379	Kız	56	Abdominal paraspinal	0	1,53E- 02	2,52E- 02	1,46E- 02	1,38E-02	0
438	Kız	35	Abdominal sürrenal tek tarafı (Kum Saati:2)	1,31E- 04	5,45E- 02	5,45E- 02	9,22E- 03	8,35E-03	0
442	Erkek	53	Abdominal sürrenal tek tarafı (Kum Saati:2)	1,24E- 03	4,74E- 03	4,74E- 03	9,65E- 04	1,23E-03	9,06E- 04

Yüksek Risk ve düşük risk hastalarının ekspresyon ortalamalarına bakıldığında, ETV5 dışındaki ($p=0,09$) tüm genlerin, yüksek risk grubunda anlamlı

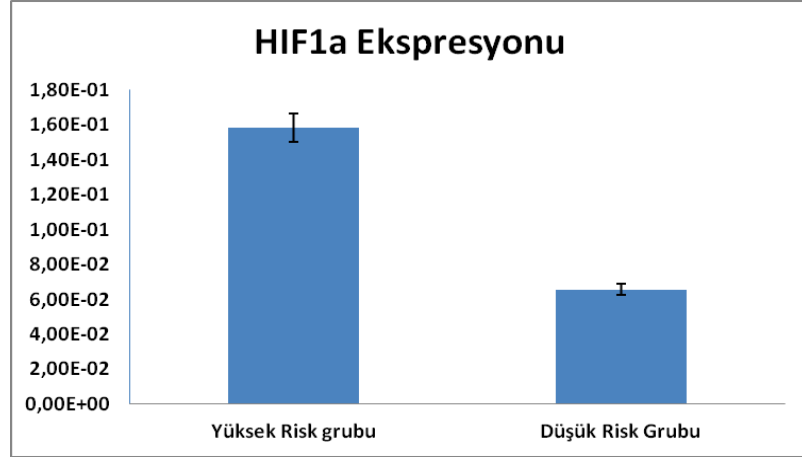
olarak daha fazla eksprese olduğu görülmüştür (Şekil 6-11). Yüksek risk grubu ve düşük risk grubu hastaların ortalama ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında; ALK1, ATRX, HIF1a, HIF2a(EPAS), H2AFX ve ETV5 genleri, yüksek risk grubunda düşük risk grubuna göre sırasıyla, 4.2 kat ($p=0.036$), 3.5 kat ($p=0.000$), 2.4 kat ($p=0.013$), 2.6 kat ($p=0.007$), 2.1 kat ($p=0.005$) ve 1.94 kat ($p=0.09$) artış göstermiştir.



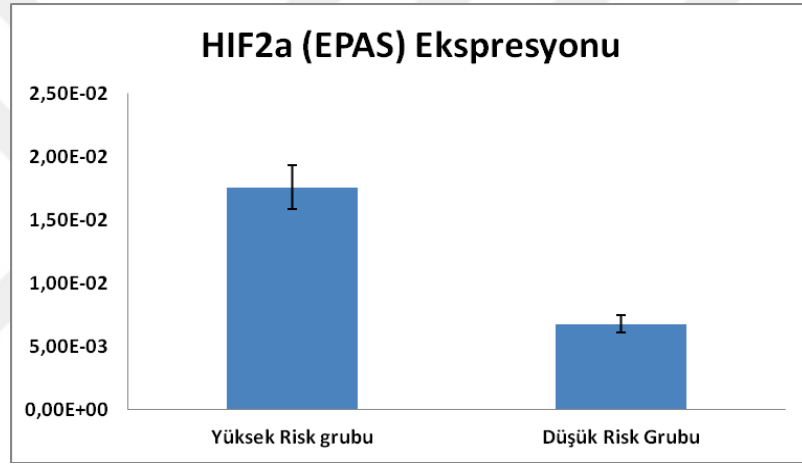
Şekil 7. Yüksek ve düşük risk grubu ALK ekspresyon değeri karşılaştırması. ($p=0.036$)



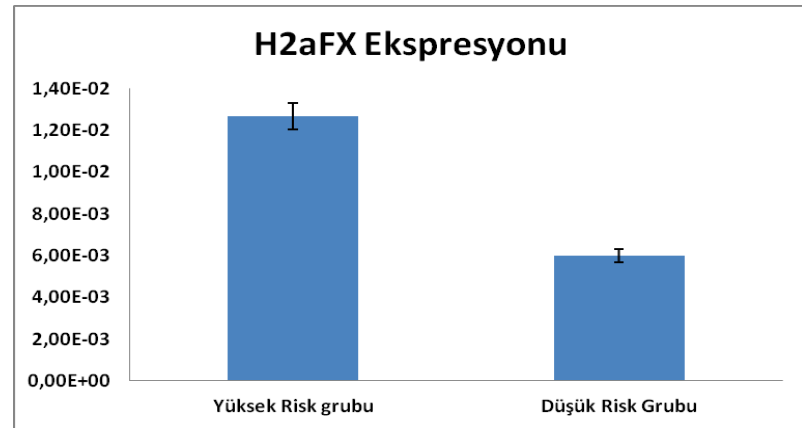
Şekil 8. Yüksek ve düşük risk grubu ATRX ekspresyon değeri karşılaştırması. ($p=0.000$)



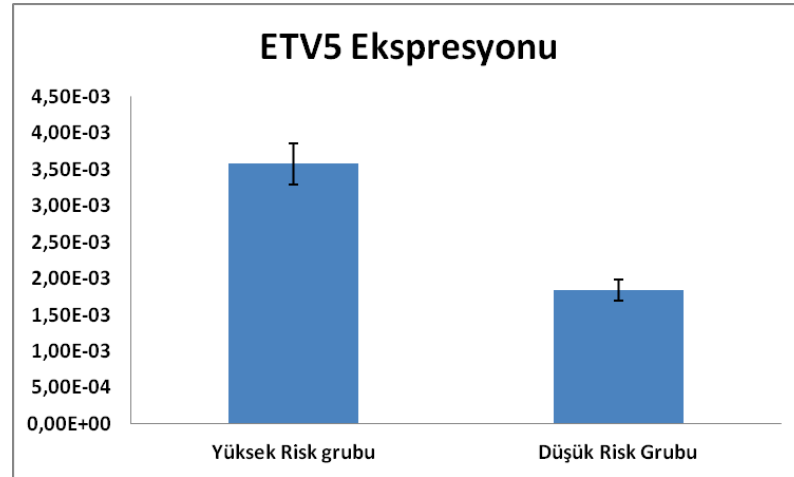
Şekil 9. Yüksek ve düşük risk grubu HIF1a ekspresyon değeri karşılaştırması.
($p=0.013$)



Şekil 10. Yüksek ve düşük risk grubu HIF2a ekspresyon değeri karşılaştırması.
($p=0.007$)



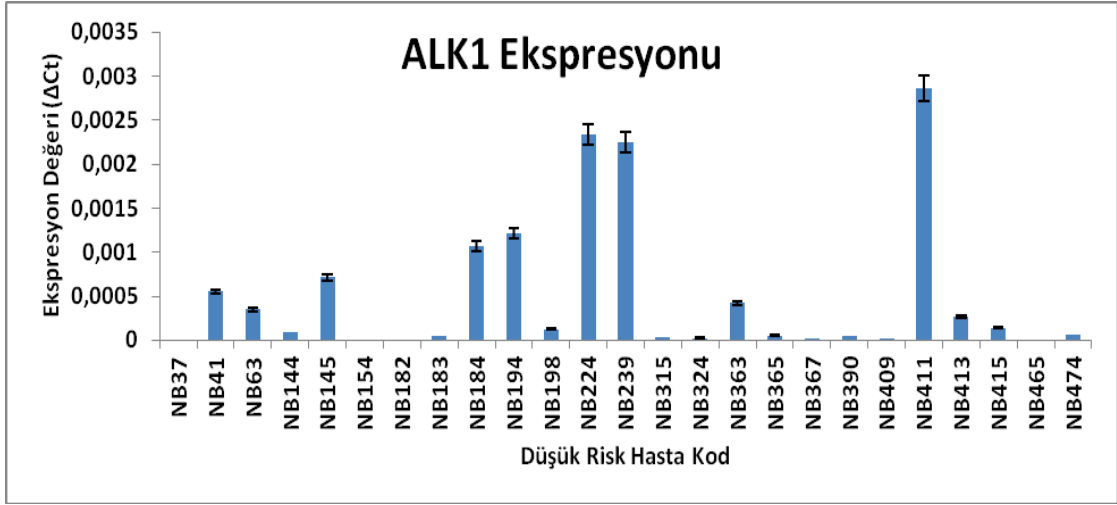
Şekil 11. Yüksek ve düşük risk grubu H2aFX ekspresyon değeri karşılaştırması.
($p=0.005$)



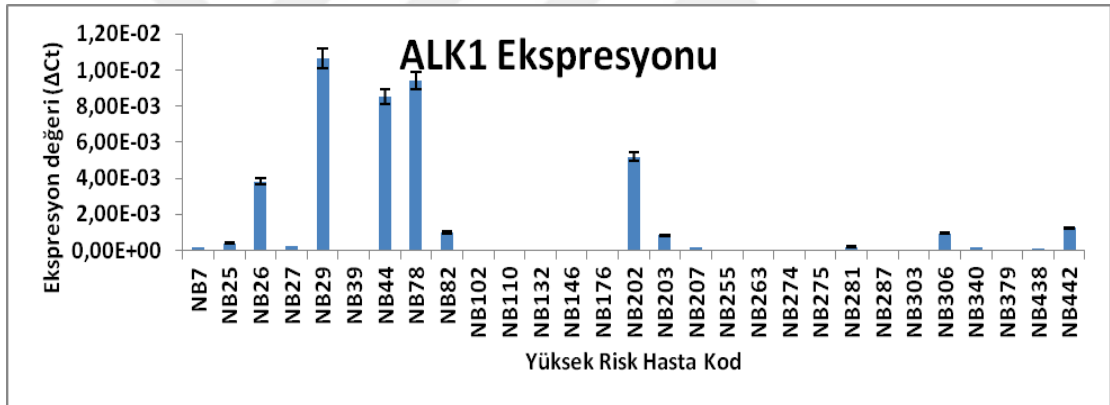
Şekil 12. Yüksek ve düşük risk grubu ETV5 ekspresyon değeri karşılaştırması. (p=0.090)

Ekspresyonları değerlendirilen genlerin hastalar arası ifadenme profillerine ayrı ayrı bakıldığında, ALK geni için, toplamda 17 yüksek risk ve 21 düşük risk hastası değerlendirmeye katılmıştır. Düşük risk grubu hastalarda (Şekil 12A), NB224, NB239 ve NB411 numaralı hastalarda yüksek ALK1 ekspresyonu gözlenirken, yüksek risk grubu hastalarında (Şekil 12B), NB29, NB44, NB78 ve NB202 numaralı hastalarda yüksek ALK1 ekspresyonu gözlemlenmiştir.

A)



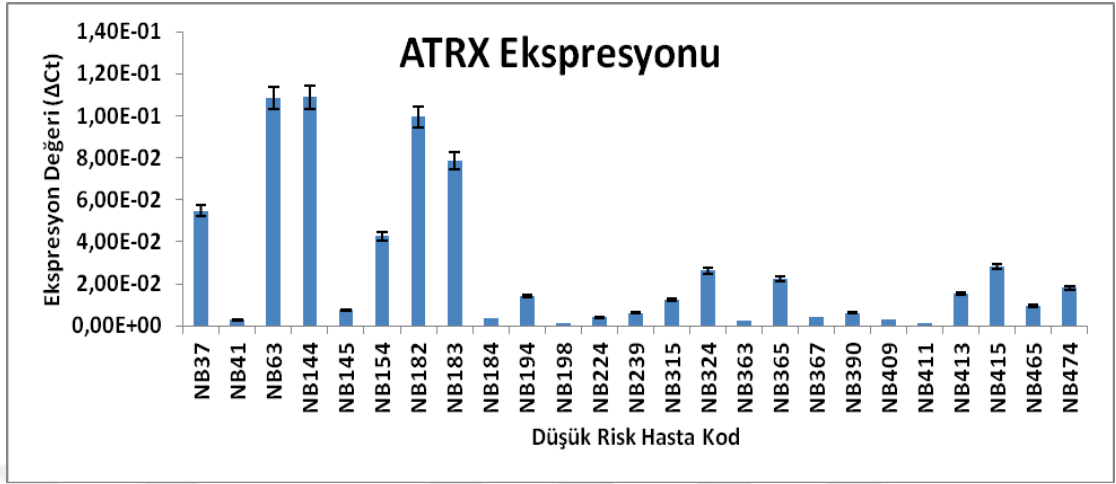
B)



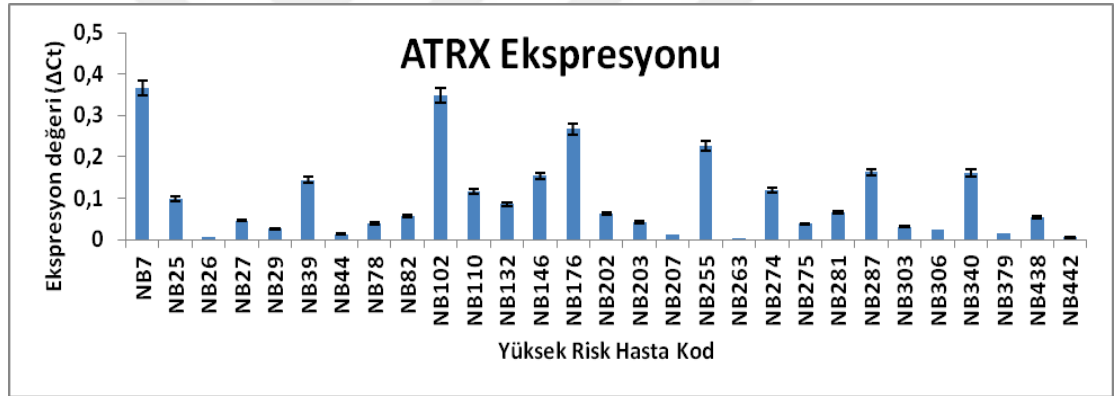
Şekil 13. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların ALK1 ekspresyon profili.

ATRX geni için, düşük risk grubundan 25, yüksek risk grubundan 29 hastanın verileri değerlendirilmiştir. Düşük risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 13A), NB63, NB144, B182 ve NB183 numaralı hastalarda daha yüksek ATRX ekspresyonu gözlemlenirken; yüksek risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 13B), NB7, NB102, NB176 ve NB255 numaralı hastalarda daha fazla ATRX ekspresyonu gözlemlenmiştir.

A)



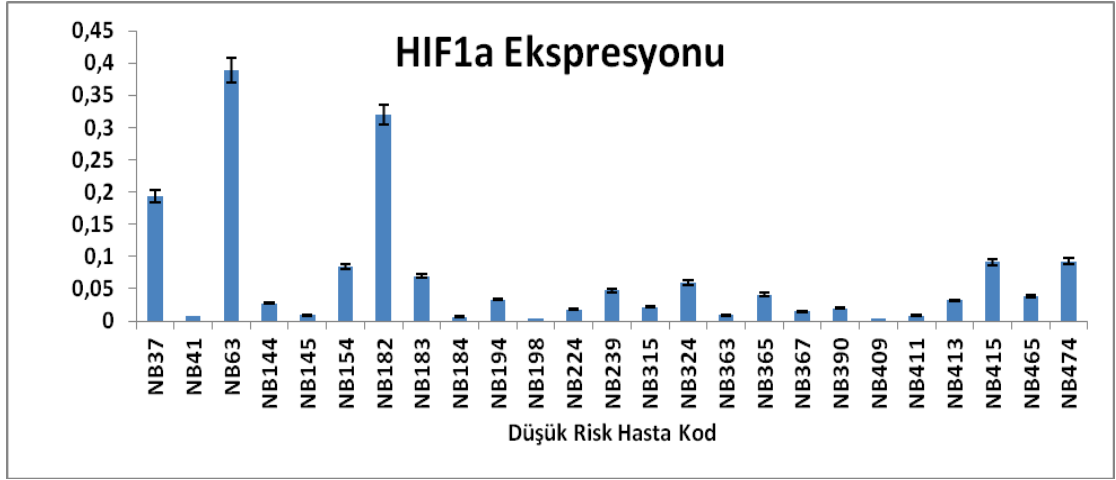
B)



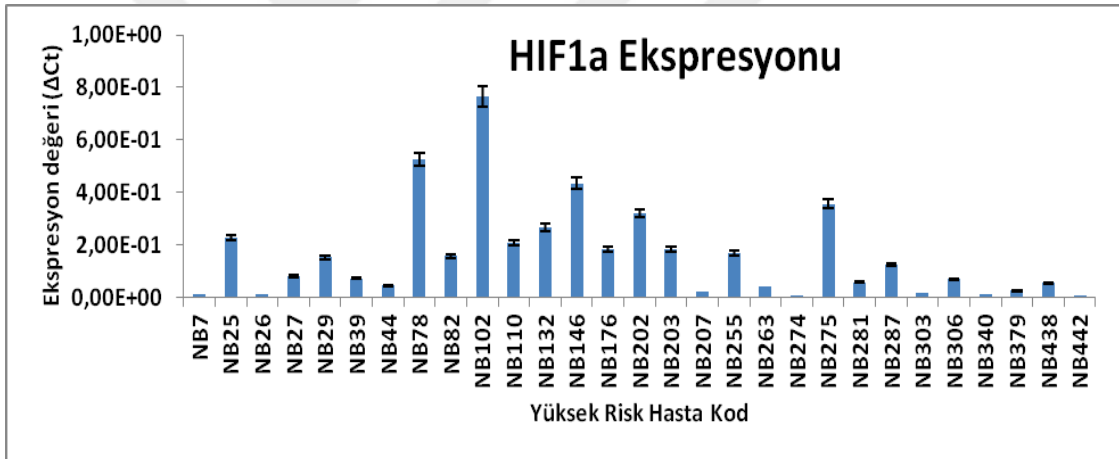
Şekil 14. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların ATRX ekspresyon profili.

HIF1a geni için, düşük risk grubundan 25, yüksek risk grubundan 29 hastanın verileri değerlendirilmiştir. Düşük risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 114A), NB37, NB63 ve NB182 numaralı hastalarda daha yüksek HIF1a ekspresyonu gözlemlenirken; yüksek risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 14B), NB78, NB102, NB146 ve NB275 numaralı hastalarda daha fazla HIF1a ekspresyonu gözlemlenmiştir.

A)



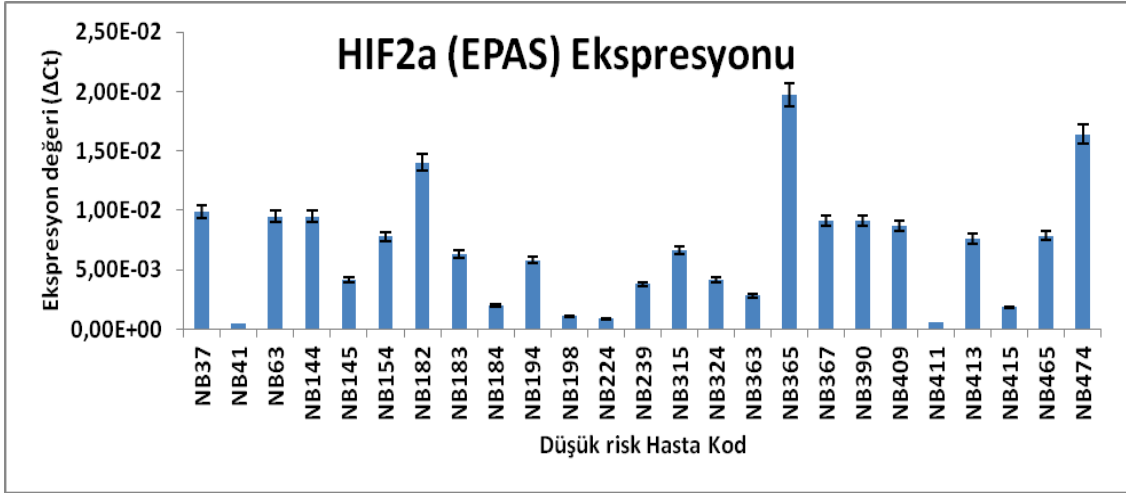
B)



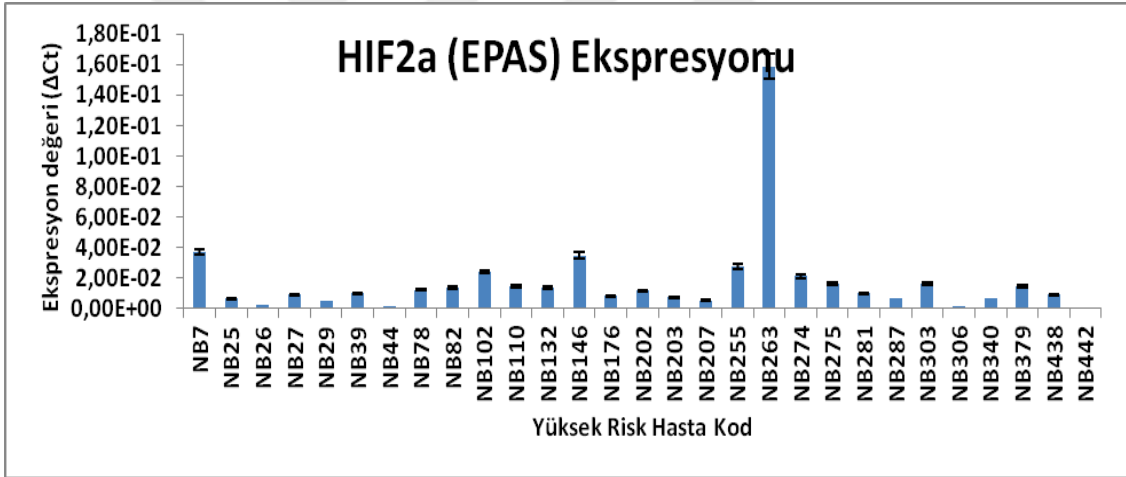
Şekil 15. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların HIF1a ekspresyon profili.

HIF2a(EPAS) geni için, HIF1a geni için, düşük risk grubundan 25, yüksek risk grubundan 29 hastanın verileri değerlendirilmiştir. Düşük risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 15A), NB182, NB365 ve NB474 numaralı hastalarda daha yüksek HIF2a ekspresyonu gözlemlenirken; yüksek risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 15B), NB263 numaralı hastada daha fazla HIF2a ekspresyonu gözlemlenmiştir.

A)



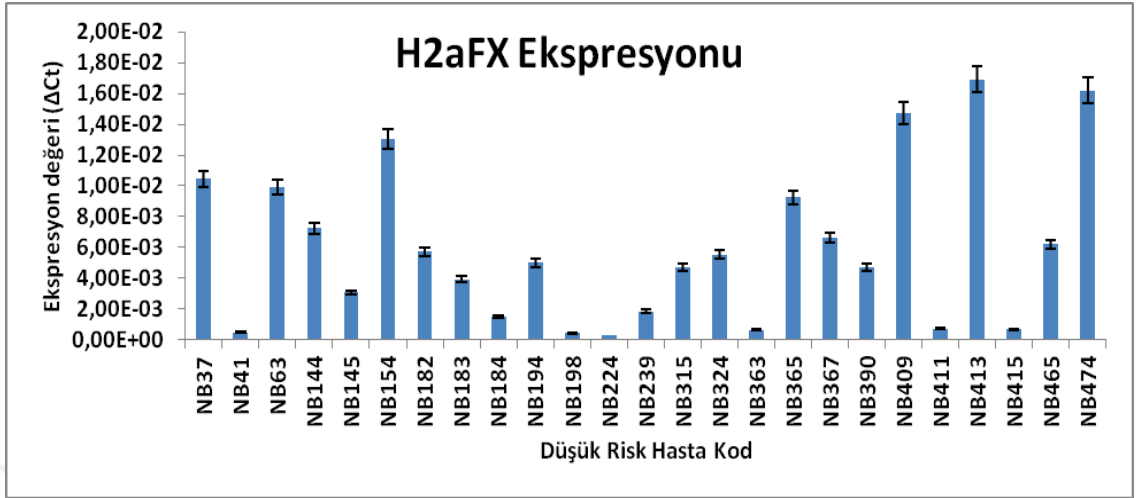
B)



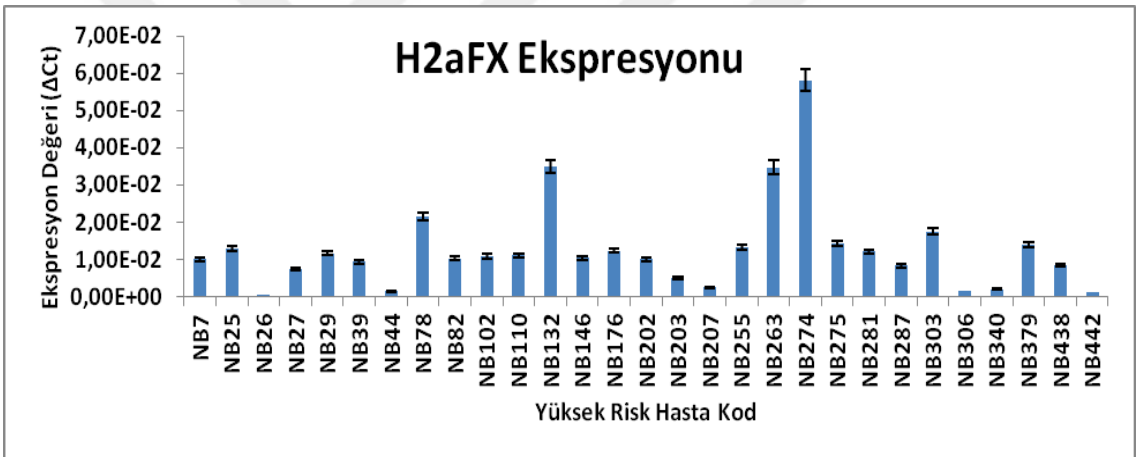
Şekil 16. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların HIF2a (EPAS) ekspresyon profili.

H2aFX geni için, HIF1a geni için, düşük risk grubundan 25, yüksek risk grubundan 29 hastanın verileri değerlendirilmiştir. Düşük risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 16A), NB37, NB63, NB154, NB365, NB409, NB413 ve NB474 numaralı hastalarda daha yüksek H2aFX ekspresyonu gözlemlenirken; yüksek risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 16B), NB78, NB132, NB263 ve NB274 numaralı hastalarda daha fazla H2aFX ekspresyonu gözlemlenmiştir.

A)



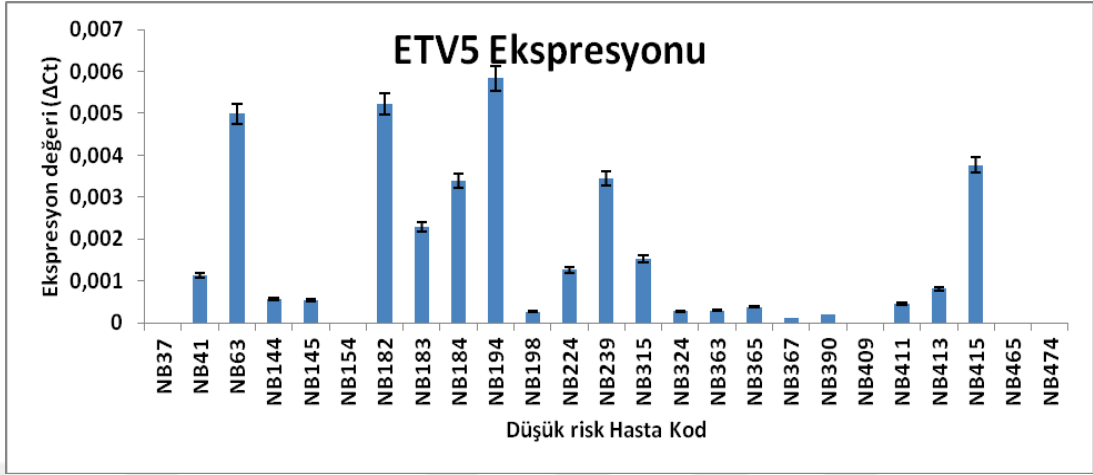
B)



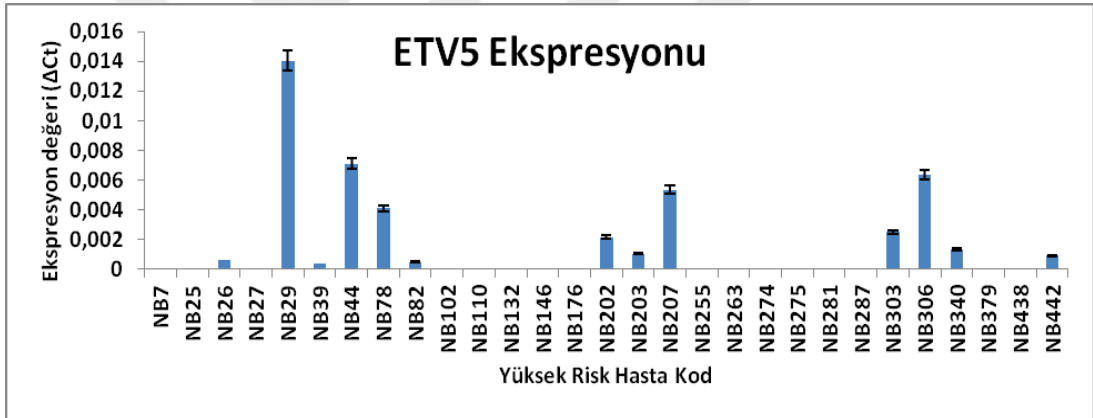
Şekil 17. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların H2aFX ekspresyon profili.

ETV5 geni için, düşük risk grubundan 20, yüksek risk grubundan 14 hastanın verileri değerlendirilmiştir. Düşük risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 17A), NB37, NB63 ve NB182 numaralı hastalarda daha yüksek HIF1a ekspresyonu gözlemlenirken; yüksek risk grubu hastaları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında (Şekil 17B), NB78, NB102, NB146 ve NB275 numaralı hastalarda daha fazla HIF1a ekspresyonu gözlemlenmiştir.

A)



B)



Şekil 18. A) Düşük risk B) yüksek risk grubu hastaların ETV5 ekspresyon profili.

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda, ALK1, ATRX, HIF1a, HIF2a, H2aFX ve ETV5 genlerinin ekspresyon seviyeleri ile; MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, 11q kaybı ile, ALK dışındaki diğer genlerin de 17q kazancı ile anlamlı bir ilişkisi olmadığı gözlemlenmiştir. ALK ekspresyonunun 17q kazancı pozitif hastalarda daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0.018$). ETV5 dışındaki genlerin, yüksek risk grubunda anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Tedavi protokolünde, ilk indüksiyon tedavisine yanıt vermeyen ve progresif hastalığa sahip hastalar, “ultra-yüksek risk” grubu olarak değerlendirilmiştir. Yüksek risk grubu hastalarını, ultra-yüksek risk ve yüksek risk olarak ayırladığımızda, ALK

ekspresyonunun ultra-yüksek risk grubunda daha fazla ($p=0.027$), ATRX geninin ise yüksek risk grubu hastalarda daha az eksprese olduğu ($p=0.01$) bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

Nöroblastom, çocukluk çağıının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde farklı yanıtlar alınmaktadır. Yapılan son çalışmalarda, hastalığın seyrinde etkili olabileceği belirtilen farklı gen ve mekanizmalar gösterilmiştir. Özellikle yüksek risk grubuna giren hastaların belirli gen ifadelenmelerinin aydınlatılmasının, risk gruplarının belirlenmesi ve tedavi protokolünün seçimi konusunda yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, hastalığın prognozunu belirleme ve tedavi yönteminin kararlaştırılması açısından, hastalığın moleküler biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yönelik genetik düzeyde araştırma yapılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda yüksek risk grubuna giren nöroblastom hastalarında, son zamanlarda tedavi protokolünü etkilediği belirlenen ve önemli olduğu düşünülen ALK, ATRX, ETV5, HIF1a, HIF1b ve H2AX genlerinin RNA seviyesinde ifadelenme analizleri değerlendirilmiş, yüksek risk grubunun, ultra-yüksek risk ve yüksek risk olarak ayrılmasında rol oynayabilecek belirteç bir genin varlığı araştırılmıştır.

ALK, ATRX, ETV5, HIF1a, HIF1b ve H2AX genlerinin ekspresyonlarına bakıldığında, ETV5 geni dışındaki genlerin ekspresyonlarında, yüksek risk hastalarında düşük risk hastalarına göre anlamlı olarak artış gözlemlenmiştir.

ETS transkript varyantı 5 (ETV5), ETS transkripsiyon faktör ailesinin korunmuş bir üyesidir (106). ETV5, kolon kansinomlarında sporadik olarak yüksek ekspresyon gösterirken (107), Hec-1A endometrioid endometriyal kansinom hücre hattında fazla ifadeleniği ve metastatik fenotip ile ilişkili olduğu bulunmuştur (106). Ayrıca ETV5'in meme kansinomlarının %80'inde yüksek eksprese olduğu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (108). ETV5 geninin, matriks metalloproteinaz 2 geninin regülasyonunda rol oynadığı da yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (109). Bu çalışmada, ETV5 geni, yüksek risk hastalarında, düşük riske göre 1,94 kat artış göstermiş, buna karşın, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.09$). İstatistiksel anlamlılığın bulunamamasının, ETV5 geni için değerlendirilen hasta sayısının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, HIF1a ve HIF1b genlerinin, yüksek risk grubu hastalarda daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. Hipoksi-indüklü faktörler (HIF), tümör hücrelerinde farklı regüle edilmektedir. HIF1a ve HIF2a proteinlerinin, nöroblastom hücrelerinde de farklı ifadelendiği, hipoksik koşullarda, HIF1a'nın hızlı ve geçici stabilizasyon gösterdiği, HIF2a'nın ise daha uzun ekspresyon sergilediği gösterilmiştir (110,111). Yüksek HIF2a seviyelerinin, nöroblastom ve glioblastomda agresif hastalık fenotipi ile ilişkili olduğu gösterilmiş, bu geninin ekspresyonunun azaltılması, tümör büyümesinin olumsuz etkilemiş ve bu sonuçlar doğrultusunda HIF2a'nın onkogen olarak tanımlanabileceği belirtilmiştir (110,111). Yüksek risk hastalarında bu genin fazla ifadenmesi, bu genin, kötü nöroblastom prognozunda rol oynadığını doğrular niteliktedir.

Korelasyon analizlerine göre, cinsiyetin, herhangi bir moleküler parametre ile ilişkili olmadığı gözlemlenmiştir. Yaş ile evre arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.010$). Evre IIB, III ve IV hastalarının yaş ortalamaları, evre I,IIA ve IVS hastalarının yaş ortalamalarına göre daha yüksektir. Ekspresyonları değerlendirilen genlerin, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu ve 11q delesyonu ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır. Buna karşın, 17q kazancı pozitif olan olgularda, ALK1 gen ekspresyonunun, anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlenmiştir ($p=0.018$).

Yüksek risk hastaları, “ultra-yüksek risk” ve “yüksek risk” olarak iki gruba ayrıldığında, ALK gen ekspresyonunun “ultra-yüksek risk” grubunda daha yüksek olduğu ($p=0.027$) gözlemlenmiştir. Bu genin, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu ve 11q kaybı ile ilişkili bulunmaması, yüksek risk grubu içerisinde “ultra-yüksek risk” alt grubunun ayrımında belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Kromatin-yeniden-modellemede görev alan ATRX genini inaktive edici mutasyonların, yüksek risk grubu hastalarında bulunan bir küme olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş (99-101) ve bu mutasyonların, alternatif telomer uzatıcı sinyal yolağı (ALT) aktivasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (100). ATRX mutasyonu olan hastaların, yüksek-risk grubu içerisinde daha kötü seyirli olduğu belirtilmiştir (101). ATRX mutasyonlarının MYCN amplifikasyonundan bağımsız olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (99). Bulgularımız bu veriyi destekler niteliktedir. ATRX geni aynı zamanda Rac/Rho sinyal yolağının regülatörüdür ve NB'da nöritogeneizde de rol oynadığı gösterilmiştir (97,98).

ALK, insülin reseptör süperailesi reseptör tirozin kinaz üyesidir (113). Kromozom 2p23 bölgesinde bulunmakta ve tek zincirli transmembran bir protein kodlamaktadır (113). Mutant yada amplifiye ALK; JAK-STAT, PI3K-AKT ya da RAS-MAPK yolaklarının aktivasyonu aracılığı ile hücre büyümesini ve canlılığını tetiklemektedir (114). ALK aktive edici mutasyonları, çocukların %8'inde görülmektedir (98). Bu gendeki mutasyonlardan bağımsız olarak, bu reseptörün yüksek protein ekspresyon seviyeleri de, proteinin onkogenik rolünde belirtilmiştir (98). Dolayısı ile ALK aşırı ekspresyonu, kötü prognozda rol oynamaktadır. ALK, “ultra-yüksek risk” grubu hastalarında, yüksek risk grubu hastalarına göre anlamlı olarak artmıştır. Bu nedenle bu alt-grubun ayrılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

MYCN amplifikasyonu ve ALK mutasyonları, nöroblastomdaki en yaygın ve önemli biyolojik bozukluklar arasındadır. MYCN amplifikasyonu genelde yüksek risk grubu hastalarda görülürken, ALK mutasyonları, düşük ve ileri evre hastalarda benzer oranlarda görülmektedir (112). Germ hücre kaynaklı ALK mutasyonları, herediter nöroblastomlu hastaların bir kısmını oluşturmaktadır. ATRX mutasyonları, kronik fakat progresif hastalığın tespitinde yeni bir biyobelirteç olabilme potansiyelindedir ve farklı risk-bazlı tedavi yanıtlarında rol oynayabileceği düşünülmektedir (112).

Agresif nöroblastom üzerinde etki edebilecek önemli bir bulgu da, yüksek-risk nöroblastomda, genetik düzenlemelere bağlı olarak oluşan TERT (Telomeraz ters transkriptaz) aktivasyonudur (115). ATRX mutasyonlarının, farklı bir yüksek-risk grubunu tanımladığı, sadece MYCN-amplifiye olmayan ve normal-TERT düzeyine sahip nöroblastomlarda görüldüğü ve alternatif telomer uzatma aktivitesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir (115). Telomer uzaması, yüksek-risk nöroblastomun sık görülen bir özelliğidir (114). ATRX geninin yüksek risk ve “ultra yüksek risk” grubu ayrımındaki rolünün, telomerler üzerinden etki etmesi, olası mekanizmalar arasındadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile, ALK, ATRX, ETV5, HIF1a, HIF1b ve H2AX genlerinin ekspresyonlarına bakıldığında, yüksek risk grubu hastalarında, düşük risk grubuna göre daha fazla ifadelendiği gösterilmiştir. Bu genlerin, nöroblastom rutin moleküler analiz parametreleri olan NMYC, 1p36, 11q23,17q25 genetik değişimleri ile anlamlı ilişkileri bulunmamıştır. Analizi yapılan genlerden, ALK ve ATRX gen ekspresyonlarının, yüksek risk grubu içerisinde “ultra-yüksek risk” grubu hastalarının belirlenmesinde aday belirteç olabilecekleri gösterilmiştir. ALK ve ATRX genleri ile yapılacak olan protein seviyesindeki çalışmalar ile, bu genlerin “ultra-yüksek risk” sınıfı ayrımındaki rollerinin daha net anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2264-2279.
2. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Uysal K. Nöroblastoma tedavi protokolü. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG-NBL) 2003.
3. Changqing Li, Zhibin Wu, Min Liu, Marzena Pazgier, and Wuyuan Lu. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein&Science* 2008.
4. Berthold F. Neuroblastoma-90 (NB-90) protocol. German Pediatric Oncology Group (GPOG-NBL) 1990.
5. Matthey KK, Perez C, Seeger RC, et al. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: A Children's Cancer Group study. *J. Clin Oncol* 1998;16:1256. SIOPEN Annual General Meeting, Stockholm, 30th October-3rd November, 2006.
6. West AB, Kapatos G, O'Farrell C, Gonzalez-de-Chavez F, Chiu K, Farrer MJ, Maidment NT. N-myc regulates parkin expression. *J Biol Chem* 2004;279(28):28896-902.
7. E. Villamon, A. P. Berbegall, M. Piqueras, I. Tadeo, V. Castel et al.' Genetic Instability and Intratumoral Heterogeneity in Neuroblastoma with MYCN Amplification Plus 11q Deletion', *PLoS ONE* 2013; 8(1): e53740.
8. C. Schönherr, K. Ruuth, S. Kamaraj, C. L. Wang, H. L. Yang et al., 'Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells', *Oncogene*, Volume 31, Issue 50, Pages 5193-5200 2012.
9. Nimrod B Kiss, Per Kogner, John Inge Johnsen, Tommy Martinsson, Catharina Larsson et al., 'Quantitative global and gene-specific promoter methylation in relation to biological properties of neuroblastomas' *BMC medical genetics* 2012;13: 83.
10. Cecilia Krona et al., 'Screening for gene mutations in a 500 kb neuroblastoma tumor suppressor candidate region in chromosome 1p; mutation and stage-specific expression in UBE4B/UFD2', *Oncogene* 2003:2343-2351.

11. Katleen De Preter et al., 'Positional and functional mapping of a neuroblastoma differentiation gene on chromosome 11', *BMC Genomics* 2005;6:97.
12. Qun Wang et al., 'Integrative Genomics Identifies Distinct Molecular Classes of Neuroblastoma and Shows That Multiple Genes Are Targeted by Regional Alterations in DNA Copy Number', *Cancer Res* 2006; 66(12):6050-6062.
13. Ryota Souzaki et al., 'Clinical implications of a slight increase in the gene dosage of MYCN in neuroblastoma determined using quantitative PCR' *Pediatr Surg Int* 2008;24: 1095-1100.
14. Ruediger Spitz et al., 'FISH Analyses for Alterations in Chromosomes 1,2,3, and 11 Define High-Risk Groups in Neuroblastoma', *Med Pediatr Oncol* 2003;41:30-35.
15. Huang Miller and William A. Weiss, 'Neuroblastoma and MYCN', *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a014415
16. Matthay KK, George RE, Yu AL. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2012;18: 2740–2753.
17. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL.. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369: 2106–2120.
18. Barone G. et. al., 'New Strategies in Neuroblastoma:Therapeutic Targeting of MYCN and ALK', *Clinical Cancer Research*, Accepted manuscript, August 12 2013.
19. Schrönherr C et. al., ' Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells', *Oncogene* 2012; 31(50):5193-200.
20. Azarova A.M. et al., 'Emerging importance of ALK in neuroblastoma', *Semin Cancer Biol* 2011;21(4):267-275.
21. Li Y. Et al., 'Functional switching of ATM: sensor of DNA damage in proliferating cells and mediator of Akt survival signal in post-mitotic human neuron-like cells.' *Chin J Cancer* 2012;31(8): 364-372.
22. Candy Kumps et. al. 'ETV5 regulates cell proliferation downstream of the ALK signaling pathway', *ANR 2012 conference book, Poster presentation (POB00): p 118.*

23. Pugh, TJ et al., 'The genetic landscape of high-risk neuroblastoma', *Nat Genet* 2013;45(3):279-284.
24. Cai J-Y. et. al., 'Minimal Residual Disease is a Prognostic Marker for Neuroblastoma With Bone Marrow Infiltration', *American Journal of Clinical Oncology* 2012;35(3): 275-278.
25. Kim HR, et al. IGSF4 is a novel TCR-chain interacting protein that enhances TCR mediated signaling. *J Exp Med* 2011;208:2545-60.
26. Watabe K, Ito A, Koma YI, et al. IGSF4: a new intercellular adhesion molecule that is called by three names, TSLC1, SgIGSF and SynCAM, by virtue of its diverse function. *Histol Histopathol* 2003;18:1321-9.
27. Zhang X, Li W, Kang Y et al. SynCAM, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of glioblastoma. *Mol Biol Rep* 2013;40:5469-75
28. Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, et al. Clinical significance of CADM1/ TSLC1/ IGSF4 expression in adult T cell leukemia/ lymphoma. *Leukemia* 2012;26:1238-46.
29. Faraji F, Pang Y, Walker RD, et al. Cadm1 Is a Metastasis Susceptibility Gene That Suppresses Metastasis by Modifying Tumor Interaction with the Cell-Mediated Immunity. *PLoS Genet* 8(9): e1002926.
30. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2008. Cancer. in: *Molecular Biology of the Cell*, (Ed.) M.A. Sigrid Masson, Sherry Granum, Garland Science. UK.
31. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into clinical enigma. *Nature Reviews* 2003;3:203-16.
32. Knudson AG, Jr., Strong LC. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am. J. Hum Genet* 1972;24:514-32.
33. Kushner BH, Gilbert F., Helson L. Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* 1986;57:1887-93.
34. Friedman DL., KAdan-Lottick NS, Whitton J, Mertens AC, Yasui Y, Liu Y, Meadows AT, Robison LL, Strong LC. Increased risk of cancer among siblings of long-term childhood cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:1922-7.

35. Bourdeaut F, Trochet D, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Deville A, Coz C, Michiels JF, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228:51-8.
36. Krona C, Caren H, Sjöberg RM, Sandstedt B, Laureys G, Kogner P, Martinsson T. Analysis of neuroblastoma tumour progression; loss of PHOX2B on 4p13 and 17q gain are early events in neuroblastoma tumourigenesis. *Int J Oncol* 2005;32:575-83.
37. 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; 75:727-30.
38. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frebourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J. Germline mutations of the paired-like homeobox sB (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004;74:761-4.
39. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret v, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:967-70.
40. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim c, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008.
41. Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res* 1971;31:2098-103.
42. Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella G, Persson H. Coexpression of Messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 1993;53:2044-50.

43. Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastoma. *Cancer Res* 1992; 52:1364-8.
44. Suzuki T, Bogenmann E, Shimada H, Stram D, Seeger RC. Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:377-84.
45. Ryden M, Seghal R, Dominici C, Schilling FH, Ibanez CF, Kogner P. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastoma with favourable tumour stage and good prognosis. *Br J Cancer* 1996;74:773-9.
46. Yamashiro DJ, Nakagawara A, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM. Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene* 1996;12:37-41.
47. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994;14:759-67.
48. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Jr., Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:405-16.
49. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466-77.
50. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1988;6:1874-81.
51. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27:298-303.
52. Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 1977;40:2256-63.

53. Bauer A, Savelyeva L, Claas A, Praml C, Berthold F, Schwab M. Smallest region of overlapping deletion in 1p36 in human neuroblastoma: a 1 Mbp cosmid and PAC contig. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;31:228-39.
54. Caren H, Erichsen J, Olsson L, Enerback C, Sjöberg RM, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: Four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene. *BMC Genomics* 2008b;9:353.
55. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldut A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27:289-97.
56. Maris JM, Guo C, Blake D, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Rajalingam V, Gerbing R, Stram DO, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:32-6.
57. Martinsson T, Sjöberg R-M, Hedborg F, Kogner P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res* 1995;55:5681-6.
58. Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:940-9.
59. Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem* 2008;283:24426-34.
60. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredevelde LC, George RE, Stewart R, Greulich H, Shahriari K, Nguyen NV, Pigny P, Dahia PL, Pomeroy SL, Maris JM, Look AT, Meyerson M, Peeper DS, Carter BD, Kaelin WG, Jr. The kinesin KIF1Bbeta

acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev* 2008;22:884-93.

61. Schwab M, Alitalo K, Klemptner KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983;305:245-8.
62. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of Nmyc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4.
63. Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* 2008;416:153-9.
64. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:971-4.
65. George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W, 2nd, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, Xue L, Zozulye S, Gregor VE, Webb TR, Gray NS, Gilliland DG, Diller L, Greulich H, Morris SW, Meyerson M, Look AT. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:975-8.
66. Gascoyne RD, Lamant L, Martin-subero JI, Lestou VS, Harris NL, Muller-Hermelink HK, Seymour JF, Campbell LI, Horsman DE, AUvigne I, Espinos E, Siebert R, Delsol G. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood* 2003;102:2568-73.
67. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-4.
68. Pulford K, Lamant L, Espinos E, Jiang Q, Xue L, Turturro F, Delsol G, Morris SW. The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2939-53.

69. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S. Hyperphosphorylation of a novel 80kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene* 1994;9:1567-74.
70. Li R, Morris SW. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy. *Oncogene* 2008;28:372-412.
71. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999;18:4948-57.
72. Srivatsan ES, Ying KL, Seeger RC. Deletion of chromosome 11 and 14q sequences in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;7:32-7.
73. Michels E, Hoebeeck J, De Preter K, Schramm A, Brichard B, De Paepe A, Eggert A, Laureys G, Vandesompele J, Speleman F. CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23. *BMC Cancer* 2008;8:173.
74. Abel F, Ejekkar K, Kogner P, Martinsson T. Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavorable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (SSTR2) gene at 17q24. *Oncogene* 1999;18:1402-9.
75. Caron H. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavorable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1995;24:215-21.
76. Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* 1984;44:5444-9.
77. Schleiermacher G, Raynal V, Janoueix-Lerosey I, Combaret V, Aurias A, Delattre O. Variety and complexity of chromosome 17 translocations in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:143-50.
78. Godfried MB, Veenstra M, v Sluis P, Boon K, v Asperen R, Hermus MC, v Schaik BD, Voute TP, Schwab M, Versteeg R, Caron HN. The N-myc and c-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2. *Oncogene* 2002;21:2097-101.

79. Islam a, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19:617-23.
80. Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Hosoi H, Nakagawara a, Sugimoto T, Inawaza J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res* 2003;63:1876-83.
81. Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet* 1994;55:334-40.
82. Suzuki T, Yokota J, Mugishima H, Okabe I, Ookuni M, Sugimura T, Terada M. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res* 1989;49:1095-8.
83. Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matisse TC, White PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:28-31.
84. Ejeskar K, Aburatani H, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressir locus distal to the FHIT gene. *Br J Cancer* 1998;77:1787-91.
85. Hallstensson K, Thulin S, Aburatani H, Hippo Y, Martinsson T. REpresentational difference analysis and loss of heterozygosity studies detect 3p deletions in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1966-70.
86. Mosse YP, Greshock J, Margolin A, Naylor T, Cole K, Khazi D, Hii G, Winter C, Shahzad S, Asziz MU, Biegel JA, Weber BL, Maris JM. High-resolution detection and mapping of genomic DNA alterations in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:390-403.
87. Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, Hou C, Monni S, Scott RH, Asgharzadeh S, Attiyeh EF, Diskin SJ, Laudenslager M, Winter C, Cole KA, Glessner JT, Kim C, Frackelton EC, Casalunovo T, Eckert AW, Capasso M, Rappaport EF, McConville C, London WB, Seeger RC, Rahman N, Devoto M, Grant SF, Li H,

- Hakonarson H. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *N Engl J Med* 2008;358:2585-93.
88. Capasso M, Devoto M, Hou C, Asgharzadeh S, Glessner JT, Attiyeh EF, Mosse YP, Kim C, Diskin SJ, Cole KA, Bosse K, Diamond M, Laudenslager M, Winter C, Bradfield JP, Scott RH, Jagannathan J, Garriss M, McConville C, London WB, Seeger RC, Grant SF, Li H, Rahman N, Rappaport E, Hakonarson H, Maris JM. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 2009;41:718-723.
 89. Diskin SJ, Hou C, Glessner JT, Attiyeh EF, Laudenslager M, Bosse K, Cole K, Mosse YP, Wood A, Lynch JE, Pecor K, Diamond M, Winter C, Wang K, Kim C, Geiger EA, McGrady PW, Blakemore AI, London WB, Shaikh TH, Bradfield J, Grant SF, Li H, Devoto M, Rappaport ER, Hakonarson H, Maris JM. Copy number variation at 1p21.1 associated with neuroblastoma. *Nature* 2009;459:987-91.
 90. Soysal Ö, Cakir FB. Pediatrik Mediyastinal Tümörler. *Türk Toraks Dernegi Kitabı*. 2012. doi:10.5152/tcb.2012.34.
 91. Schrönherr C et. al., 'Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MTCN in neuroblastoma cells', *Oncogene* 2012; 31(50):5193-200.
 92. Azarova A.M. et al., 'Emerging importance of ALK in neuroblastoma', *Semin Cancer Biol* 2011; 21(4):267-275.
 93. Li Y. Et al., 'Functional switching of ATM: sensor of DNA damage in proliferating cells and mediator of Akt survival signal in post-mitotic human neuron-like cells.' *Chin J Cancer* 2012; 31(8): 364-372.
 94. Candy Kumps et. al. 'ETV5 regulates cell proliferation downstream of the ALK signaling pathway', *ANR 2012 conference book*, Poster presentation (POB00): p 118.
 95. Pugh, TJ et al., 'The genetic landscape of high-risk neuroblastoma', *Nat Genet* 2013; 45(3): 279-284.
 96. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD. The International Neuroblastoma Risk Group

- (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27:298-303.
97. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg, I, Hamdi M, van Nes J, Westerman BA, van Arkel J, Ebus ME, Haneveld F, Lakeman A, Schild L, Molenaar P, Stroeken P, van Noesel MM, Ora I, Santo EE, Caron HN, Westerhout EM, Versteeg R. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* 2012;483:589–593.
 98. Katia Mazzocco, Raffaella Defferrari, Angela Rita Sementa, Alberto Garaventa, Luca Longo, Marilena De Mariano, Maria Rosaria Esposito, Francesca Negri, Davide Ircol_o, Elisabetta Viscardi, Roberto Luksch, Paolo D'Angelo, Arcangelo Prete, Aurora Castellano, Paolo Massirio, Giovanni Erminio, Anna Rita Gigliotti, Gian Paolo Tonini, and Massimo Conte. Genetic Abnormalities in Adolescents and Young Adults With Neuroblastoma: A Report From the Italian Neuroblastoma Group. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:1725-1732.
 99. Hertwig F, Peifer M, Fischer M. Telomere maintenance is pivotal for high-risk neuroblastoma. *Cell Cycle* 2016;15(3):311-312.
 100. Cheung NK, Zhang J, Lu C, et al. Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients with Neuroblastoma. *JAMA* 2012;307:1062-1071.
 101. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* 2012;483:589-93.
 102. Ratner N., Brodeur G.M., Dale R.C., Schor N. 'The "Neuro" of Neuroblastoma: Neuroblastoma as a Neurodevelopmental Disorder'. *Annals of Neurology* 2016;00(00).
 103. Baggiolini A, Varum S, Mateos JM, et al. Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell* 2015; 16:314–322.
 104. Dupin E, Calloni G, Real C, et al. Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol* 2007;330:521–529.
 105. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA). Sinauer Associates, 2000; Chapter 13.

106. Monge M, Colas E, Doll A, et al.. ERM/ETV5 upregulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res* 2007; 67:6753–6759. Epub 2007/07/20.
107. Jedlicka P, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors in intestinal morphogenesis, homeostasis and disease. *Histol Histopathol* 2008; 23:1417–1424. Epub 2008/09/12.
108. Firlej V, Ladam F, Brysbaert G, et al.. Reduced tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription. *J Cell Sci* 2008; 121: 3393–3402. Epub 2008/10/02.
109. Power PF., Mak I. W. Y., Singh S, et al. ETV5 as a Regulator of Matrix Metalloproteinase 2 in Human Chondrosarcoma. *Journal Of Orthopaedic Research* 2013; 493-501.
110. Helczynska, Larsson A.M., Holmquist Mengelbier L., et al., Hypoxia-inducible factor-2alpha correlates to distant recurrence and poor outcome in invasive breast cancer, *Cancer Res.* 2008; 68: 9212e9220.
111. Hamidian A., von Stedingk K., Munksgaard Thoren M. et al., Differential regulation of HIF-1a and HIF-2a in neuroblastoma: Estrogen-related receptor alpha (ERRa) regulates HIF2A transcription and correlates to poor outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015 ; 461 : 560e567.
112. Cheung N-K V., Zhang J, Lu C. et al. Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients with Neuroblastoma. *JAMA* 2012; 307(10): 1062–1071.
113. Azarova AM, Gautam G, George RE. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 267–275.
114. S Nicolai, M Pieraccioli, A Peschiaroli, G Melino and G Raschellà. Neuroblastoma: oncogenic mechanisms and therapeutic exploitation of necroptosis. *Cell Death and Disease* 2015; 6, e2010.

115. Peifer M, Hertwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*. 2015; 526: 700–704.



8.EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

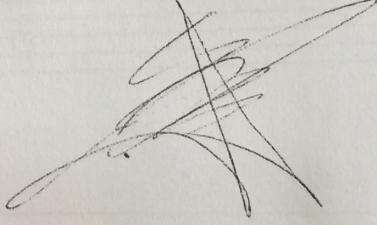

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İzmir İli Kamu Hastaneleri Birliği Güney Bölgesi Genel Sekreterliği
İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi
Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 1339918-2
TARİH : 13.11.2013
KONU : Çalışma kapsamı ile ilgili dilekçe

İlgili Makama,

Prof Dr Safiye Aktaş'ın yönetici olduğu, Ayşe Banu Demir'in sorumlu araştırmacı olduğu "*Nöroblastom moleküler temelinin klinik öneminin araştırılması*" isimli çalışma, 26.09.2013 tarihli, 1339918 Etik Kurul sayılı olarak kurulumuzda görüşülmüş ve etik kurul izni almıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans öğrencisi Ayşe Banu Demir'in yüksek lisans tezi olarak çalışılacak olan '*Nöroblastom moleküler temelinin klinik öneminin araştırılması: yüksek risk grubu, yüksek risk ve ultra-yüksek risk grubu olarak sınıflandırılabilir mi?*' isimli araştırma bu etik kurul onayının kapsamında yer almaktadır.

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı
Uz. Dr. Aysel ÖZTÜRK





T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İzmir İli Kamu Hastaneleri Birliği Güney Bölgesi Genel Sekreterliği
İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi
Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 1339918/ Etik Kurul
TARİH : 26.09.2013 / 48
KONU : Etik Kurul Başvuruları

Sayın Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

"Nöroblastom moleküler temelini klinik öneminin araştırılması" isimli araştırmanız 26.09.2013 tarihinde İzmir BUÇH Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na görüşülmüş, ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

Çalışmanızın durumunu yılda bir "*Klinik Araştırma İçin Etik Kurula Yapılan Yıllık Bildirim Formu*" ile bildirmeniz, fakat çalışmanızın erken bitmesi durumunda araştırmanızın özeti ile beraber "*Klinik Araştırmanın Sona Erdiğine İlişkin Etik Kurula Yapılan Bildirim Formu*" nu doldurarak İzmir Dr Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na bildirmenizi rica ederim.

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı
Uz. Dr. Aysel ÖZTÜRK

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	BUÇ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
AÇIK ADRES	Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi İsmet Kaptan Mah. Sezer Doğan Sok. No:1135210 KonaklıZMİR
TELEFON	0232 4418207 / 0232 4116433
FAKS	0232 4418207
E-POSTA	Buch.etikkurul@gmail.com-4noluetikkurul@gmail.com
ARŞİV NO	2013 / 44

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nöroblastom moleküler temelinin klinik öneminin araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANIADISÖYADI	Prof.Dr.Safiye Aktaş
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Patoloji, Temel Onkoloji
	KOORDİNATÖRÜN UNVANIADISÖYADI	
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Balcova-İzmir
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Geliştirme Fonu
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Geliştirme Fonu
	UZMANLIK TEZİ(AKADEMİK AMAÇLI)	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☒ Yüksek Lisans Tezi
		DİĞER ☐ Diğer ise belirtiniz:
		İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA ☒ Belirtiniz:
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☐ ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	BİLGİLENDİRME FORMU	18.09.2013		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BAŞVURU FORMU	18.09.2013		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18.09.2013		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	18.09.2013		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ÖZGEÇMİŞLER	18.09.2013		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	HELSINKİ BİLDİRGESİ	☒	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
	SİGORTA	☐	
	HASTA KARTI(SINI ÖKLERİ)	☐	
	ILAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	DİĞER	☐	

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:	Tarih: 26.09.2013
	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Nöroblastom moleküler temelinin klinik öneminin araştırılması" isimli başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplanmış olan Etik Kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kravuzu, ve Etik Kurul SOP
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Uzm. Dr. Aysel ÖZTÜRK
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Kabul **	İmza
Uz. Dr. Aysel ÖZTÜRK	Çocuk Hast. , Çocuk Nörolojisi	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Müniver HOŞGÖR	Çocuk Cerrahisi	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. İkar DEVRİM	Çocuk Enfeksiyon Hast.	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mukadder YASA	Eczacılık	Ege Üniversitesi Eczacılık Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Safiye AKTAŞ	Patoloji, Temel Onkoloji Doktoru	Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enst.	E ☐ K ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☒	XXXXXXXXXX
Prof. Dr. Cenk CAN	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Özlem YILMAZ	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Demet CAN	Çocuk Allerji Hast.	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Türkan GÜNAY	Halk Sağlığı	Dokuz Eylül Üniversitesi Halk Sağlığı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Sertap ARSLANOĞLU	Pediyatri Neonatoloji	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Çigdem ECEVİT	Çocuk Gastroent.Hepatoloji ve Beslenme Uzm.	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Uz. Dr. Murat SONGU	Kulak Burun Boğaz Hastalıkları	Atatürk EAH KBB	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Baki OKAN	Avukat	Serbest	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Göksel AYTAÇ	Fizik Mühendisi	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile ilişki

** :Toplantıda Bulunma

8.2. Özgeçmiş

TC Kimlik No / Pasaport No:	10922381804
Doğum Yılı:	1984
Yazışma Adresi :	6525 sok. No:27 Yalı Mahallesi Albayrak 1 Sitesi B2/34 Mavişehir, Karşıyaka 35540 İzmir/Türkiye
Telefon :	
e-posta :	banudemir84@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Doktora	2015
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Yüksek Lisans	2009
Türkiye	İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Lisans	2007

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

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

İzmir Ekonomi Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP FAKÜLTESİ	Yrd. Doç. Dr.	2016-
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP FAKÜLTESİ	Araştırma Görevlisi	2012-2016

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları	
Kanser Moleküler Biyolojisi , Genetik Mühendisliği , Genomiks	
maya,yaşlılık,antioksidan genler,elektron taşıma zinciri,kanser ilaç dirençliliği,kanser	

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Poster Bildiri Birincilik Ödülü (D.E.U. Yüksek Lisans Tez Çalışması)	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu-19. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi	2016
Sözel Bildiri Birincilik Ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu-19. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi	2016
Pediatrik Onkoloji Araştırma Poster Ödülü	Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği-19. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi	2016
Sözel Bildiri Ödülü	21. Ulusal Kanser Kongresi	2015

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Demir, Ayşe Banu;Koç,Ahmet, High-Copy Overexpression Screening Reveals PDR5 as the Main Doxorubicin Resistance Gene in Yeast, 2015, PLoS One
Molin, Mikael; Demir, Ayşe Banu, Linking Peroxiredoxin and Vacuolar-ATPase Functions in Calorie Restriction-Mediated Life Span Extension, 2014, International Journal of Cell Biology
Hacioglu, Elise;Demir, Ayşe Banu;Koç,Ahmet, Identification of respiratory chain gene mutations that shorten replicative life span in yeast, 2011, Experimental Gerontology

Demir, Ayşe Banu ; Koç, Ahmet, Assessment of chronological lifespan dependent molecular damages in yeast lacking mitochondrial antioxidant genes, 2010, Biochemical Biophysical Research Community

Diğer yayınlar

The Field of Biological Aging: Past, Present and Future, Protein Oxidation and repair mechanisms in aging, ISBN: 978-81-7895-513-1, 2011

Düzenleme Tarihi :14/05/2016

