T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nöroblastom Olgularında Edinsel PHOX2B Mutasyonlarının Saptanması ve Tümör Davranışı ile Birlikteliğinin Araştırılması

HASAN ONUR ÇAĞLAR

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

DEU.HSI.MSc-2008970066

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nöroblastom Olgularında Edinsel PHOX2B Mutasyonlarının Saptanması ve Tümör Davranışı ile Birlikteliğinin Araştırılması

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HASAN ONUR ÇAĞLAR

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından KB. SAG.2009.086 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008970066

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programı öğrencisi H. Onur ÇAĞLAR 'Nöroblastom Olgularında Edinsel *PHOX2B* Mutasyonlarının Saptanması ve Tümör Davranışı ile Birlikteliğinin Araştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini …….tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

ÜYE ÜYE

ÜYE ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....i

TABLO DİZİNİ.....ii

ŞEKİL DİZİNİ.....iv

KISALTMALAR.....vii

ÖZET.....1

ABSTRACT.....2

1. GİRİŞ VE AMAÇ……..3

2. GENEL BİLGLER…….5

3. GEREÇ VE YÖNTEM ……16

3.1. Araştırmanın tipi ……...16

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı …….16

3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemi ...……16

3.4. Çalışma materyali ……16

3.5. Veri toplama araçları ……17

3.8. Araştırma planı ……..47

3.9. Verilerin değerlendirilmesi……48

3.10. Etik Kurul Onayı…….....55

3.11. Araştırmanın Sınırlılıkları.……...……55

4. BULGULAR…….57

5. TARTIŞMA……..69

6. SONUÇ VE ÖNERİLER ……...72

7. KAYNAKLAR …… 73

8. EKLER ……...……80

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1 1-8 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları……...18

Tablo 2 9-60 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları…….....19

Tablo 3 61-128 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları…….20

Tablo 4 129-176 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları……...21

Tablo 5 Optimizasyon öncesi 25 µl ve 50 µl'lik reaksiyonda önerilen bileşen miktarları ……....25

Tablo 6 *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunun optimize edilen PCR bileşenleri ve reaksiyonun termal profili ……..26

Tablo 7 *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunun optimize edilen PCR bileşenleri ve reaksiyonun termal profili……...29

Tablo 8 *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunun optimize edilen PCR bileşenleri ve reaksiyonun termal profili ……..…31

Tablo 9 Q-PCR reaksiyonunda 20 µl hacimde önerilen bileşen miktarları ……..42

Tablo 10 Q-PCR reaksiyonunda her bir primer çifti için gerçekleştirilen reaksiyon ve **"**melting curve" analizi koşulları ……..43

Tablo 11 Araştırmanın ön görülen çalışma süresi ……47

Tablo 12 1p Delesyonu varlığı bilinen olgularından elde edilen kopya sayısı verileri …52

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 13 İşitme kaybı hastalarına ait periferik kandan izole edilmiş diploid kopya sayısına sahip DNA materyalinden elde edilen Q-PCR sonuçları ……..53

Tablo 14 17q artışı varlığı bilinen olgularından elde edilen kopya sayısı verileri ……...54

Tablo 15 Olguların nöroblastik tümör tiplerine göre yüzdesel olarak dağılımı ……...57

Tablo 16 Olguların cinsiyet üzerindeki dağılımı ……57

Tablo 17 Olguların yaşa göre yüzdesel dağılımı ……58

Tablo 18 *MYCN* geni amplifikasyonunun olgulardaki yüzdesel dağılımı ……..58

Tablo 19 Nöroblastoma tanılı olgularda evrelerin yüzdesel olarak dağılımı …….…….59

Tablo 20 *PHOX2B* gen ekzonlarında saptanan nükleotid değişimlerinin amino asit dizisi üzerindeki etkisi ve olguların tanı/evre durumu ..……65

Tablo 21 39-97 numaralı olgular arasında saptanan *PHOX2B* gen kopya sayısı ……...66

Tablo 22 98-154 numaralı olgular arasında saptanan *PHOX2B* gen kopya sayısı …….67

Tablo 23 156-176 numaralı olgular arasında saptanan *PHOX2B* gen kopya sayısı ..…68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: *MYCN* ifadesinin indüklenmesi sonucunda NB tümör oluşumunun basitleştirilmiş şematize diagramı ……7

Şekil 2 *PHOX2B* geninin dördüncü kromozom üzerindeki lokalizasyonu ……..8

Şekil 3 *PHOX2B* proteininin üç boyutlu homeodomain modeli ……..9

Şekil 4 *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunda primerlerin eşleştiği dizilerin ve protein kodlayan bölgenin gösterimi ……..…….22

Şekil 5 *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunda primerlerin eşleştiği dizilerin ve protein kodlayan bölgenin gösterimi ……..…….23

Şekil 6: *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunda primerlerin eşleştiği dizilerin ve protein kodlayan bölgenin gösterimi ……..23

Şekil 7 *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunun $MgCl_2$ optimizasyon deneyi Jel görüntüsü ……..……..……..27

Şekil 8 *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunun "annealing" optimizasyon deneyi jel görüntüsü ……..28

Şekil 9: 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu ve 58 C^o "annealing" sıcaklığının uygulandığı PCR reaksiyonundan elde edilen ürünler ……29

Şekil 10 *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunun $MgCl_2$ optimizasyon deneyi jel görüntüsü ……..30

Şekil 11: *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunun "annealing" optimizasyon deneyi jel görüntüsü……..31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 12: *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunun $MgCl_2$ optimizasyonu deneyi jel görüntüsü …….32

Şekil 13 *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunun "annealing" optimizasyon deneyi jel görüntüsü …….33

Şekil 14: Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen koşulların olgu üzerine uygulandığı PCR reaksiyonu (ekzon 1) sonucu elde edilen jel görüntüsü ……..……36

Şekil 15: Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen koşulların olgu üzerine uygulandığı PCR reaksiyonu (ekzon 2) sonucu elde edilen jel görüntüsü …….36

Şekil 16: Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen koşulların olgu üzerine uygulandığı PCR reaksiyonu (ekzon 3) sonucu elde edilen jel görüntüsü……..37

Şekil 17 *PHOX2B* geninde Q-PCR reaksiyonu için primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi …….……39

Şekil 18 *MAG* geninde Q-PCR reaksiyonu için primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi …….40

Şekil 19: *SULF2* geninde Q-PCR reaksiyonu için primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi …….40

Şekil 20: *CHD5* geninde Q-PCR reaksiyonu için primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi ……....40

Şekil 21: *TOB1* geninde Q-PCR reaksiyonu için primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi …….40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 22 *CHD5* , *TOB1*, *PHOX2B* ve *MAG* genleri için oluşturulan standart eğri grafikleri ve E değerleri …….……....44

Şekil 23 *SULF2* geni için oluşturulan standart eğri grafiği ve E değeri ……45

Şekil 24 *CHD5*, *TOB1, PHOX2B, MAG* ve *SULF2* genlerine ait "melting curve" pikleri ……45

Şekil 25 Pozitif kontrol ve olgu grubu için hazırlanan "well-plate" kurgusu ……...46

Şekil 26 Normalizasyon faktörünün hesaplanması ve hedef gen için elde edilen relatif kantifikasyon değerinin referans genler ile normalize edilmesi ……50

Şekil 27 75 numaralı olgularda gözlenen c.96G>A nükleotid değişimi……60

Şekil 28 9 ve 99 numaralı olgularda gözlenen c.552C>T nükleotid değişimi ……..……61

Şekil 29 43 ve 47 numaralı olgularda gözlenen heterozigot, 148 numaralı olguda gözlenen homozigot c.762A>C nükleotid değişimi …….62

Şekil 30 60 numaralı olguda gözlenen 18 bp'lik heterozigot delesyon ……63

Şekil 31 110 numaralı olguda gözlenen 39 bp'lik heterozigot delesyon ……..64

KISALTMALAR

NB……..Nöroblastom
CCHS…… Konjenital Santral Hipoventilasyon Sendromu
FISH…….. Florosan in situ hibridizasyon
CGH…….. Karşılıklı genomik hibridizasyon
bHLH-LZ…….. helix-loop-helix/leucine zipper motifi
SRO…….. Delesyonda gözlenen en küçük yitim bölgesi
Del…… Delesyon
bp……. Base pair (nükleotid çifti)
PCR ……. Polimeraz zincir reaksiyonu
ve ark…… et. al
HPLC…… Yüksek performanslı sıvı faz kromatografi
DMSO…….. Dimetil sülfoksit
TBE tamponu …….. Tris-Borik asit EDTA tamponu
SNP…….. Tek nükleotid polimorfizmi
ab1……... ABI otomatize sekans cihazı dosya uzantısı

Nöroblastom Olgularında Edinsel *PHOX2B* Mutasyonlarının Saptanması ve Tümör Davranışı ile Birlikteliğinin Araştırılması

Hasan Onur ÇAĞLAR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Nöroblastom (NB) genellikle sporadik olarak ortaya çıkan yaygın bir çocukluk çağı tümörüdür. Klinik yönden son derece heterojen özellikler gösteren bu tümörlerde bir dizi edinsel genetik değişiklikler tanımlanmıştır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda NB patogenezinde rol oynadığı bilinen tek gen *MYCN* onkogenidir. Sempatik sinir sisteminin gelişiminde rol oynayan genlerden biri olan homeobox transkripsiyon faktörü *PHOX2B*'dir. Konjenital Santral Hipoventilasyon Sendromu (CCHS) etkenlerinden birinin *PHOX2B* geni mutasyonu olduğu saptanmıştır. *PHOX2B* mutasyonu taşıyan CCHS tanılı kişilerde NB oluşumunun gözlenmesi, *PHOX2B* geninde meydana gelen mutasyon ya da mutasyonların NB oluşumunda etkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, edinsel *PHOX2B* mutasyonlarının saptanması bununla birlikte tümör davranışı ile *PHOX2B* mutasyonları arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *PHOX2B* geninin tüm ekzonlarının dizi analizi 114 NB, 7 ganglionöroblastom ve 7 ganglionörom tümör örneğinde yapılmıştır. Mutasyon analizi sonrasında bir NB olgusunda daha önce saptanmayan ve amino asit değişimine neden olan c.96G>A (D32N) nükleotid değişimi tanımlanmıştır. Ayrıca, 3 numaralı ekzonda polialanin kodlayan dizide 18 (c.1101_1118het-del18) ve 39 nükleotidlik (c.1098_1136het-del39) delesyonlar NB ve ganglionörom olgularında saptanmıştır. İki farklı tek nükleotid değişimi (c.552C>T, c.762A>C) 5 farklı NB tümör örneğinde gözlenmiştir. *PHOX2B* mutasyonları NB olgularında nadir bir şekilde ve histolojik olarak olgun tümör fenotipinde gözlenmektedir. Saptanan mutasyonların anlamlı prognostik etkisi yoktur. Polialanin bölgesinde meydana gelen delesyonlar *PHOX2B* proteinin üç boyutlu yapısında değişime neden olarak fonksiyonu etkilemesi sonucu NB oluşabilir.

Anahtar kelimeler: Nöroblastom, *PHOX2B*, Somatik Mutasyon

Detection of Sporadic *PHOX2B* Gene Mutations and Association of Tumor Behavior in Neuroblastomas

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) which typically occurs spontaneous is the most common childhood tumors. These tumors shows heterogeneous clinical signature and some genetic variations are identified in these tumors. Only *MYCN* gene with a causative role in neuroblastoma pathogenesis has been identified. The Phox2B homeobox transcription factor functions in the differentiation of the sympatho-adrenal lineage. Ondine's Curse (CCHS) was recently found to result from *PHOX2B* mutations and two such patients in addition developed neuroblastoma. However we think that *PHOX2B* mutation or mutations lead to occur NB tumors. Our study aims to detect sporadic *PHOX2B* gene mutation at neuroblastoma tumor and other neuroblastic tumors. DNA sequence analyses of all *PHOX2B* exons were performed in 114 NB, 7 ganglioneuroblastoma, and 7 ganglioneuroma tumor samples. Mutation analyses revealed a novel mutation of c.96G>A (D32N) in exon 1 in a NB case. In addition, c.1101_1118het-del18 and c.1098_1136het-del39 deletions in exon 3, encodes polyalanine tract, were detected in NB and ganglioneuroma cases, respectively. Both of these deletions are previously undefined in terms of its size and reading frame. Two different SNP's (c.552C>T, c.762A>C) were present in five NB samples. *PHOX2B* mutations are rare in NB's and can be observed in fully differentiated histologic subtypes. Presence of *PHOX2B* mutation in tumor with maturation suggests that it is prognostically insignificant. Since deletion of polyalanine tract changes the three dimensional structure of *PHOX2B* and thus affects its function, its inactivating mutations may contribute to NB development.

Keywords: Neuroblastoma, *PHOX2B*, somatic mutations

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöral krest hücrelerinden köken alan nöroblastom (NB) genellikle sporadik olarak ortaya çıkan ekstra-kranial bir pediatrik tümörüdür. NB çeşitli klinik ve biyolojik özellikler gösteren, çok sayıda bilinmeyeni olan bir tümördür. Klinik yönden son derece heterojen özellikler gösteren bu tümörlerde bir dizi edinsel genetik değişiklik tanımlanmıştır ve bunlardan bazılarının, tedavi yanıtı da dahil tümör davranışıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu tümörler, apoptoz ya da farklılaşma sürecinin etkinleşmesine bağlı olarak kendiliğinden gerileyebildiği gibi; oldukça düşük sağaltım başarısı olan olgularda son derece malign davranış da sergileyebilir. Konvansiyonel ve moleküler sitogenetik çalışmalar, nöroblastom klinik fenotipi ile birliktelik gösteren genomik dengesizlikleri ve kromozom anomalilerini ortaya çıkartmıştır. Bu anomalilerden 1p delesyonu, 11q delesyonu, 14q delesyonu ve 17q kazanımı tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Belirlenen bu kromozomal anomaliler NB tümörlerinde tek başına bağımsız prognostik etki gösterebildikleri gibi, birliktede prognoza etki edebilmektedir. Ayrıca tanımlanmış 2q, 3p, 4p, 9p, 16p ve 19q delesyonları gibi kromozomal anomaliler tümör prognozu ile ilişkilendirilememiştir. *MYCN* geni dışında diğer tümörlerde tanımlanan hiçbir proto-onkogenin ya da tümör süpresör genin NB'de değişimi tanımlanamamıştır. NB'de reküran olarak gözlenen kromozomal delesyon bölgelerinde tümör süpresör genlerin bulunabileceği öngörülmüştür. Ancak, reküran delesyon bölgelerinde ikili vuruş ("double hit") modeli ile uyumlu bir gen saptanmamıştır. Tümörde meydana gelen kromozomal anomalilerin yanı sıra tümörün kromozom seti sayısı da prognozu etkileyen önemli bir faktördür. Bazı NB olgularında tanımlanmış bir evrede tümörün triploid kromozom setine sahip olması olgu için düşük risk oluşturur iken aynı evrede olan başka bir tümörün diploide yakın veya tetraploid kromozom seti sayısına sahip olması yaşa bağlı olarak yüksek risk oluşturabilmektedir.

Sempatik sinir sisteminin gelişimi sürecinde farklılaşmada rol oynayan genlerden biri homeobox transkripsiyon faktörü olan *PHOX2B* genidir. Phox2B transkripsiyon faktörü nöral krest hücrelerinden adrenal medullada kromafin hücrelerinin farklılaşmasında rol oynamaktadır. Farklılaşma süreci içersinde *PHOX2B* geni (nor)adrenalin sentez yolağında görev alan genlerin aktivasyonunu sağlar ve bu genler "Dopamin Beta Hidroksilaz" sentezini gerçekleştirir.

Bu sentez yolağının normal bir şekilde çalışması nöral krest hücrelerinin adrenal medullada kromafin hücrelerine bununla birlikte sempatik sinir sisteminde adrejenik fenotipe sahip nöron hücrelerine farklılaşmasını sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda "Konjenital Santral Hipoventilasyon Sendromu" (CCHS) etkenlerinden birinin *PHOX2B* geni mutasyonu olduğu ve *PHOX2B* mutasyonu taşıyan CCHS tanılı kişilerde NB oluşumu gözlenmesi *PHOX2B* geninde meydana gelen mutasyon ya da mutasyonların NB oluşumunda etkili olabileceğini düşündürmektedir. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar ile gerek kalıtsal gerekse sporadik NB olgularında *PHOX2B* geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir.

H1: *PHOX2B* genindeki olası sporadik mutasyonların saptanarak NB olgularında nasıl bir rol oynadığı çalışmanın başlıca amaçlarından biridir.

H2: Gelişim süreci boyunca *PHOX2B* geni hücre poliferasyonunu hem baskılayabilen hem de arttırabilen sinyal yolakları ile ilişkili olduğu için tümör oluşumunda nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir. Tümör oluşumu sürecinde rol oynayan genlerin bir alelinde meydana gelen mutasyon ile birlikte diğer alelin delesyon veya başka bir mutasyon ile inaktif hale gelmesi sonucunda genler tümör süpresör olarak etki göstermektedir. Bununla birlikte yalnızca bir allelde meydana gelen mutasyon gen ürününde haploid yetersizliğe (fonksiyonel protein miktarının yeterli olmaması), dominant negatif etkiye ya da söz konusu mutasyonun etkisi ile oluşan proteinin yeni bir fonksiyon kazanması (gain of function) gibi farklı şekillerde etki mekanizmaları bilinmektedir. Genin tek allelinde meydana gelen mutasyonların oluşturabileceği bu etkiler genin tümör oluşumunda onkogen olarak davranabileceğini ön görmektedir. Bu tez kapsamında nicel PCR (QPCR) ile *PHOX2B* gen kopya sayısı saptanarak olası mutasyonlar ve gözlenebilecek gen kopya sayısı değişimi ile NB oluşumunda nasıl bir etki mekanizmasının (tümör süpresör veya onkogen) olduğunun saptanması hedeflenmiştir.

H3: Sporadik NB olgularında tümör davranışı ile olası *PHOX2B* mutasyonları arasında ne tür bir ilişki olduğu ise olgu verileri ile yapılacak olan değerlendirme sonucu ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nöroblastom ve Genetik Parametreler

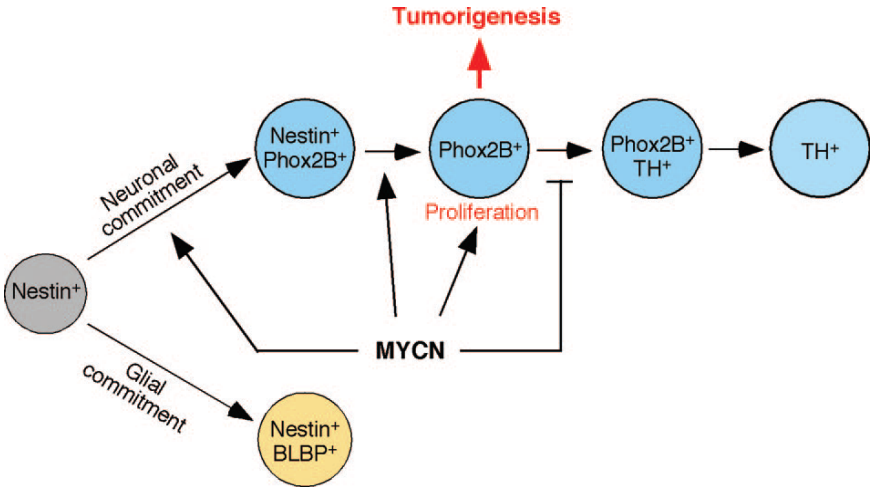
Nöroblastom (NB), sempatik sinir sistemine ve adrejenik hücre tipine farklılaşan nöral krest hücrelerinden köken alan bir tümördür. Bu nedenle sempatik sinir sisteminin gelişim göstereceği herhangi bir yerde oluşum gösterebilmektedir. Primer olarak ortaya çıkan tümörlerin yaklaşık % 65'i abdominal bölgede meydana gelir iken bunların yarısı adrenal medullada gözlenmektedir. Primer tümörlerin gözlendiği diğer anatomik yerleşimler çoğunlukla boyun, göğüs ve pelvis bölgesidir (1). NB çeşitli klinik ve biyolojik özellikler gösteren, çok sayıda bilinmeyeni olan bir tümördür. Klinik yönden son derece heterojen özellikler gösteren bu tümörlerde bir dizi edinsel genetik değişiklik tanımlanmıştır ve bunlardan bazılarının, tedavi yanıtı da dahil tümör davranışıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (2). Bu tümörler, apoptoz ya da farklılaşma sürecinin etkinleşmesine bağlı olarak kendiliğinden gerileyebildiği gibi; oldukça düşük sağaltım başarısı olan olgularda son derece malign davranış da sergileyebilmektedir (3).

Konvansiyonel ve moleküler sitogenetik çalışmalar, NB klinik fenotipi ile birliktelik gösteren genomik dengesizlikleri ve kromozom anomalilerini ortaya çıkartmıştır (4). NB'de saptanan ilk tutarlı kromozomal değişim 1 numaralı kromozomun kısa kolunun delesyonu olarak tanımlanmıştır (5). Tümör biyolojisine yönelik olarak yapılan çalışmalarda NB olgularının yaklaşık % 35'inde değişken boyutlu olarak 1p delesyonu meydana geldiği tespit edilmiştir (6-8) . Bir numaralı kromozomda farklı boyutlarda meydana gelen delesyonlarda en küçük yitim bölgesinin ise 1p36 bandı olduğu bildirilmiştir (8-11). Bunula birlikte 1p delesyonu NB tümörlerinde tek başına kötü prognozla ilişkili olmadığı gibi delesyon ileri prognoza *MYCN* geni amplifikasyonu ve diğer genetik parametreler ile birlikte etki etmektedir (12, 13).

NB olgularında gözlenen bir diğer kromozomal anomali ise olgularınn yaklaşık % 41'inde gözlenen 11q delesyonudur (14). Dengesiz translokasyon sonucu meydana gelen 11q bölgesi kaybı ise olgularda % 22 oranında gözlenmektedir (14). 11 numaralı kromozomun tümünün kaybı prognozu etkilememektedir ancak dengesiz bir translokasyon sonucu meydana gelen 11q delesyonu tek başına kötü prognoza neden olabilmektedir (14, 15).

MYCN geni amplifikasyonu gözlenmeyen ileri evre NB olgularının % 50'sinden fazlasında 11q delesyonunun varlığı bildirilmiştir (16). Florosan in situ hibridizasyon (FISH) ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) gibi yöntemlerin uygulandığı çalışmalarda 1p delesyonu ve 11q delesyonu dışında NB prognozuna etki eden diğer kromozomal anomalilerin varlığı bildirilmiş ve 17q bölgesinde gözlenen kazanımın agresif tümör prognozu ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (17). 17q artışının ya da 17 numaralı kromozomun tüm kazancının primer tümörler içersinde diğer kromozomal anomalilere göre daha fazla gözlendiğine dikkat çekilmiştir (18). Özellikle 17q kolunda meydana gelen kazınım tek başına kötü prognozun oluşumunda ekili olduğu gösterilmiştir (19). Bu bölge survivin geninide içersine alan 17q21- qter'e kadar uzanmaktadır (17). NB'de tanımlanmış ve reküran olarak gözlenen kromozomal delesyon bölgelerinde tümör süpresör genlerin bulunabileceği öngörülmüştür. Ancak, şu ana kadar yapılan çalışmalarda reküran delesyon bölgelerinde ikili vuruş ("double hit") modeli ile uyumlu hiç bir gen saptanmamıştır.

NB'de *MYCN* geni dışında diğer tümörlerde tanımlanan hiçbir proto-onkogenin ya da tümör süpresör genin rolü tanımlanamamıştır. *MYCN* gen ürünü olan MYCN kısa yarı ömre sahip nüklear fosfoproteindir (20). MYCN proteini N-terminal transaktivasyon domaini (Myc box) ve C-terminal bölgesinde helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH-LZ) motifi bulundurmaktadır (20). *MYCN* gen ürününün aktif olarak transkripsiyonda görev alabilmesi için Max proteini ile dimerize olması gerekmektedir (21). NB olgularında gözlenen amplifikasyona bağlı olarak meydana gelen NMYC proteinindeki artış Max ile heterodimer oluşturmasına böylece hücre döngüsü içersinde bölünmeyi sağlayan genlerin ifadesindeki artışa neden olmaktadır (21). *MYCN* geni amplifikasyonu NB tümörlerinde yaklaşık %25-30 oranında gözlenir iken ileri evre olguların % 50'sinde gözlenebilmektedir (22). *MYCN* geni amplifikasyonunun gözlendiği olgular klinik olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (23). Tirozin hidroksilaz (TH) promotörünün *MYCN* geni ifadesini düzenlediği transgenik fare modeli (TH-MYCN) ile yapılan bir çalışmada *MYCN* geni ile *PHOX2B* geni arasındaki ilişkinin NB tümör oluşumunda rol oynadığını göstermiştir (24). Sempatik sinir sisteminde TH ifadesinin gözlendiği adrejenik fenotipe sahip hücrelerde *MYCN* geni ifadesine bağlı olarak tümör oluşumu gözlenmiştir (24). Oluşturulan deney modelinde NB oluşumu erken postnatal gangliada hiperplastik lezyon olarak gözlenmekle birlikte ilerleyen evrede oluşan primer tümörün $PHOX2B^{+}$ hücrelerden köken aldığı belirlenmiştir (24).



Şekil 1: *MYCN* ifadesinin indüklenmesi sonucunda NB tümör oluşumunun basitleştirilmiş şematize diagramı (Alam G, Cui H, Shi H et al. MYCN promotes the expansion of Phox2B-positive neuronal progenitors to drive neuroblastoma development. Am J Pathol 2009: 175: 856-866)

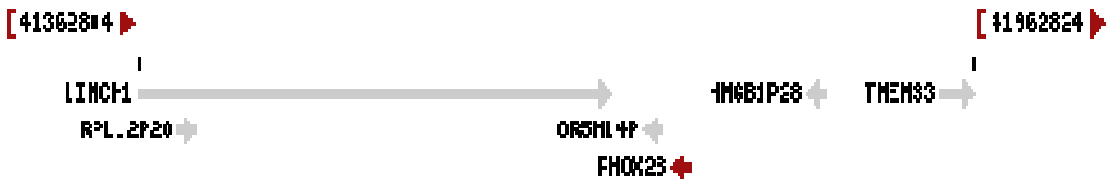
SK-N-DZ, BE(2)-C ve SK-N-AS gibi NB kökenli hücre hatlarından oluştrulan "xenograft" tümör örneklerinde ise *PHOX2B* gen ifadesinin *MYCN* geni amplifikasyonundan bağımsız olarak ortak bir özellik şeklinde kendini göstermektedir (24). Adrejenik fenotipe bağlı olarak gerçekleşen *MYCN* geni ifadesinin *PHOX2B*$^{+}$ öncül nöronal hücrelerde tümör oluşumunu tetiklemesi oldukça ilginçtir.

NB prognozuna ve oluşumuna etkisi olduğu belirlenen kromozomal anomaliler ve *MYCN* geni amplifikasyonuna ek olarak prognoz ile ilişkilendirilemeyen 2q, 3p, 4p, 9p ve 19q delesyonları gibi farklı kromozomal anomalilerde saptanmıştır (25-28). Dört numaralı kromozomun kısa kolu üzerinde meydana gelen delesyon NB olgularında %20-29 oranında gözlenmekle birlikte delesyon varlığının tümör prognozuna olan etkisi tam olarak anlaşılamamıştır (29). Delesyonda gözlenen en küçük yitim bölgesi (SRO) ise p16 bandı olarak belirlenmiştir (26). Sporadik olgularda gözlenen 4p delesyonunun kalıtımsal olarak aktarıldığı bildirilmiş ve p16 bölgesinde yer alan genlerin NB olgularında tümör süpresör olarak davranabileceği ön görülmüştür (26, 29).

de Pontual ve ark.'nın 13 NB hücre hattı ve 45 primer tümör örneği üzerinde yapmış oldukları çalışmada *PHOX2B* gen ifade farklılığının promotör bölgedeki metilasyon örüntüsüdeki değişim ve allel kaybına bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir (30). Hücre hattı ve primer tümörlerin tamamında % 10 oranında gözlenen *PHOX2B* gen allel kaybı ve saptanan mutasyonlar ikili vuruş hipotezi ile ilişkilendirilememiştir (30). 34 NB olgusunu kapsayan başka bir çalışmada her iki adrenal medullada bilateral NB tümör oluşumu gözlenen ve *PHOX2B* geninde c.28A>G mutasyonu (N10S) saptanan olguda, genin diğer allelinde kayıp olduğu bildirilmiştir (31). Saptanan mutasyonun anneden aktarılması ile birlikte diğer allelinin kaybı, NB oluşumunda *PHOX2B* geninin tümör süpresör olarak davranabileceğini ön görmüştür (31).

2.2 Bir Gen Olarak *PHOX2B*

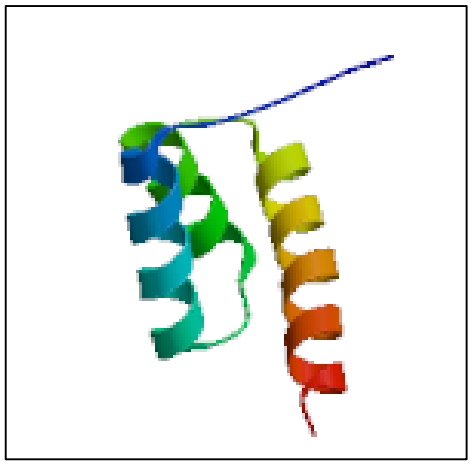
PHOX2B geni *Homo sapiens*'de 4p12 bölgesinde yerleşim göstermektedir. Bu gen 314 amino asitlik ve filogenik olarak birbirlerinden uzak türler arasında korunmuş homeodomeini içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır (http://www.ncbi .nlm.nih.gov/gene/8929). Homoedomain yapısı transkripsiyon faktörünün özgül olarak DNA dizisine bağlanmasını gerçekleştirmektedir (32). "Homeodomanin" bağlandığı DNA dizilerinin bir çoğu 5'TAAT'3 dizi motifini bulundurmaktadır (33). PHOX2B transkripsiyon faktörü ökaryotlarda kendi gen ifadesini promotör bölgesine bağlanarak kendi düzenleyebilmektedir (34). *PHOX2B* gen ifadesinin kendisi tarafından düzenlenebilmesi için nüklear konsantrasyon düzeyinin önemli olduğu vurgulanmıştır (34). *PHOX2B* gen ürününde "homeodomeine" ek olarak 9 ve 20 amino asitlik olmak üzere iki adet polialanin kodlayan bölge bulunmaktadır (http://www.ncbi .nlm.nih.gov/gene/8929).



Şekil 2: *PHOX2B* geninin dördüncü kromozom üzerindeki lokalizasyonu (http://www.ncbi .nlm.nih.gov/gene/8929)

Adrenal medulladaki kromafin hücreleri ayrıca sempatik sinir sisteminde bulunan ganglia ve nöron hücreleri nöral krestten köken alan sempato-adrenal öncüller trafından meydana gelmektedir (35-37). (Nor)Adrenalin sentezi ve nörogenezde *MASH1*/*PHOX2A* /*PHOX2B* genleri temeli oluşturur iken *PHOX2B*, *SOX10* ve dorsal aorta boyunca sentezlenen *BMP4* geninin kontrolünde geçici bir şekilde sentezlenir (38). *PHOX2B* geninin homoloğu olan *PHOX2A* ve *PHOX2B* gen ürünleri homeodomein bakımından eş olmalarına karşın proteinler N-terminal ve C-terminal bölgeleri bakımından farklılık göstermektedir.

Promotör dizisi üzerinde yapılan çalışmalarda *PHOX2A* geninin dopamin beta-hidroksilaz sentezinde transkripsiyon faktörü olarak görev aldığını göstermiştir (39). *PHOX2A* promotör bölgesinde yapılan çalışmalar ile *PHOX2B*'nin *PHOX2A* gen ifadesini uyardığı bilinmektedir (40). *MASH1* gen ifadesine bağlı olarak *PHOX2A* ve *MASH1* gen ifadesinden bağımsız olarak ifade edilen *PHOX2B* geni periferik sinir sisteminde (nor) adrejenik nöron hücrelerinin oluşumunda önemli bir role sahiptir (38, 41). "Knock out" çalışmalarda *PHOX2B* geninin homozigot yokluğu enterik, sempatik ve parasempatik ganglia oluşumunda defektlere neden olmuştur (42-44). "Catecholamines" metabolizması için gerekli olan bu iki enzimin sentezlenmesini *PHOX2B* direkt veya indirekt olarak indüklemektedir (45).



Şekil 3: *PHOX2B* proteininin üç boyutlu homeodomain modeli (EMBI swiss-prot database) (46-48)

Nöral krest düzenleme ağı ile birlikte göç eden hüclerin sempatik sinir sistemi, enterik ganglia ve merkezi sinir sisteminde yer alan nöron hüclerine farklılaşmasında *PHOX2B* geni diğer genler ile birlikte rol oynamaktadır (49-53). Hücre poliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan *RET* geni enterik ganglia oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (54, 55). *RET* geni promotörü üzerinde yapılan bir çalışmada genin *PHOX2B* tarafından ifadesinin gerçekleştiği bulunmuştur (56). Bununla birlikte enterik ganglia oluşumunda rol oynadığı belirlenen *NKX2.1* geninin *PHOX2B* ile birlikte *RET* gen ifadesini önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (56). Fare embriyosunda 9.5 ile 13.5 günler arasında geçici olarak ifade edilen *TLX2* geninin noral krestten köken almış dorsal root ganglia, kranial sinir ganglia, sempatik ve enterik gangliada ifade edildiği bilinmektedir (57). Bununla birlikte *TLX2* geninin farede enterik nöron oluşumu için gerekli olduğu fare "knock out" çalışmalarında gösterilmiştir.

TLX2 -/- fenotipine sahip farelerde megaileo-ceco-colon (mega-ICC) gelişimi gözlendiği ve farelerin postnatal dönemde 21 ile 35 günler arasında öldüğü saptanmıştır (58, 59). Sinir sisteminin gelişiminde nöronların bir kısmı apoptoza bağlı olarak ölmektedir (60). Sempatik ve parasempatik sinir sistemini oluşturacak nöronların bu süreçte hayatta kalımı ise sinir büyüme faktörlerinin ("Nevre Growth Factor") uyarımına bağlıdır (60). *TLX2* gen ifadesinin olduğu bununla birlikte *PHOX2B* geninin ifade edildiği IMR32 ve edilmediği SK-N-BE nöroblastom hücre hatlarında *TLX2* geni promotorü üzerinde fonksiyonel çalışma kurgulanmıştır (61). *TLX2* gen promotöründe "homeodomain" bağlanma bölgesinin (HBS) restriksiyon kesimi ile çıkartılması ayrıca HBS dejenere primerler ile oluşturulmuş mutant promotor dizi reporter vektöre aktarılmıştır (61). Bu vektör ile *PHOX2B* cDNA'sını içeren ifade vektörünün SK-N-BE hücre hattına aynı anda aktarılması sonucunda *TLX2* ifadesinin değişmediği bununla birlikte HBS bölgesinin değiştirilmediği promotör dizisinde *PHOX2B* ifadesinin *TLX2* ifadesini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (61). IMR32 hücre hattında yapılan EMSA yöntemi sonucunda elde edilen veri *PHOX2B* gen ürününün *TLX2* promotörüne özgül olarak bağlandığını göstermiştir (61). Çalışmada *TLX2* gen ifadesinin *PHOX2B* geni tarafından gerçekleştiği belirlenmiştir (61).

Farede neonatal dönemde *PHOX2B* gen ifadesi "area postrema", III. "oculomotor", IV. "trochlear", VII. "facial", "vagus" siniri ve miyalensefalik noradrejenik merkezde gözlenmektedir (44). V. "kranial" sinirde doğumdan sonra *PHOX2B* gen ifadesi gözlenmemesine karşın gasturalsyon evresinin orta dönemine kadar ifade edildiği bilinmektedir (44).

Fare embriyosunda yapılan çalışmalar periferik sinir sisteminde gastrulasyonunun orta dönemine kadar (E9.5) *PHOX2B* gen ifadesinin VII., IX. ve X. "kranial ganglianın" distalinde gerçekleştiğini ifade etmektedir (44). "Locus coeruleusda" ise *PHOX2A* ifadesi postnatal evreye kadar devam etmekte iken *PHOX2B* ifadesi embriyonik dönemde 11.5'inci günde son bulmaktadır (44). *PHOX2B* geni sempatik sinir sistemi, enterik ganglia ve merkezi sinir sisteminde yer alan nöron hücklerinin fenotipinin belirlenmesinde noradrenalin sentezinin son basamağında rol oynayan dopamin beta hidroksilaz enziminin ifadesini gerçekleştirmesi ile etkili olmaktadır.

2.3 Adrenal Medullada Nöral Krest Hücrelerinin Kromafin Hücrelerine Farklılaşması

Adrenal medulladaki kromafin hücreleri ve sempatik sinir sisteminde bulunan glia ve nöron hücreleri nöral krestten köken alan sempato-adrenal öncüller tarafından meydana gelmektedir (35-37, 62). Gelişim sürecinde, göç hareketi sonunda nöral krest hücreleri dorsal aorta sınırında toplanmaktadır. Bu bölgede toplanan hücrelerin dorso-lateral yönelimi ile parasempatik sinir sistemine ait hücreler meydana gelmektedir. Dorsal aorta bölgesinden ventral yöne doğru yapılan göç, hücrelerin adrenal medulla içersinde lokalize olması ile sonuçlanmaktadır (63). Lokalize olan hücreler nöronal özelliklerini kaybederek tirozin hidroksilaz ve dopamin beta-hidroksilaz sentezinden sorumlu kromafin hücrelerine farklılaşarak adrenal medullanın oluşumunu sağlamaktadır (64). Dorsal aorta sınırından ventrale doğru göç eden nöral krest hücrelerinin adrenal medulla içersinde kromafin hücre tipine farklılaşmasında ve adrejenik fenotipin belirlenmesinde belirli transkripsiyon faktörleri rol oynamaktadır. Özgül fenotipin belirlenmesinde *PHOX2A*, *PHOX2B* ve Drosophila achaete-scute proteinin memelilerdeki homoloğu olan *MASH1* transkripsiyon faktörleri görev almaktadır (38, 65, 66).

Mash1-/- genotipli farelerde yapılan çalışmalarda kromafin hücrelerinin farklılaşması meydana gelmemekle birlikte *PHOX2A* transkripsiyon faktörünün ifadesinde önemli ölçüde düşüş meydana gelmiştir (67). *MASH1* gen ifadesinin baskılandığı çalışmalarda bazı nöral krest hücrelerinin fazla gözlenmemesine karşın kromafin fenotipine dönüştüğü gösterilmiştir. İlerleyen çalışmalar kromafin fenotipinin belirlenmesinde *PHOX2B* transkripsiyon faktörünün *MASH1*'den bağımsız olarak bu fenotipi kazandırdığı ve ilgili sinyal yolağında birbirinden bağımsız iki yolun bulunduğunu belirlemiştir (68). *PHOX2B*, kromafin hücrelerinde *MASH1*'den bağımsız olarak ifade edilebilmektedir ancak *MASH1* transkripsiyon faktörünün ifadesi farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerde devam etmektedir. MASH1-/- genotipine sahip farelerde kromafin hücreleri adrenal medullada nöroblast tipte bulunmaktadır. Nöral krest hücrelerinin dopamin beta-hidroksilaz sentezini gerçekleştiren kromafin hücrelerine farklılaşmasında *MASH1*, *MASH1* ve *PHOX2B* aracılığı ile sentezi uyarılan *PHOX2A* ve bağımsız olarak ifade edilen *PHOX2B* transkripsiyon faktörleri birlikte rol oynamaktadır (65, 68).

2.4 *PHOX2B* Geni ve Nöroblastom Üzerine Olan Etkisi

Nöral krest hücrelerinin nihai farklılaşma evresinde görev alan genlerde meydana gelen mutasyonlar sempatik sinir sisteminin oluşumunda çeşitli defektlere neden olmaktadır. Sempatik sinir sistemi farklılaşmasında meydana gelen bu değişimlerin fenotipe yansıması Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu (CCHS) ve Hirschsprung sendromu (HSCR) gibi patolojik durumların oluşmasına neden olmaktadır (69-71). CCHS olguları üzerinde yapılan çalışmalarda *PHOX2B* geninde ikinci polialanin kodlayan bölgede tekrar dizilerinin arttığı (poly-alanin stretch expansion) saptamıştır (72). CCHS sendromunda *PHOX2B* gen allellerinden birinde oluşan bu değişimin otozomal dominant olarak aktarıldığı gözlenmiştir. Bu çalışmalarda CCHS sendromlu hastalardan ikisinde sendromla birlikte nöroblastom oluştuğu bildirilmiştir. Ancak nöroblastom oluşumu gözlenen olgularda diğer CCHS tanılı olgulardan farklı olarak *PHOX2B* geninde gözlenen değişim polialanin bölgesinde dizi arştı şeklinde meydana gelmemiştir. Nöroblastom gözlenen olgularda polialanin bölgesi içersinde yer alan 618. ve 619. nükleotidler arasında sitozin nükleotidinin insersiyonuna bağlı olarak meydana gelen çerçeve kayması şeklinde bir değişim ayrıca diğer olguda homoedomain bölgesi içersinde A463T değişimine bağlı olarak protein sentezinin erken sonlanmasında neden olan dur kodonu oluşumu saptanmıştır (72-74).

CCHS sendromu taşıyan kişilerde NB oluşumunun gözlenmesi, *PHOX2B* geninde meydana gelebilecek olası mutasyon ya da mutasyonların nöroblastom patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Ailesel NB olgularında yapılan ilk çalışmada üç aileden ikisinde *PHOX2B* genine ait iki farklı mutasyon bulunmuştur (75). Birinci ailede ganglionörom tanısı almış ve tedavi edilmiş babanın sahip olduğu üç çocuktan birinde ganglionörom bir diğerinde ise NB saptanmıştır (75). Mutasyon analizi sonucunda *PHOX2B* geninin ikinci ekzonunda meydana gelen G299T değişiminin babadan tümör oluşumu gözlenen çocuklara aktarıldığı bildirilmiştir (75). İkinci ailede sağlıklı anne ve babanın CCHS tanılı oğlunda NB tümör gelişimi gözlenmekle birlikte olguda saptanan *PHOX2B* genindeki C421G değişimi sağlıklı anneden aktarılmıştır (75). Bu çalışma ile birlikte *PHOX2B* gen mutasyonlarının kalıtsal olarak ortaya çıkan NB tümörlerinin oluşumunda rol oynayan mekanizma olduğu görüşü savunulmuştur (75).

Mosse ve ark. tarafından yapılan ve herediter NB olgularını inceleyen çalışmada bir ailede kuşaklar arasında, *PHOX2B* geninde açık okuma çerçevesini değiştiren 676delG değişiminin taşındığı ve en son kuşakta NB tümör oluşumu ile birlikte Hirschsprung senromu ve Nörofibromatosis tip I'in gözlendiği bildirilmiştir (76). Bununla birlikte çalışmaya dahil olan sekiz aileden hiçbirinde *PHOX2B* gen mutasyonu saptanamamıştır (76). Mosse ve ark.'ları yapmış olduğu çalışmada *PHOX2B* geninde meydana gelebilecek değişimlerin kalıtsal NB olgularında farklı şekilde meydana gelebileceğine ve gözlenen değişime bağlı olarak farklı patolojik oluşumların meydana gelebileceği vurgulanmıştır (76). Elde edilen bulgular sonucunda sekiz ailede herhangi bir *PHOX2B* gen mutasyonuna rastlanılmamış olması bu genin kalıtımsal olarak NB oluşumunda etken olduğu görüşünü zayıflatmıştır (76). NB tümörlerinin kalıtımsal olarak meydana geldiği üç farklı aile üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise *PHOX2B* geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (77). Ailesel olgularda yapılan çalışmalar *PHOX2B* gen mutasyonlarının farklı biçimlerde nadir olarak meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca kalıtsal NB olgularının farklı sendromlar ile birlikte gözlenmesi mutasyonların ilişkili sendroma neden olarak NB oluşumunda etkili olabileceğini düşündürmüştür. Ailesel olgularda *PHOX2B* gen mutasyonlarının gözlenmesi çalışmaları sporadik NB tümörleri üzerine yöneltmiştir.

Limpt ve ark. tarafından 22 hücre hattı ve 237 sporadik NB olguları üzerinde yapılan çalışmada ekzon 2'de bir adet ve ekzon 3'de beş adet mutasyon tanımlanmıştır (78). Hücre hatlarından elde edilen verilerde SK-N-SH hücre hattında *PHOX2B* geninin üçüncü ekzonu içersinde yer alan ve polialanin bölgesini kodlayan dizide 20bp'lik bir delesyon saptanmıştır (78). Sporadik olgular üzerinde devam eden çalışmada bir olguda proteinin homeobox domaininin hemen dışında 5' bölgesinde 8 bp'lik bir delesyon gözlenmiştir (78). Bununla birlikte beş farklı olguda mutasyonlar genin 2. polialanin kodlayan bölgesinde delesyon (38bp ve 35bp) ve duplikasyon (13 bp ve 17 bp) şeklinde meydana gelmiştir (78). Çalışmada tanımlanan bütün mutasyonlar (%2.3) açık okuma çerçevesini değiştirmekle birlikte mutant allel ile normal allelin ifade düzeylerinde herhangi bir fark bulunmamaktadır (78). Diğer sendromlar ile ilişkili olmayan, dört olgunun kalıtımsal olarak aktarıldığı 86 NB olgusunda yapılan bir başka çalışmada G590A mutasyonunun kuşaklar arasında aktarıldığı bununla birlikte sporadik olarak ortaya çıkan bir olguda ise *PHOX2B* geninin açık okuma çerçevesini değiştiren tek nükleotid delesyonu (600delC) saptanmıştır (79).

Raabe ve ark.'nın herediter olgular, NB hücre hatları ve sporodik olguları kapsayan çalışmasında kalıtsal 47 olgudan üçünde ve 30 hücre hattından ikisinde *PHOX2B* mutasyonu saptanmış ancak çalışmada sporadik olgular içersinde herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır (80). *PHOX2B* gen ifade düzeyi NB'de yüksek olmakla birlikte olgular arasında değişkenlik göstermektedir (81). Klinik açıdan agresif davranış gösteren ve tedaviye yanıt vermeyen NB olgularında *PHOX2B* gen ifadesinin düşük düzeyde olduğu saptanmıştır (82). *PHOX2B* gen ifadesinin NB tümörlerinde değişik düzeylerde ifade edilmesi promotör dizideki metilasyon örüntüsünde meydana gelebilecek değişimlerin etkili olabileceğini düşündürmüştür (30). Primer tümör dokularının ve hücre hatlarında *PHOX2B* gen promotör bölgesinin metilasyona uğradığı (%12.9) ve promotör dizide belirlenen tüm CpG adacıklarında hiper-metilasyonun varlığı bildirilmiştir (30). Yapılan çalışmalar sonucunda saptanan mutasyonlar ve gen ifade düzeyinde meydana gelen ifade farklılıklarının DBH sentezinde defekt oluşturması sonucunda farklılaşma sürecinde NB etkeni olduğu düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

KB.SAG.2007.023 numaralı proje ile elde edilmiş nöroblastik tümör arşivi üzerinde deneysel araştırma planlanmıştır. Araştırmaya yeni olgu grubu dahil edilememiş olmakla birlikte deneyler sadece arşiv örnekleri üzerinde yapılmıştır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda 04.12.2009 - 04.06.2011 tarihleri arasında yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından desteklenen 2007.KB.SAG.023 numaralı proje kapsamında, histo-patolojik inceleme sonucu tanı almış nöroblastik tümör örneklerinden (nöroblastom, ganglionöroblastom ve ganglionörom) ilk 128 olgu çalışmanın evrenini oluşturmaktadır. NB olgularında dizi analizi sonucunda saptanan değişimler veri tabanı üzerindeki *PHOX2B* gen dizisi (http://ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000109132;r=4:41746099-41750987) ile karşılaştırılmıştır. QPCR metodunun doğrulanması için 2007.KB.SAG.023 numaralı proje kapsamında, histo-patolojik inceleme sonucu tanı almış bununla birlikte proje kapsamında 1p delesyonu ve 17q artışı tespit edilmiş nöroblastik tümör örneklerinden çalışma evreni içersinde yer almayan ve yer alan olgular kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır. Diploid kopya sayısının belirlenmesine yönelik QPCR pozitif kontrol çalışmasında 2005.KB.SAG.016 numaralı projeden temin edilen ve kopya sayısı değişimi olmayan 25 işitme kaybı hastasına ait periferik kan materyalinden izole elde edilmiş DNA materyali kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

KB.SAG.2007.023 numaralı projeden gerekli onam formu ile izni alınmış 128 nöroblastik tümör dokusu çalışma materyalini oluşturmaktadır. 128 nöroblastik tümörden 7'si ganglionörom, 7'si ganglionöroblastom ve 114'ü nöroblastomdur. Hasta yakınına gerekli bilgi verildikten sonra tarafımıza ulaşan her bir hasta materyali için aydınlatılmış onam formu ile

izni alınmış tümör dokusu örnekleri -80 C°'de saklanarak arşivlenmiştir. Aydınlatılmış onam formu ile izni alınmış işitme kaybı hastalarına ait DNA materyali -20 C°'de saklanmıştır.

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1 Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu

Tümör dokusundan genomik DNA'nın izolasyonu için "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche, Cat. No: 11 796 828 001) kullanılmıştır. İzolasyon işleminin uygulama basamaklarında kullanılan tampon ve enzim miktarları üretici firmanın öngördüğü şekilde kullanılmıştır.

"High Pure PCR Template Preparation Kit" ile genomik DNA izolasyon protokolü

Purifikasyon işlemine başlamadan önce elüsyon tamponu 70 C°'de ısıtılır.

1. 25-50 mg doku parçası tümörden steril bistüri yardımı ile kesilip alınır ve petri kabı içersine alındıktan sonra küçük parçalara ayrılır.

2. Küçük parçalara ayrılan tümör dokusu 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpü içersine aktarılır. Tüp içersine 200 µl "Tissue Lysis" tamponu ve 40 µl proteinaz-K enzimi eklenir.

3. Mikrosantrifüj tüpü 55 C°'de 1 saat inkübe edilir.

4. Tüp içersine 200 µl "Binding" tamponu eklenir ve 70 C°'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk. inkübasyona bırakılır.

5. İnkübasyondan sonra oda sıcaklığında bulunan isopropanol'den 100 µl eklenir.

6. Toplama tüpünün içine filtreli tüp yerleştirilir. İsopropanol eklenen örnek filtreli kısma alınarak 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.

7. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konur.

8. Filtreli tüp içersine 500 µl "İnhibitör Removal" tamponu eklenir ve 8000g'de 1 dk santrifüj yapılır.

9. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konur.

10. Filtreli tüp içersine 500 µl "Wash Buffer" eklenir ve 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.

11. Yeni toplama tüpü ile bir önceki basamak tekrarlanır.

12. "Flowthrough" sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra 10 sn. maksimum hızda santrifüj yapılır.

13. Filtreli tüp 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir. Filtreli tüp içersine 70 C^o'de inkübe edilmiş elüsyon tamponundan 200 µl eklenir ve 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.

14. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA -20 C^o'de saklanır.

3.5.2 Elde Edilen Genomik DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının saptanması

Tümör dokularından elde edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonu spektrofotometre (Thermo, NanoDrop ND1000 ve NanoDrop ND2000) ile ölçülmüştür. Her bir örnek için aynı seyreltme oranında üç farklı ölçüm yapılmıştır. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

Tablo 1: 1-8 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları

Olgu Numarası	Abs260	Abs280	Oran	Ana stok (ng/µl)	Ara Stok (ng/µl)
1	21,039	10,87	1,94	1051,95	42,83
2	1,806	0,935	1,93	90,31	37,7
3	10,926	5,826	1,88	546,29	40,35
4	3,076	1,588	1,94	153,79	38,73
5	4,494	2,452	1,83	224,68	37,40
6	3,707	1,941	1,91	185,36	35,65
7	13,393	6,877	1,95	669,67	34,58
8	43,054	22,382	1,92	2152,70	46,43

Tablo 2: 9-60 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları

Olgu Numarası	Abs260	Abs280	Oran	Ana stok (ng/µl)	Ara Stok (ng/µl)
9	14,814	7,642	1,94	740,69	39,53
10	0,761	0,41	1,87	42,70	42,70
11	13,258	6,871	1,93	662,89	50,33
13	30,129	15,411	1,96	1506,47	46,16
14	18,668	9,559	1,95	933,41	37,54
15	56,053	29,048	1,93	2802,68	36,61
17	30,627	16,019	1,91	1531,38	34,45
18	73,461	45,288	1,62	3673,07	40,36
20	6,658	3,347	1,99	332,92	38,57
21	20,729	10,597	1,97	1036,47	34,94
22	39,82	20,946	1,90	1990,99	34,46
23	43,543	22,517	1,93	2177,12	37,96
24	75,811	50,958	1,49	3790,54	46,46
25	10,97	5,872	1,90	548,47	40,36
26	23,208	12,001	1,93	1160,40	29,34
27	36,975	19,218	1,92	1848,77	34,97
28	1,056	0,521	2,03	52,79	45,00
29	48,794	25,464	1,92	2438,02	40,96
30	72,871	43,395	1,68	3643,54	42,23
32	20,941	10,999	1,90	1047,07	41,20
33	25,605	13,329	1,92	1280,23	32,88
34	12,955	6,725	1,93	647,73	35,15
35	22,975	12,055	1,91	1148,76	35,13
36	11,918	6,319	1,89	595,90	32,86
37	13,857	7,253	1,91	692,83	28,25
38	16,978	8,65	1,96	848,91	34,37
39	19,292	10,102	1,91	964,58	32,27
40	2,203	1,099	2,00	110,16	37,99
41	13,133	7,002	1,88	656,67	47,80
42	2,639	1,35	1,95	131,97	37,36
43	5,966	3,107	1,92	298,28	43,38
44	20,116	10,56	1,91	1005,81	45,50
45	3,149	1,609	1,96	157,42	39,44
46	2,534	1,545	1,64	126,71	41,45
47	21,989	11,625	1,89	1099,47	35,36
48	18,343	9,57	1,92	919,16	49,20
52	22,938	12,092	1,90	1146,91	35,51
59	0,971	0,501	1,94	48,52	48,52
60	1,594	0,834	1,91	79,68	40,86

Tablo 3: 61-128 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları

Olgu Numarası	Abs260	Abs280	Oran	Ana stok (ng/µl)	Ara Stok (ng/µl)
61	1,44	0,768	1,88	71,98	45,38
64	2,504	1,351	1,85	125,18	38,61
66	5,201	2,731	1,9	260,07	40,80
71	2,909	1,518	1,92	145,45	42,25
72	1,164	0,566	2,06	58,20	45,36
73	0,995	0,485	2,05	49,73	43,5
74	2,322	1,203	1,93	116,08	43,24
75	1,479	0,745	1,98	73,96	42,33
76	5,395	2,821	1,91	269,74	44,10
77	2,398	1,245	1,93	119,92	41,82
78	5,5	2,869	1,92	274,98	42,85
80	11,565	6,113	1,89	578,26	24,94
84	2,782	1,399	1,99	139,09	44,02
87	7,2	3,77	1,91	360,01	47,87
95	1,132	0,636	1,78	56,61	44,19
96	1,986	1,028	1,93	99,32	49,08
97	2,232	1,175	1,9	111,61	53,87
98	1,499	0,786	1,91	74,94	55,3
99	4,896	2,588	1,89	244,80	30,8
100	6,801	3,518	1,93	340,04	37,9
101	0,541	0,291	1,86	27,05	27,05
102	5,471	2,785	1,96	273,54	45,52
103	10,383	5,428	1,91	519,15	27,87
105	2,74	1,425	1,92	137,00	51,82
109	5,233	2,677	1,95	261,65	32,15
110	0,516	0,265	1,95	25,81	25,81
113	7,518	3,949	1,9	375,89	45,18
114	6,553	3,575	1,83	327,67	35,1
115	3,438	1,801	1,91	171,91	45,81
117	6,884	3,625	1,90	344,20	32,29
118	3,511	1,84	1,91	175,57	47,75
119	0,508	0,302	1,68	25,40	25,40
120	0,175	0,153	1,15	8,77	8,77
121	1,899	0,969	1,96	94,97	41,1
122	0,849	0,457	1,86	42,44	42,44
123	0,359	0,226	1,59	17,97	17,97
124	0,387	0,234	1,65	19,36	19,36
125	1,474	0,751	1,96	73,71	37,1
126	3,782	1,978	1,91	189,12	42
127	2,654	1,412	1,88	132,70	44,9
128	1,999	1,069	1,87	99,95	35,8

Tablo 4: 129-176 numaralı olguların ana stok ve ara stok DNA konsantrasyonları

Olgu Numarası	Abs260	Abs280	Oran	Ana stok (ng/µl)	Ara Stok (ng/µl)
129	0,813	0,531	1,53	40,67	40,67
131	9,495	4,988	1,90	474,76	51,9
132	1,414	0,765	1,85	70,69	43,3
133	7,296	3,806	1,92	364,78	46,8
134	6,254	3,476	1,80	312,71	36,1
135	10,210	5,463	1,87	510,49	44,6
136	4,138	2,147	1,93	206,89	41
137	1,349	0,731	1,85	67,45	45,5
138	1,926	1,019	1,89	96,32	45
139	0,947	0,522	1,81	47,37	47,37
140	0,558	0,257	2,17	27,89	27,89
141	4,352	2,231	1,95	217,58	44,7
142	3,504	1,779	1,97	175,19	42,9
143	7,016	3,731	1,88	350,80	31,1
144	7,200	3,702	1,94	359,98	39,0
145	1,546	0,766	2,02	77,29	42,7
146	2,569	1,308	1,96	128,46	40,8
147	9,840	5,191	1,90	492,01	39,3
148	2,298	1,156	1,99	114,90	35,7
149	2,435	1,271	1,92	121,73	34,6
150	6,800	3,529	1,93	340,02	56,8
151	1,754	0,913	1,92	87,70	49,35
152	1,211	0,682	1,78	60,57	42
153	4,868	2,532	1,92	243,39	28,7
154	9,340	4,922	1,90	467,00	43,9
156	2,169	1,130	1,92	108,45	34,5
157	1,390	0,714	1,95	69,49	40,3
158	4,174	2,031	2,06	208,70	31,9
163	2,133	1,218	1,75	106,64	32,7
164	3,674	2,014	1,82	183,69	36,1
166	0,988	0,54	1,83	49,42	34,8
167	2,275	1,322	1,72	113,76	26,3
168	1,096	0,574	1,91	54,82	54,82
169	0,605	0,359	1,69	30,27	30,27
171	0,997	0,528	1,89	49,86	49,86
172	2,893	1,531	1,89	144,64	39,1
173	4,472	2,413	1,85	223,61	31,4
174	2,03	1,091	1,86	101,49	39,1
175	2,627	1,401	1,87	131,34	26,2
176	0,898	0,49	1,83	44,9	44,9

3.5.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile *PHOX2B* Gen Ekzonlarının Çoğaltılması

Homeobox transkripsiyon faktörü olan *PHOX2B* geninin tüm ekzonları PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılacak primer dizileri Vera van Limpt ve ark.'nın "The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas" adlı çalışmasında kullandığı ileri ve geri primerler olarak seçilmiştir (78). Primerlerin gen dizisi üzerinde gösterilerek doğrulanması ise FastPCR programı aracılığı ile yapılmıştır. NCBI veri tabanı üzerindeki *PHOX2B* gen dizisi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8929 adresinden indirilmiştir.

3.5.3.1 *PHOX2B geni 1. Ekzonun Çoğaltılması*

PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 385 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

```
121 accgctttgc tattgtccaa gtggaaagag ccaagtttat tatgaggact atatgctcta
181 gagacctcag acaaggcatc tcataggagg ctttttcata aaactaggct ctgctggtag
241 taaggaggcc agtttggagg caggcgtTGA GCTGTGCACA TCTCCccact ccagccacct
301 tctccatatc catcttttat ttcatttttc cacttggctg agccatccag aacctttca
361 atgtataaaa tggaatattc ttacctcaat tcctctgcct acgagtcctg tatggctggg
421 atggacacct cgagcctggc ttcagcctat gctgacttca gttcctgcag ccaggccagt
481 ggcttccagt ataacccgat aaggaccact tttggggcca cgtccggctg cccttccctc
541 acgccgggat cctgcagcct gggcaccctc agggaccacc agagcagtcc gtacgccgca
601 ggtaaggacc ttcagctttc tcagcggagg aagccGCCTT TCCGCCCGTA TATaggagcc
```

Şekil 4: *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunda primerlerin eşleştiği dizilerin (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge) ve protein kodlayan bölgenin gösterimi.

3.5.3.2 *PHOX2B geni 2. Ekzonun Çoğaltılması*

PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 346 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

```
1321 ggtgtaggta gcggctgccg tatgacctga ccttggagTC CTCACATTCT AGCTCCacgg
1381 ccggcgagct gccggctgat ttgctcactt tctgtctcct ctgtcatact ctagttcctt
1441 acaaactctt cacggaccac ggcggcctca acgagaagcg caagcagcgg cgcatccgca
1501 ccactttcac cagtgcccag ctcaaagagc tggaaagggt cttcgcggag actcactacc
1561 ccgacatcta cactcgggag gagctggccc tgaagatcga cctcacagag gcgcgagtcc
1621 aggtacgcgc gcctggaaac cgaccccgct ccgccgcact ggtccgggga ggtgtggggt
1681 gaggggcGGC TGGTGAAATT CGAAGtcctg gagcctcgag tgagaaggac ctagggcccc
1741 atggccgatc agaaatactg gatttggtgt ggctgtgcgt tcgagagagg cttagagcgc
```

Şekil 5: *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunda primerlerin eşleştiği dizilerin (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge) ve protein kodlayan bölgenin gösterimi.

3.5.3.3 *PHOX2B geni 2. Ekzonun Çoğaltılması*

PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 711 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

```
2521 acagcgcatg gggaggaggg tgttaaaaca aGCCGAAGTA GAACTTGGGc caccctaacc
2581 ggtgcttttc tttcccattt tcttctttct ccccctgctt caccgtctct ccttccgtct
2641 tgggccaggt gtggttccag aaccgccgcg ccaagtttcg caagcaggag cgcgcagcgg
2701 cagccgcagc ggccgcggcc aagaacggct cctcgggcaa aaagtctgac tcttccaggg
2761 acgacgagag caaagaggcc aagagcactg acccggacag cactgggggc ccaggtccca
2821 atcccaaccc caccccccagc tgcggggcga atggaggcgg cggcggcggg cccagcccgg
2881 ctggagctcc gggggcggcg gggcccgggg gcccgggagg cgaacccggc aagggcggcg
2941 cagcagcagc ggcggcggcc gcggcagcgg cggcggcggc agcggcagcg gcggcagctg
3001 gaggcctggc tgcggctggg ggccctggac aaggctgggc tcccggcccc ggccccatca
3061 cctccatccc ggattcgctt gggggtccct tcgccagcgt cctatcttcg ctccaaagac
3121 ccaacggtgc caaagccgcc ttagtgaaga gcagtatgtt ctgatctgga atcctgcggc
3181 ggcggcggcg gcggcgacag cgggcgagcc agggcccggg cgggcgagtg ggcgagcggg
3241 taggcCCAAG GCTATTGTCG TCGctgctgc catggctttt tcattgaggg cctaaagtaa
3301 tcgcgctaag aataaaggga aaacggcgtc gccctcattt caaccccact cctacccccct
```

Şekil 6: *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunda primerlerin eşleştiği dizilerin (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge) ve protein kodlayan bölgenin gösterimi.

3.5.4 PCR reaksiyonunda kullanılan komponentler

Primerlerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan primer dizileri Alpha DNA şirketi aracılığıyla elde edilmiştir. Sentezlenen oligonükleotidler HPLC yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra liyofilize bir şekilde gönderilmiştir. Liyofilize gelen tüm primerler firmanın gönderdiği konsantrasyon bilgisi doğrultusunda son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde DNase ve RNase free steril distile su (Biologıcal Industries Ultra Pure Water, Cat. No: 01-866-1A) ile çözüldü. Ara stok olarak her primer 25 pmol/µl olacak şekilde 1:4 oranında DNase ve RNase free steril distile su (Biologıcal Industries, Cat. No: 01-866-1A) ile seyreltildi. Hazırlanan ara stok 50 µl hacimlere bölünerek ana stokla birlikte -20 C^{o}'ye kaldırıldı.

DNA Taq Polimeraz Enzimi (Fermentas 5U/µl, Cat. No: EP0402)

PCR reaksiyonuna; 25 µl için 1-1.5 ünite, 50 µl için 3 ünite olacak şekilde eklendi.

10X Taq Tamponu (Fermentas)

$MgCl_2$ içermeyen, KCl içeren Taq tamponu PCR reaksiyonuna toplam hacimde 1X olacak şekilde kullanıldı. Bu tampon belirtilen katalog numarası ile alınmış olan Taq Polimeraz ile üretici firma tarafından verilmiştir.

dNTP (Larova, Cat. No: NU-1019S)

100 mM'lık her bir dNTP'den 10 µl alınmış ve üzerine 460 µl steril distile su ilave edilerek 2mM'lık çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu 50 µl'lik olacak şekilde alikotlanıp -20 C^{o}'ye kaldırıldı.

$MgCl_2$ (Fermentas)

Her bir ekzonun PCR reaksiyonu için gerekli olan $MgCl_2$ konsantrasyonu optimizasyon çalışmaları sonunda 1.5mM olarak belirlenmiştir. Bu çözelti üretici firma tarafından belirtilen katalog numarası ile temin edilmiş Taq Polimeraz ile birlikte verilmiştir.

3.5.5 PCR Reaksiyonunun Hazırlanışı

PCR reaksiyonunun toplam hacmi 25 µl olacak şekilde kuruldu. İlk sekans analizi sonrasında doğrulama amacı ile ters yönden ikinci bir sekans analizi yapılmıştır. İki numaralı ekzon için kurulacak PCR reaksiyonlarında ürün miktarının düşük olması nedeni ile reaksiyon hacmi 50 µl olarak belirlenmiştir. PCR reaksiyonu için 0.2 µl'lik DNase ve RNase free steril PCR tüpleri kullanılmıştır. Reaksiyon kurulurken kalıp ve su haricinde diğer komponentler karışım halinde hazırlanıp toplam hacimde gerekli miktarlarda dağıtılmıştır. PCR hazırlanışı esnasında gerekli olan komponentler soğuk blok üzerinde tutulmuştur. PCR reaksiyonu kurulurken ilk olarak tüplere su dağıtıldı ardından her bir tüpe kalıp DNA eklendi. Bu işlem tamamlandıktan sonra PCR karışımı hazırlandı. Karışım hazırlanırken en son olarak Taq Polimeraz eklendi. Ardından yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı. Homojenize edilen PCR karışımı tüplere dağıtıldı. Her bir tüpe PCR karışımı dağıtıldıktan sonra elde edilen son karışım köpürtülmeden iyice pipetaj yapıldı. Tüpler "Thermal Cycler" cihazına (96 Universal Gradient Peqstar, Thermal Cycler) zaman kaybedilmeden yerleştirilerek PCR reaksiyonu başlatıldı.

Tablo 5: Optimizasyon öncesi 25 µl ve 50 µl'lik reaksiyonda önerilen bileşen miktarları

Komponentler	**İlk Konsantrasyon**	**Son Konsantrasyon**	**50 µl Reaksiyon Hacmi**	**25 µl Reaksiyon Hacmi**
Taq Tamponu	10X	1X	5.0 µl	2.5 µl
dNTP Karışımı	2mM	0.5mM	1.0 µl	0.5 µl
İleri Primer	25 pmol/µl	1 pmol/µl	0.5 µl	0.25 µl
Geri Primer	25 pmol/µl	1 pmol/µl	0.5 µl	0.25 µl
Taq Polimeraz	5U/ µl	1-1.5 U/µl	0.4-0.6 µl	0.2-0.3 µl
$MgCl_2$	25mM	1-4mM	2-8 µl	1-4 µl
Kalıp DNA		40ng/µl	2-4 µl	1-2 µl

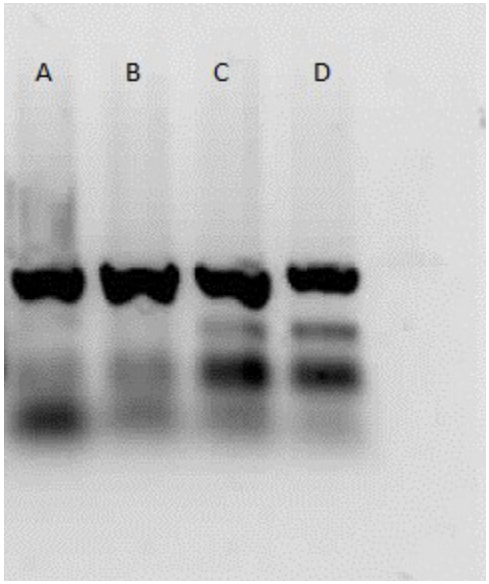
3.5.6 PCR Koşulları ve Optimizasyon Deneyleri

PHOX2B geninin her üç ekzonu için sentezlenen oligonükleotid primerlerin her bir seti için optimizasyon deneyleri kurgulanmıştır. Optimizasyon deneylerinde öncelikle Tablo 5'de belirtilen parametreler arasında yer alan $MgCl_2$ konsantrasyonu irdelenmiştir. $MgCl_2$ konsantrasyonu optimize edildikten sonra reaksiyonun verimliliği ve özgüllüğünü arttırmak için "annealing" sıcaklık değeri ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. *PHOX2B* gen ekzonlarının çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonun termal profilinin belirlenmesinde Vera van Limpt ve ark.'nın belirlediği termal profil üzerinden gidilmiştir (78). Optimal $MgCl_2$ konsantrasyonu ve "annealing" sıcaklığı belirlendikten sonra primer dimerlerinin azaltılması ve reaksiyon verimliliğini arttırılması için Tablo 5'de belirtilen primer ve dNTP miktarları üzerinde ayrı optimizasyon deneyleri planlanmıştır. Yapılacak ilk dizi sekansı öncesinde her olgunun üç ekzonu için PCR reaksiyonu 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Sekans verilerinin doğrulanmasında kurulan ikinci PCR reaksiyonlarında ekzon 2 için reaksiyon 50 µl olarak kurulmuştur.

Tablo 6: *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunun optimize edilen PCR bileşenleri ve reaksiyonun termal profili

Bileşenler	**Miktar**	**EKZON 1 TERMAL PROFİL**		
10X Taq Buffer	2.5 µl	**Basamak**	**Süre**	**Sıcaklık**
2 mM dNTP mix	0.5 µl	Denatürasyon	5 dakika	96 C^o
Forwar Primer (1F)	0.5 µl	**X 32 Döngü**		
Revers Primer (1R)	0.5 µl	Denatürasyon	30 saniye	96 C^o
Taq polimeraz	0.2 µl	Annealing	30 saniye	58 C^o
DNA	1.0 µl	Extension	30 saniye	72 C^o
Su	18.3 µl	Final Extension	7 dakika	72 C^o
$MgCl_2$	1.5 µl	Elde edilen PCR amplikonu 385bp'dir.		
Toplam	**25 µl**			

Ekzon 1 için $MgCl_2$ konsantrasyonun optimizasyon koşulları ve elde edilen ürünler Şekil 7'de gösterilmektedir.



A. KCl Taq Tamponu + 1.0 mM $MgCl_2$

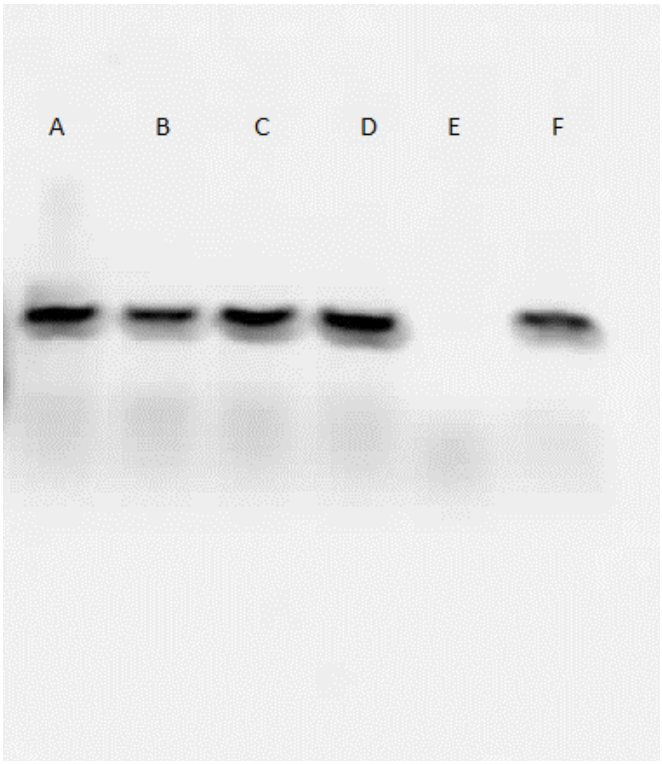
B. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$

C. KCl Taq Tamponu + 2.0 mM $MgCl_2$

D. KCl Taq Tamponu + 2.5 mM $MgCl_2$

Şekil 7: *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunun $MgCl_2$ optimizasyon deneyi Jel görüntüsü

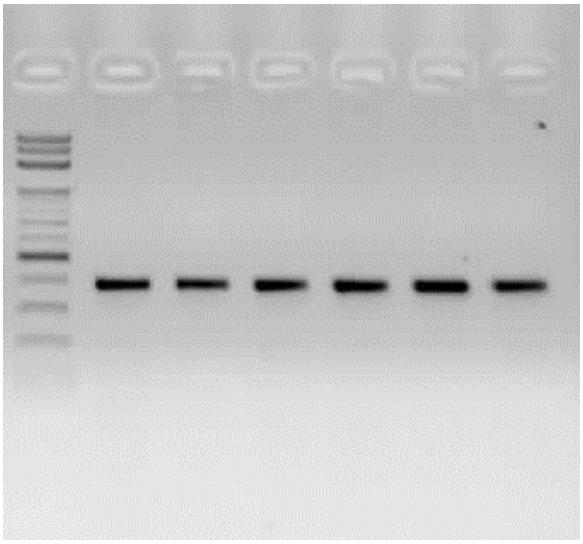
Optimizasyon reaksiyonu sonucunda $MgCl_2$ konsantrasyonu 1.5 mM olarak belirlenmiştir. *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonun primer seti için optimal $MgCl_2$ konsantrasyonu belirlendikten sonra "annealing" sıcaklığı optimizasyon koşulları derecelendirme yapılarak oluşturuldu. Merkez sıcaklık 55 C^o alınarak merkezin sağında ve solunda bulunan kuyularda farklı sıcaklık koşulları oluşturuldu. Uygulanan "annealing" sıcaklığı koşulları Şekil 8'de gösterildiği şekildedir.



A. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 56.3 C^o
B. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 57.0 C^o
C. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 57.7 C^o
D. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 58.2 C^o
E. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 58.9 C^o
F. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 59.5 C^o

Şekil 8: *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonunun "annealing" optimizasyon deneyi jel görüntüsü

Bir numaralı ekzon için belirlenen $MgCl_2$ konsantrasyonu ve en uygun olduğu belirlenen 58 C^o "annealing" sıcaklığının kullanıldığı bir PCR reaksiyonunda farklı hastalardan elde edilen ürünler Şekil 9'daki gibi olup yapılan optimizasyon çalışmaları ile *PHOX2B* geni 1 numaralı ekzonu için gerekli PCR koşulları sağlanmıştır.

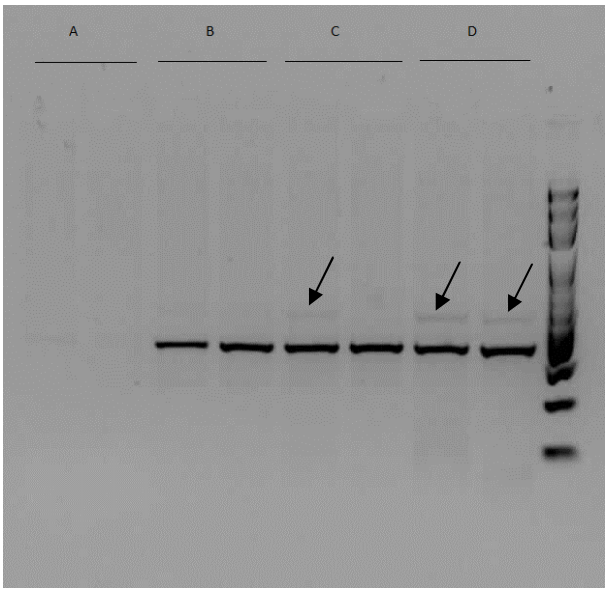


Şekil 9: 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu ve 58 C^o "annealing" sıcaklığının uygulandığı PCR reaksiyonundan elde edilen ürünler.

Tablo 7: *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunun optimize edilen PCR bileşenleri ve reaksiyonun termal profili

Bileşenler	**Miktar**	**EKZON 2 TERMAL PROFİL**		
10X Taq Buffer	2.5 µl	**Basamak**	**Süre**	**Sıcaklık**
2 mM dNTP mix	0.5 µl	Denatürasyon	5 dakika	96 C^o
Forwar Primer (2F)	0.3 µl	**X 34 Döngü**		
Revers Primer (2R)	0.3 µl	Denatürasyon	30 saniye	96 C^o
Taq polimeraz	0.2 µl	Annealing	30 saniye	54 C^o
DNA	1.0 µl	Extension	30 saniye	72 C^o
Su	18.7 µl	Final Extension	7 dakika	72 C^o
$MgCl_2$	1.5 µl	Elde edilen PCR amplikonu 346bp'dir.		
Toplam	**25 µl**			

İki numaralı ekzonun PCR reaksiyonu ile çoğaltılmasında kullanılacak primer seti için optimizasyon deneyleri kurgulanmıştır. $MgCl_2$ konsantrasyon koşulları ve reaksiyondan elde edilen PCR ürünleri aşağıda belirtilmiştir. Reaksiyon kurulumu sırasında PCR karışımı 3X olarak hazırlanıp her bir deney ikili olarak kurgulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri jelde ayrı kuyularda birlikte yürütülmüştür.



A. KCl Taq Tamponu + 1.0 mM $MgCl_2$

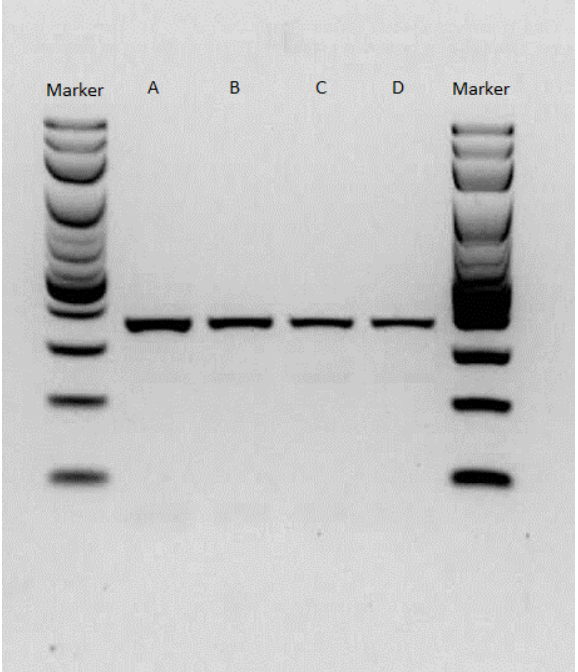
B. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$

C. KCl Taq Tamponu + 2.0 mM $MgCl_2$

D. KCl Taq Tamponu + 2.5 mM $MgCl_2$

Şekil 10: *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunun $MgCl_2$ optimizasyon deneyi jel görüntüsü.

Yapılan deney sonucunda 1.0 mM'lık $MgCl_2$ konsantrasyonunda ürün elde edilemez iken 1.5-2.5 mM konsantrasyon aralığında ürün elde edilmiştir. Ancak 2.0 mM ve 2.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonlarında özgül olmayan PCR ürünü gözlenmiştir (Şekil 10'da ok ile işaretli bantlar). Yapılan optimizasyon reaksiyonu sonucunda en uygun $MgCl_2$ konsantrasyonunun 1.5 mM olduğu saptanmıştır. $MgCl_2$ konsantrasyonu belirlendikten sonra "annealing" sıcaklığı için optimizasyon koşulları derecelendirme yapılarak oluşturulmuştur. Uygulanan "annealing" sıcaklığı koşulları Şekil 11'de gösterildiği şekildedir.



A. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 54.0 C^o

B. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 55.0 C^o

C. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 55.5 C^o

D. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + Annealing Sıcaklığı 55.9 C^o

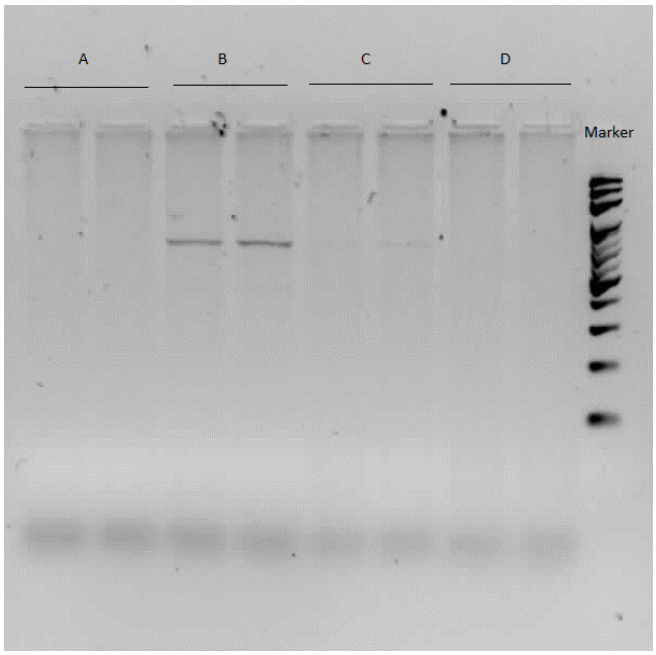
Şekil 11: *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonunun "annealing" optimizasyon deneyi jel görüntüsü

Optimizasyon deneyleri sonucunda PCR reaksiyonu için en uygun "Annealing" sıcaklığı 54 C^o olarak belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon deneyleri ile *PHOX2B* geni 2 numaralı ekzonu için gerekli PCR koşulları sağlanmıştır.

Tablo 8: *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunun optimize edilen PCR bileşenleri ve reaksiyonun termal profili

Bileşenler	**Miktar**	**EKZON 3 TERMAL PROFİL**		
10X Taq Buffer	2.5 µl	**Basamak**	**Süre**	**Sıcaklık**
2 mM dNTP mix	2.5 µl	Denatürasyon	10 dakika	96 C^o
Forwar Primer (3F)	0.3 µl	**X 35 Döngü**		
Revers Primer (3R)	0.3 µl	Denatürasyon	45 saniye	96 C^o
Taq polimeraz	0.3 µl	Annealing	1 dakika	54 C^o
DNA	2.0 µl	Extension	2 dakika	72 C^o
Su	14.35 µl	Final Extension	7 dakika	72 C^o
$MgCl_2$	1.5 µl	Elde edilen PCR amplikonu 711 bp'dir.		
DMSO	1.25 µl			
Toplam	**25 µl**			

Ekzon 3 için optimizasyon deneylerine $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi ile başlanmıştır. 3 numaralı ekzonunun guanin ve sitozin nükleotidlerinin toplam bp yüzdesinin yüksek oluşu (% GC=72.9) başlangıç deneylerinde 1.0 mM-2.5 mM konsantrasyon aralıklarında beklenilen ürün bandının (711 bp) gözlenmemesine neden olmakla birlikte özgül olmayan ürün bandları oluşmaktaydı. Yüksek % GC içeriğine sahip hedef dizinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılabilmesi için DMSO (% 5-10) kullanılmıştır. $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesinde tasarlanan deney koşulları için kullanılacak PCR karışımının içersine toplam PCR reaksiyon hacminin % 5'i kadar DMSO eklenmiştir. Kurulan reaksiyon için oluşturulan $MgCl_2$ konsantrasyon koşulları Şekil 12'de belirtilmiştir.



A. KCl Taq Tamponu + 1.0 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO

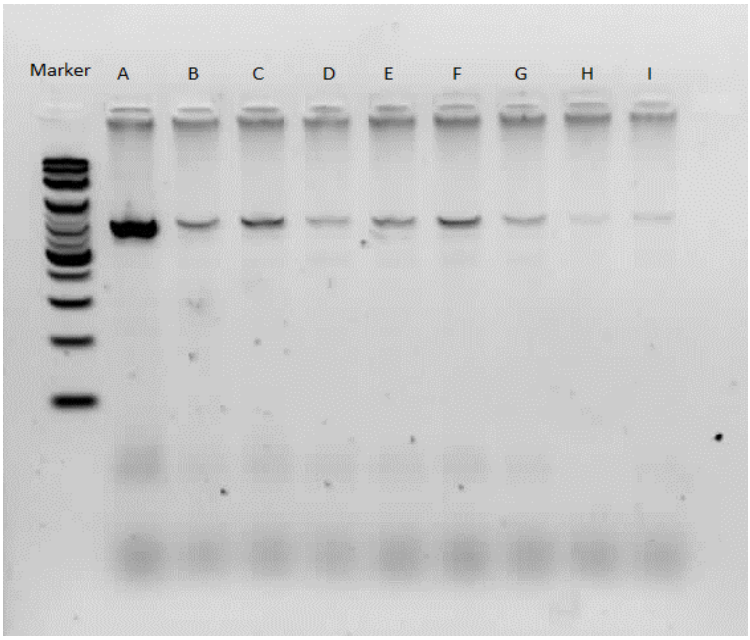
B. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO

C. KCl Taq Tamponu + 2.0 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO

D. KCl Taq Tamponu + 2.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO

Şekil 12: *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunun $MgCl_2$ optimizasyonu deneyi jel görüntüsü

$MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik olarak yapılan optimizasyon deneyinin sonucunda PCR reaksiyonundan sadece 1.5 mM konsantrasyonda ürün elde edilmiştir. $MgCl_2$ konsantrasyonu belirlendikten sonra PCR reaksiyonunun veriminin arttırılması için "annealing" sıcaklığı üzerinde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. "Annealing" sıcaklığının belirlenmesinde oluşturulan sıcaklık aralıkları sentezlenen primerlerin Tm derecesi dikkate alınarak Şekil 13'de belirtilen şekilde oluşturulmuştur.



A. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 54.0 C^o

B. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 54.6 C^o

C. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 55.1 C^o

D. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 56.2 C^o

E. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 56.7 C^o

F. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 57.2 C^o

G. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 57.8 C^o

H. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 58.5 C^o

I. KCl Taq Tamponu + 1.5 mM $MgCl_2$ + %5 DMSO + 58.8 C^o

Şekil 13: *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonunun "annealing" optimizasyon deneyi jel görüntüsü

Optimizasyon deneyleri sonucunda PCR reaksiyonu için en uygun "annealing" sıcaklığı 54 C^o olarak belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon deneyleri ile *PHOX2B* geni 3 numaralı ekzonu için gerekli PCR koşulları sağlanmıştır.

3.5.7 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve Kullanılan Kimyasallar

5X TBE Stok Tamponu (AppliChem, Cat No: A1417,5000PE)

5X konsantrasyondan 0.5X konsantrasyona düşürülerek kullanılmıştır.

6X Yükleme Boyası (Loading Dye)

PCR ürünleri ve DNA ağırlık belirtecinin agaroz jele yüklenmesinde 6X DNA loading dye (Fermentas Cat. No: R0611) kullanılmıştır. Örneklerin yüklenmesinde 6X'lik konsantrasyon örnek başına X'e indirilmiştir.

100 bp'lik DNA ağırılık belirteci

Elde edilen ürünlerin hedef bölge nükleotid dizisi ile aynı büyüklükte olup olmadığı ve elde edilen ürün miktarı hakkında tahmini bir değer elde edebilmek için 100bp'lik DNA ağırlık belirteci (Amresco 100bp DNA MW Marker) kullanılmıştır.

Agaroz Jelin Hazırlanışı

PCR ürünlerinin büyüklüğü 346-711 bp arasında olduğu için %1.5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Örneklerin yürütülmesi için mini jel yatağı (Thermo, EC330) kullanılmıştır. 0.45 g agaroz (Promega, V312A) tartılarak 200 ml'lik erlen içersine alındı. Üzerine 30 ml 0.5 X TBE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırın içersinde ısı yardımıyla çözüldü. Çözünen 30 ml'lik agaroz karışımı el yakmayacak sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra içersine PCR ürünlerinin görüntülenebilmesini sağlayan Etidyum Bromür eklendi. Erlen hafifçe çalkalanarak Etidyum Bromür % 1.5'lik jel içersinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Hazırlanan akışkan sıvı kıvamındaki jel yatay yatağı içersine herhangi bir kabarcık oluşumuna izin verilmeyecek şekilde yavaşça döküldü. Yükleme kuyularının oluşturulması için taraklar yatağa yerleştirildikten sonra jel oda sıcaklığında donmaya bırakıldı.

PCR ürünlerinin jele yüklenmesi

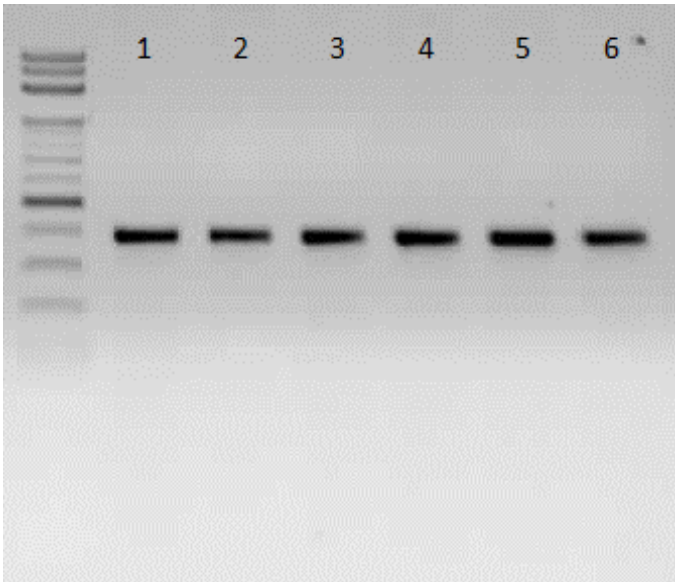
Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkartılarak örneklerin yüklenmesi için elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın içersine 0.5X TBE tamponu jelin üzerini 0.3 cm geçecek şekilde ilave edildi. Elektroforez ekipmanı yürütme için hazırlandıktan sonra örnekler kuyulara yüklendi. Örneklerin yürütme için hazırlanması aşamasında 5 µl PCR örneği ile 6X Loading Dye'dan (Fermentas, Cat. No: R0611) 1 µl alınarak karıştırıldı. Hazırlanan karışım kuyu üzerinde, TBE tamponu içersinde pipet yardımıyla yavaşça bırakılarak kuyu içersine yüklendi. 100 bp'lik DNA ağırlık belirtecinin kuyuya yüklenmesinde 1 µl loading Dye, 4 µl dH_2O ile karıştırıldı ve ardından karışım içersine 1 µl DNA ağırlık belirteci (Amresco,100bp DNA MW Marker, Cat. No: K180) eklendi. DNA ağırlık belirteci belirtilen şekilde hazırlanarak kuyuya yüklendi. Kuyulara yükleme yapıldıktan sonra PCR ürünleri 80 V sabit gerilim (Thermo Scientific EC 300 XL) ve 25-30 mA akım koşullarında 100 bp DNA ağırlık belirteci ile birlikte % 1.5'lik Agaroz jelde 25 dakika süre boyunca yürütülmüştür.

PCR ürünlerinin Görüntülenmesi

Yürütülen PCR örnekleri UV ışık (312 nm) altında transilüminatörle (Vilber lourmat) nitel olarak incelendi. *PHOX2B* geninin her üç ekzonu optimize edilen içerik ve termal döngü koşulları ile çoğaltılmıştır. Her bir olgudan izole edilen uygun saflıkta ve konsantrasyonda olan kalıp DNA için üç ekzonun reaksiyonu yapılmıştır.

PHOX2B geni 1. Ekzonu PCR ürününün saptanması

PHOX2B geninin 1 numaralı ekzonu belirlenen koşullar ile çoğaltıldıktan sonra belirtilen şekilde % 1.5 agaroz jel elektroforezinde DNA ağırlık belirteci ile birlikte 25 dakika boyunca yürütüldü. Olgulara ait 1 numaralı ekzonun jel görüntüsü Şekil 14'de gösterildiği gibidir. Pipetleme hatası veya komponentlerin tam olarak reaksiyon karışımına eklenememesi gibi hata durumları nedeni ile reaksiyonda ürün elde edilemeyen olgular tekrar çalışılmıştır.

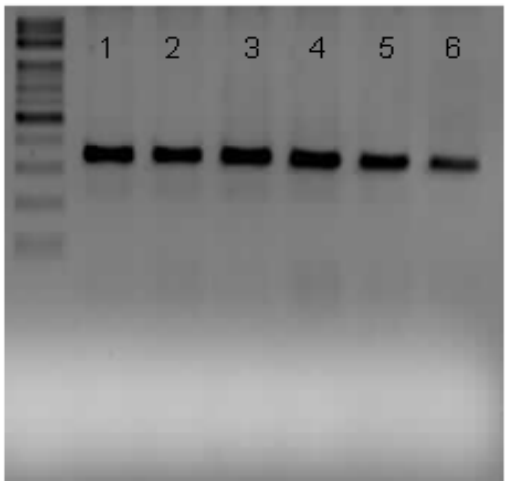


1. 131 numaralı hasta
2. 132 numaralı hasta
3. 133 numaralı hasta
4. 134 numaralı hasta
5. 135 numaralı hasta
6. 136 numaralı hasta

Şekil 14: Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen koşulların olgu üzerine uygulandığı PCR reaksiyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü.

PHOX2B geni 2. Ekzonu PCR ürününün saptanması

PHOX2B geninin 2 numaralı ekzonu belirlenen koşullar ile çoğaltıldıktan sonra belirtilen şekilde % 1.5 agaroz jel elektroforezinde DNA ağırlık belirteci ile birlikte 25 dakika boyunca yürütüldü. Olgulara ait 2 numaralı ekzonun jel görüntüsü Şekil 15'de gösterildiği gibidir. Pipetleme hatası veya komponentlerin tam olarak reaksiyon karışımına eklenememesi gibi hata durumları nedeni ile reaksiyonda ürün elde edilemeyen olgular tekrar çalışılmıştır.

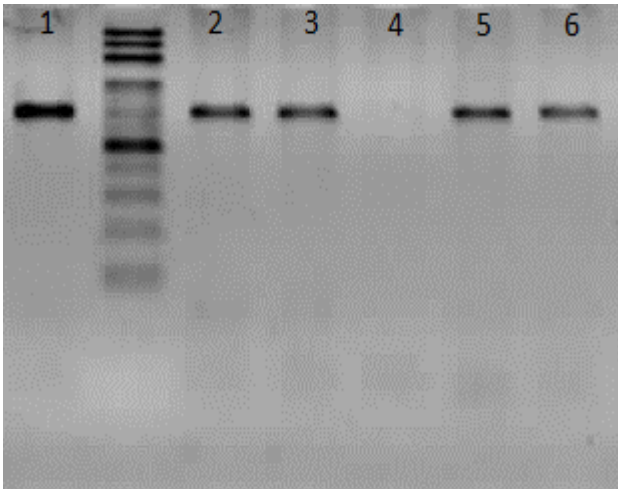


1. 131 numaralı hasta
2. 132 numaralı hasta
3. 133 numaralı hasta
4. 134 numaralı hasta
5. 135 numaralı hasta
6. 136 numaralı hasta

Şekil 15: Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen koşulların olgu üzerine uygulandığı PCR reaksiyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü.

PHOX2B geni 3. Ekzonu PCR ürününün saptanması

PHOX2B geninin 3 numaralı ekzonu belirlenen koşullar ile çoğaltıldıktan sonra belirtilen şekilde % 1.5 agaroz jel elektroforezinde DNA ağırlık belirteci ile birlikte 25 dakika boyunca yürütüldü. Olgulara ait 3 numaralı ekzonun jel görüntüsü Şekil 16'da gösterildiği gibidir. Pipetleme hatası veya komponentlerin tam olarak reaksiyon karışımına eklenememesi gibi hata durumları nedeni ile reaksiyonda ürün elde edilemeyen olgular tekrar çalışılmıştır.



1. 131 numaralı hasta
2. 132 numaralı hasta
3. 133 numaralı hasta
4. 134 numaralı hasta
5. 135 numaralı hasta
6. 136 numaralı hasta

Şekil 16: Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen koşulların olgu üzerine uygulandığı PCR reaksiyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü.

3.6 Q-PCR ile *PHOX2B* Gen Kopya Sayısı Değişiminin Saptanması

Primer tümör örneklerinde *PHOX2B* gen kopya sayısı değişiminin belirlenmesi için "Comperative Cycle of Threshold" metodu SYBR Green yöntemi ile uygulanmıştır. Tümör DNA örneklerinde uygulanan "Comperative Cycle of Threshold" metodunun normalizasyonu için iki referans gen belirlenmiştir. Belirlenen referans genler nöroblastom tümörlerinde rekuran kromozomal anomalilerinin gözlenmediği lokuslar üzerinden seçilmiştir. Kontrol genlerinin bu bölgelerden seçilmesi sonucunda nöroblastom ile ilişkili delesyon veya kazanımdan dolayı meydana gelebilecek değişimin kopya sayısı üzerine olan yanıltıcı etkisi ortadan kaldırılacaktır. Referans genlerin seçiminde "Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification" (MLPA) yönteminde kullanılan 19q13 ve 20q13 referans lokusları belirlenmiştir (Salsa MLPA Kit P251-B1/P252-B1/P253-B1 Neuroblastoma, MRC-Holland). Biomart veri tabanı (http://www.biomart.org) yardımı ile referans genler için belirlenen lokuslarda, miyelin ilişkili glikoprotein (*MAG*) ve sülfataz 2 (*SULF2*) genleri metodunun normalizasyonu için referans olarak kullanılmıştır.

PHOX2B gen kopya sayısı değişiminin belirlenmesinde veri analizinin doğruluğunun ispatlanmasına yönelik olarak 1p36 delesyonu ve 17q kazanımı olduğu bilinen olgular pozitif kontrol olarak çalışılmıştır. KB.SAG.2007.023 numaralı proje kapsamında MLPA yöntemi ile 1p36 delesyonu ve 17q artışı saptanan olgularda *CHD5* ve *TOB1* genleri "Comperative Cycle of Threshold" metodunda pozitif kontrol hedefi olarak belirlenmiştir. *MAG*, *SULF2, CHD5, TOB1* ve *PHOX2B* genleri için primerler web üzerinden servis sağlayan "PimerQuest" programı ile tasarlanmıştır (http://eu.idtdna.com/scitools/applications/primerquest/default .aspx).

SYBR Green (QPCR) yönteminde primerlerin oluşturduğu ürün büyüklüklerinin 90-150 bp aralığında olmasına dikkat edilmiştir. Bu yöntemde reaksiyonun verim değerini (E value) etkileyebilecek parametreler primerlerin Tm, % GC içeriği ve ΔG değerlerine bağlı bir şekilde değişmektedir. "Comperative Cycle of Threshold" metodunda hem hedef hem de referans gen primerlerinin birbirlerine yakın E değerini (-3.6 > slope > -3.1) gösterebilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle kullanılacak primer çiftleri mümkün olduğunca benzer Tm, % GC ve ΔG değerlerine sahip olmalıdır. Her gen için tasarlanan primer çiftlerinin Tm derecesi 55-60 ^{o}C aralığında olmakla birlikte % 50 guanin ve sitozin yüzdesi göstermektedir.

Q-PCR reaksiyonunda hedef dizinin çoğaltımını sağlayacak oligonükleotidlerin reaksiyon içersinde ısı alınımı ile ikincil yapı oluşturmaması gerekmektedir. Oligonükleotid dizisi üzerinde yer alan nükleotidlerin oluşturduğu serbest entalpi değeri (Gibbs free energy = ΔG) ile çevre ısı değeri arasında denge durumunda olması ikincil yapı oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte serbest entalpi değerinin (ΔG) negatif olduğu durumda, kendiliğinden meydana gelen ikincil yapının bozulumu için ısı verimi ihtiyacı reaksiyonda bu dengenin bozulumuna engel oluşturmaktadır. Bu nedenle primerlerin oluşturabileceği ikincil yapıların önlenebilmesi için ΔG değerinin pozitif bir sayı değeri göstermesi gerekmektedir. Hedef dizi içeriğine bağlı olarak bölge içersinden tasarlanan primerlerin ΔG değerinin pozitif bir sayı değeri göstermediği durumlarda mümkün olduğunca en küçük negatif sayı değerini taşıyan primer çiftleri seçilmiştir.

Uygun parametreler ile tasarlanan primerlerin gen dizisi üzerinde gösterilerek doğrulanmasının yapılması ise FastPCR programı aracılığı ile yapılmıştır. Tasarlanan primerlerin hedef dizinin dışında başka bir diziye hibridize olup olmadığı öncelikle NCBI/Blast.cgi veri tabanı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ve deney aşamasında reaksiyon sonunda gerçekleştirilen "melting curve" analizi ile incelenmiştir. Uygun parametreler doğrultusunda ve hedef dizi dışında başka bir diziye etkileşimi ürün meydana getirmeyecek primerlerin reaksiyon verimini etkileyebilecek ikincil yapılar MFOLD yazılımı ile irdelenmiştir (http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form).

3.6.1 *PHOX2B* Geninin Q-PCR ile Çoğaltılması

Q-PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 120 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

```
1141 ctttctcagc ggaggaagcc gcctTTCCGC CCGTATATAG GAAGCCTtga ttgcatttga
1201 aaatggaaat gtgtttagta tttaccaaac gaaatttgct tacacaaatg aaagaattta
1261 tCACGTTTGA AGCGATTGCA GGGAggggta attcacttac agggttacac tatcctagtc
1321 acacccgaac cgcccacaaa attatcttaa gctgccaaaa tgataggcat aatttattta
```

Şekil 17: *PHOX2B* geninde primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge).

3.6.2 MAG Geninin Q-PCR ile Çoğaltılması

Q-PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 96 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

6961 ttgacttccc ggatgagctg cggcccgctg **TGGTGCATGG TGTCTGGTAC TT**caatagcc
7021 cctaccccaa gaactacccc ccggtggtct tcaagtcgcg caccc**AAGTA GtCCACGAGA**
7081 **GCTTCCA**ggg ccgcagccgc ctcctggggg acctgggcct gcgaaactgc accctcctgc

Şekil 18: *MAG* geninde primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge).

3.6.3 SULF2 Geninin Q-PCR ile Çoğaltılması

Q-PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 97 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

20366 agt**ACGTCCA CAACCACAAC ACCTA**caccaa caatgagaac tgctcctcgc cctcctggca
20426 ggcacagcac gagagccgc**A CCTTTGCCGTG TACCTCAA**ta gcactggcta ccggacaggt

Şekil 19: *SULF2* geninde primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge).

3.6.4 CHD5 Geninin Q-PCR ile Çoğaltılması

Q-PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 145 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

37501 gcgtgtctga accgctgcct cccctgcagc ccacg**GTCAA GTTGCACAAG CAGCCAT**ggt
37561 acatcgactc cacaggcggc acactgcacc cgtaccagct ggagggcctc aactggctgc
37621 gcttctcttg ggcccagggc actgacacca tcctggccg**A TGAGATGGGT CTGGGCAAGA**

Şekil 20: *CHD5* geninde primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge).

3.6.5 TOB1 Geninin Q-PCR ile Çoğaltılması

Q-PCR reaksiyonu sonucunda primerlerde dahil olmak üzere 124 bp'lik amplikonlar oluşturulmuştur.

301 atcttagtgt ttggatcgac ccatttgagg tttcttacca aattggtgaa aagggac**CAG**
361 **TGAAGGTGCT TTACGTGGA**t gataataatg aaaatggatg tgagttggat aaggagatca
421 **aaaacagctt taacccagag gcccaggttt ttatgcccat AAGTGACCCA GCCTCATCAG**
481 **T**gtccagctc tccatcgcct ccttttggtc actctgctgc tgtaagccct accttcatgc

Şekil 21: *TOB1* geninde primerlerin eşleştiği dizilerin gösterimi (koyu ve büyük harf ile gösterilen bölge).

3.7 Q-PCR reaksiyonunda kullanılan komponentler

Primerlerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan primer dizileri Alpha DNA ve Metabion şirketleri aracılığıyla elde edilmiştir. Sentezlenen oligonükleotidler HPLC yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra liyofilize bir şekilde gönderilmiştir. Liyofilize gelen tüm primerler firmanın gönderdiği konsantrasyon bilgisi doğrultusunda son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde DNase ve RNase free steril distile su (Biologıcal Industries Ultra Pure Water, Cat. No: 01-866-1A) ile çözüldü. Ara stok olarak her primer 10 pmol/µl olacak şekilde 1:10 oranında DNase ve RNase free steril distile su (Biologıcal Industries, Cat. No: 01-866-1A) ile seyreltildi. Hazırlanan ara stok 200 µl hacimlere bölünerek ana stokla birlikte -20 C^{o}'ye kaldırıldı.

DNase ve RNase Su (Roche,04 707 516 001)

Her bir reaksiyon için 5 µl hacimde kullanılmıştır.

SYBR Green Master Mix 2X (Roche, 04 707 516 001)

20 µl reaksiyon hacminde 10 µl hacimde kullanılarak 2X konsantrasyondan X konsantrasyonuna indirilmiştir.

3.7.1 Q-PCR Reaksiyonunun Hazırlanışı

Q-PCR reaksiyonunun toplam hacmi 20 µl olacak şekilde kuruldu. QPCR reaksiyonu için 96 kuyucuklu plaka (Roche, Cat. No: 04729692001) kullanılmıştır. Reaksiyon kurulurken su, primer ve "SYBR Green" ana karışım halinde hazırlanıp toplam hacimde gerekli miktarlarda dağıtılmıştır. PCR hazırlanışı esnasında gerekli olan komponentler soğuk blok üzerinde tutulmuştur. Reaksiyon karışımı hazırlanırken yavaş bir şekilde pipetaj yapılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımına vortex uygulanmamıştır. Homojenize edilen reaksiyon karışımı plaka üzerinde bulunan kuyulara dağıtıldı. Her bir kuyuya reaksiyon karışımı dağıtıldıktan sonra karışım köpürtülmeden kalıp DNA eklendi ve 2-3 kez dikkatlice pipetaj yapıldı. Well-plate "Light Cycler" cihazına (Roche LC 480) zaman kaybedilmeden yerleştirilerek Q-PCR reaksiyonu başlatıldı.

Tablo 9: Q-PCR reaksiyonunda 20 µl hacimde önerilen bileşen miktarları

Komponentler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	20 µl Reaksiyon Hacmi
Master Mix	2X	1X	10.0 µl
Su	-	-	5.0 µl
İleri Primer	10 pmol/µl	0.5 pmol/µl	1.0 µl
Geri Primer	10 pmol/µl	0.5 pmol/µl	1.0 µl
Kalıp DNA		20ng/µl	3.0 µl

3.7.2 Q-PCR Şartları ve Standart Eğri

Q-PCR reaksiyonu için sentezlenen oligonükleotid primerlerin her bir seti için standart eğri (Standart Curve) oluşturulmuştur. Standart eğrinin oluşturulmasına yönelik deneyde primerlerin hedefi için kopya sayısı değişimi olmayan ve 100 ng/µl konsantrasyona sahip kontrol DNA 1/2 oranında 5 kez seri olarak dilüye edilmiştir. Yapılan dilüsyon sonucunda 50 ng/µl, 25 ng/µl, 12,5 ng/µl, 6,25 ng/µl ve 3,125 ng/µl konsantrasyonlara sahip 5 dilüsyon noktası oluşturulmuştur. Hazırlanan PCR reaksiyonun termal profilinin belirlenmesinde standart "Light Cycler" termal profili üzerinden gidilmiştir. Her bir QPCR reaksiyonu 20 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonundan özgül olmayan ürünlerin belirlenmesine yönelik olarak "Melting Curve" analizi yapılmıştır.

Tablo 10: Her bir primer çifti için gerçekleştirilen reaksiyon ve **"**melting curve" analizi koşulları

Bileşenler	**Miktar**	**TERMAL PROFİL**		
Master Mix	10 µl	**Basamak**	**Süre**	**Sıcaklık**
Forward Primer	1.0 µl	Denatürasyon	10 dakika	95 C^o
Revers Primer	1.0 µl	**X 45 Döngü**		
Su	5.0 µl	Denatürasyon	10 saniye	95 C^o
Kalıp	3.0 µl	Annealing	10 saniye	60 C^o
		Extension	5 saniye	72 C^o

"Melting Curve Analizi"			
Sıcaklık C^o	Uygulama	Süre	Isı Değişimi (C^o/Sn)
95	Yok	1 sn	4.40
40	Yok	20 sn	2.20
95	Devamlı	-	0.11

Reaksiyonun verim değeri (E value) $E= 10^{(-1/slope)}$ formülü ile hesaplanmıştır. Reaksiyonun eksponansiyel olarak gerçekleştiğinin göstergesi olarak, kabul edilebilir verimlilik sınırları ("E-value") % 90-100 aralığında olmalıdır. -3.1 ile -3.6 arasında değişen "slope" değeri oluşturulan logaritmik kalıp miktarlarında alınan Ct (Cycle of Threshold) değerleri ile ilişkilidir (M. Tefik Dorak, Real-Time PCR, ISBN:0203967317). Bu nedenle tekrarlanabilir ve doğru sonuç alabilmek için her primer seti için oluşturulan konsantrasyonlarda yakın Ct değerlerinin alınabilmesi gerekmektedir. Primer seti için alınan E değeri % 90'nın altında ise optimizasyon basamakları gerçekleştirilmelidir. E değerinin hesaplanmasında x;y koordinat ekseni oluşturulmuştur. Koordinat eksenlerinde x değerleri logaritmik kalıp miktarını (Log_2) y değeri ise belirlenen kalıp miktarında alınan Ct değerini belirtmektedir. X ve Y değerlerine bağlı olarak standart eğri y = mx + b doğrusal regresyon formülü ile oluşturulmuştur. Formülde y değeri Ct değerini temsil ederken m değeri eğimi (slope), x değeri ise kalıp miktarını temsil etmektedir. Formülde b değeri logaritmik kalıp miktarının sıfır olduğu durumda elde edilen Ct değerini belirtmiştir.

A)

Error: 0.00177

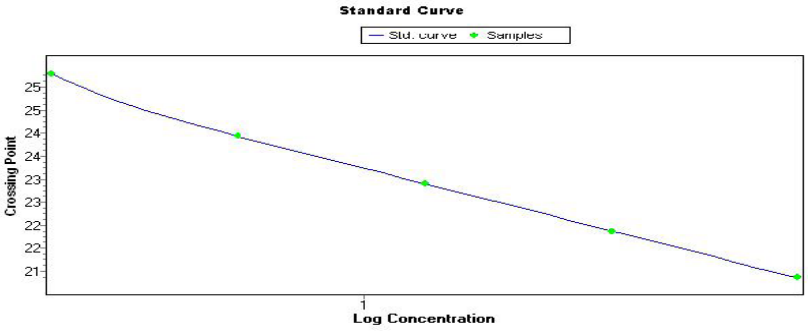
Efficiency: 1.961

Slope: -3.420

YIntercept: 26.97

Link: 0.000

.



B)

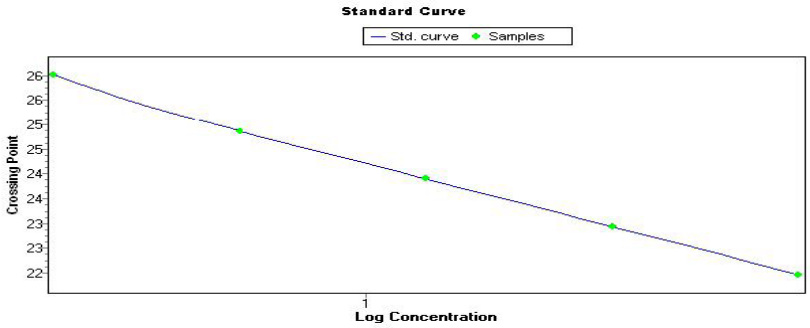
Error: 0.000678

Efficiency: 2.050

Slope: -3.209

YIntercept: 27.59

Link: 0.000



C)

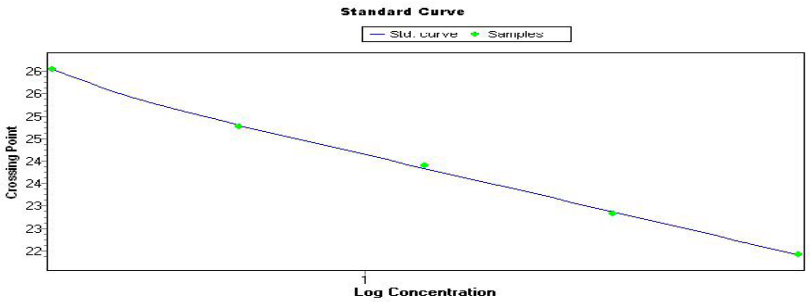
Error: 0.00522

Efficiency: 2.051

Slope: -3.205

YIntercept: 27.61

Link: 0.000



D)

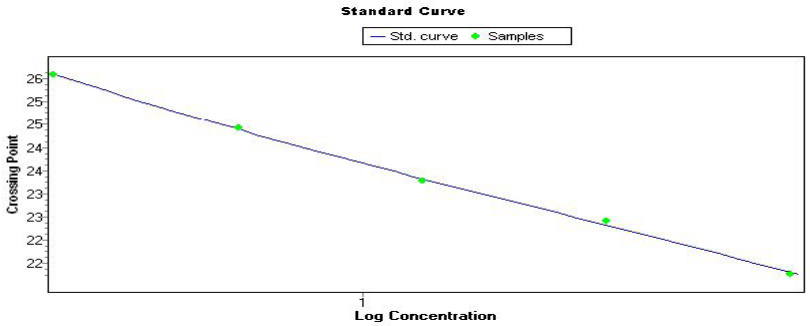
Error: 0.00736

Efficiency: 1.989

Slope: -3.348

YIntercept: 27.28

Link: 0.000



Şekil 22: *CHD5* (A) , *TOB1* (B), *PHOX2B* (C) ve *MAG* (D) genleri için oluşturulan standart eğri grafikleri ve E değerleri

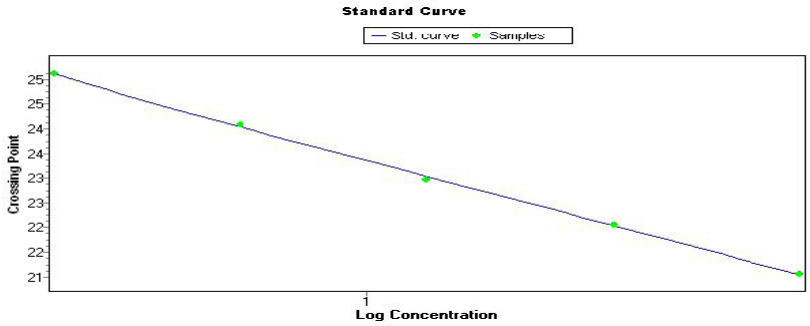
Error: 0.00542

Efficiency: 2.003

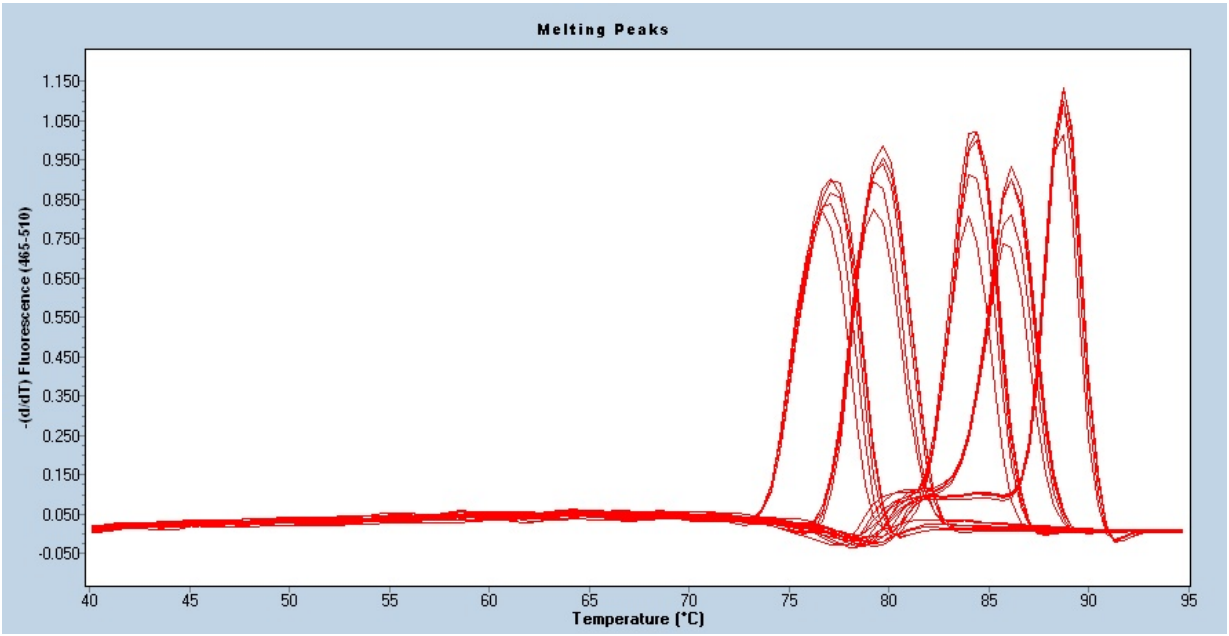
Slope: -3.316

YIntercept: 26.75

Link: 0.000



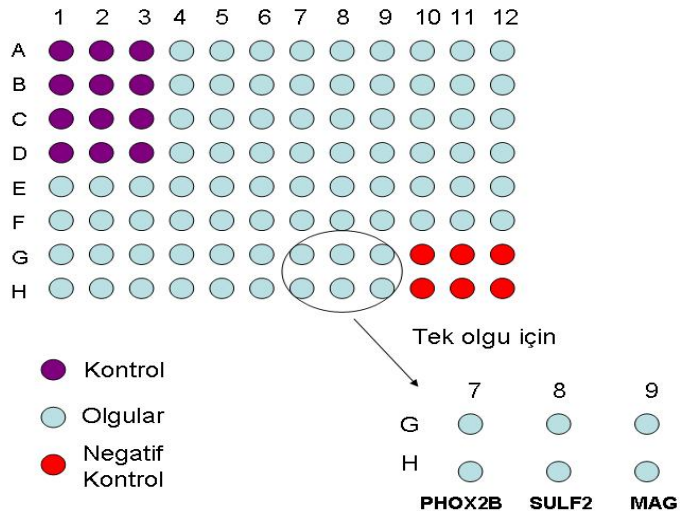
Şekil 23: *SULF2* geni için oluşturulan standart eğri grafiği ve E değeri



Şekil 24: *CHD5*, *TOB1, PHOX2B, MAG* ve *SULF2* genlerine ait "melting curve" pikleri gösterilmektedir. Her bir primer çifti için elde edilen ürünün "melting curve" piklerinin özgül olması reaksiyonda primer dizilerinin başka bölgeye bağlanmadığını göstermektedir.

3.7.3 Q-PCR Pozitif Kontrol ve Olgular İçin Hazırlanan Deney Kurgusu

Pozitif kontroller (delesyon ve kazanım) ve olgular için kopya sayısı değişiminin saptanmasında "comperative Ct" metodu "syber green" deteksiyon yöntemi ile uygulanmıştır. Reaksiyonlar LC 480 cihazında (Roche) 96 well-plate üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle kopya sayısı değişimi bilinen kontrol örnekleri ve kopya sayısı saptanacak olan olgu gruplarında deney tasarımı; PCR reaksiyon tekrarları, örnek sayısı, kalibrator örnek sayısı ve referans gen sayısı dikkate alınarak yapılmıştır. Kopya sayısının saptanmasına yönelik çalışmada her bir reaksiyon aynı miktarda kalıp DNA içermektedir. 40 ng/µl konsantrasyonda hazırlanmış kalıp DNA örnekleri Q-PCR reaksiyonu için 20 ng/ µl konsantrasyona düşürülmüştür. 20 ng/µl konsantrasyonda hazırlanan kalıp miktarı hem kalibratör örnek hem de olgular için 3 µl olarak eklenmiştir.



Şekil 25: Pozitif kontrol ve olgu grubu için hazırlanan "well-plate" kurgusu

Kopya sayısının belirlenmesinde belirtilen *MAG* ve *SULF2* genleri her olguda iç kontrol olarak normalizasyonda kullanılmıştır. Kurgulanan Q-PCR temelli kopya sayısı deneyi iki tip kontrol içermektedir. Tasarlanan deney sisteminde her kuyucuk reaksiyon içeriğini oluşturan (su, "syber green mix", primer) bileşenlerde DNA kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek için negatif kontrol içermektedir.

Bununla birlikte diploid kromozom setine sahip olan iki ayrı normal bireyden elde edilmiş DNA örneği veri analizinde referans noktası (2 kopya) oluşturmak için kullanılmıştır. Veri analizde kalite kontrolü için her reaksiyon ikili olarak ("duplicate") kurgulanmıştır.

3.8. Araştırma Planı ve Takvimi

Çalışmanın süresi 18 ay olarak planlanmıştır. Çalışma çizelgesi aşağıda gösterildiği gibidir.

Tablo 11: Araştırmanın ön görülen çalışma süresi

Ay	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**	**16**	**18**
Literatür İzleme									
Hazırlık									
Deney Optimizasyonları									
Veri Toplama									
Veri Analizi									
Çözümleme									
Tez ve Makale Yazımı									

3.9. Verilerin Değerlendirilmesi

3.9.1 DNA Dizi Analizi ve Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

PCR reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin ilk dizi analizi yalnızca ileri primerler kullanılarak otomatize sekans cihazı 3730 XL (ABI) ile gerçekleştirildi (Macrogen Inc). İlk dizi analizi sonucuna göre mutasyon veya SNP saptanan bireyler için tekrar PCR reaksiyonu kurularak ileri ve geri primerler ile dizi analizi yapıldı. DNA dizi sekans sonuçları ab1, scf, pdf, txt ve elektrogram dosya formatları olarak elde edilmiştir. Nöroblastom olgularında *PHOX2B* geni ekzonlarında olası meydana gelen nükleotid değişimlerinin saptanması için "Chromas Pro 1.5" ve "Mutation Surveyor V3.30" programları kullanılmıştır. "Chromas Pro 1.5" ile ab1 uzantılı veri dosyası kullanılarak sekans sonucunun, NCBI/blast.cgi veri tabanında kayıtlı olarak bulunan *PHOX2B* geni (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) dizisi ile karşılaştırılması için kullanılmıştır. Bu programla karşılaştırma analizi nükleotid dizisi düzeyinde yapılmıştır. Bununla birlikte her değişim bu metod ile bulunamamaktadır. "Chromas Pro 1.5" yazılımı ile ön analiz yapıldıktan sonra her olgunun üç ekzonu için mutasyon analizi "Mutation Surveyor V3.30" programı ile gerçekleştirildi. Program NCBI veri tabanı üzerinden *PHOX2B* gen sekans dizisininin .gbk uzantılı verisi ile sekanslama sonucunda elde edilen ab1 uzantılı verinin pik alanı üzerindeki değişimini değerlendirmektedir. Mutation Surveyor yazılımında pik değişimi değeri 0.3 - 0.5 ise heterozigot değişimleri, 1.0 ise homozigot nükleotid değişimini göstermektedir.

3.9.2 QPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Veri Analizi

PHOX2B gen kopya sayısının saptanması için QBASE plus 2 yazılımı kullanılmıştır. Veri analizinin QBASE plus 2 ile gerçekleştirilebilmesi için reaksiyon sonunda elde edilen Ct değerlerinin RDML uzantılı dosya formatına dönüştürülmesi gerekmektedir (www.rdml.org). Kopya sayısının saptanmasında kullanılan QBASE plus 2 veri analizini ΔΔCt formülü üzerinden E değerini kullanarak yapmaktadır (83, 84). ΔΔCt formülü aşağıda belirtilen şekilde tanımlanmıştır.

$$Xn = X_0 \times (1+E_X)^n \quad [1]$$

Bir numaralı formül exponansiyel PCR amplifikasyonunu tanımlamaktadır. Belirtilen formülde; Xn, n döngü sonrasında elde edilen PCR ürününü, Xo ise başlangıç kalıp miktarını nitelemektedir. PCR verimi Ex ve reaksiyonun döngü sayısı da n'dir. Q-PCR reaksiyonunda ürün miktarının belirlenebildiği ilk döngü Ct ("threshold cycle") ise 1 numaralı formül;

$X_T = X_0 \times (1+E_X)^{CT,X} = Kx$ [2] şeklinde yazılabilir.

İki numaralı formülde hedef gen için X_T; Q-PCR reaksiyonunda ilk sinyal alımının gerçekleştiği ürün miktarı $C_{T,X}$; sinyal alımının gerçekleştiği döngü numarasıdır. İki numaralı formül ile K_X sabiti elde edilmektedir. Aynı formül referans genler için uygulandığında;

$R_T = R_O \times (1+E_R)^{CT,R} = K_R$ [3] sabiti elde edilmektedir. 2 ve 3 birbirleri ile oranlanırsa;

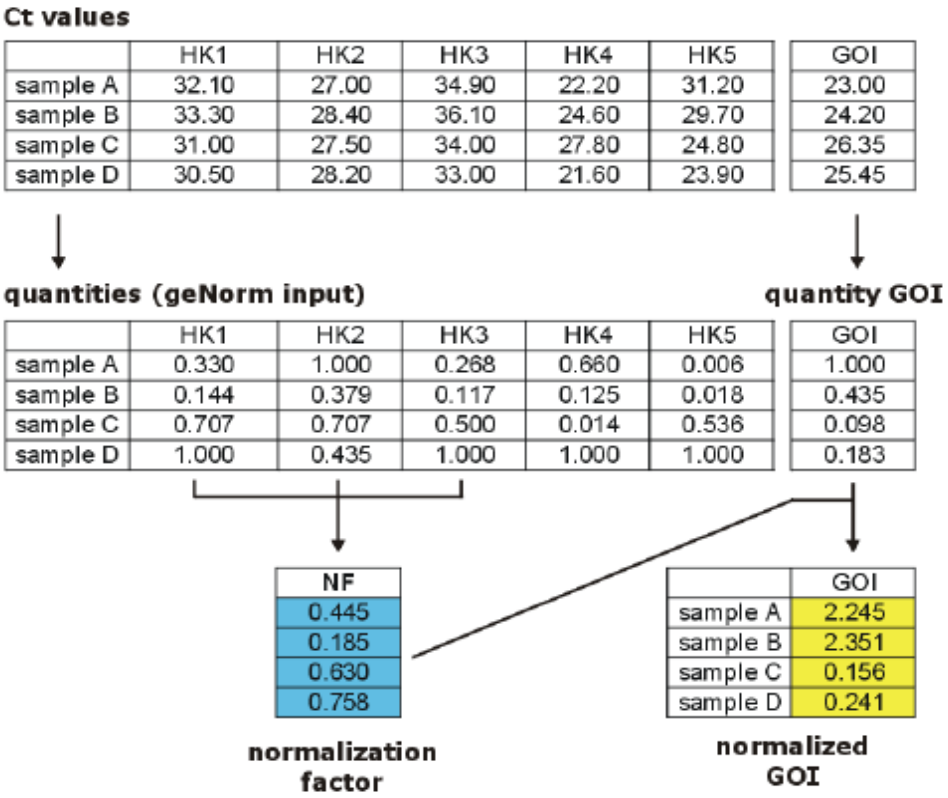
$Xo/Ro \times (1+E)^{CT,X-CT,R} = K$ [4] elde edilir. PCR ürününün referans gen ile normalize edildiği Xo/Ro yerine Xn (normalize edilmiş ürün miktarı), $C_{T,X}$- $C_{T,R}$ farkı ΔCt ile ifade edilirse dört numaralı formül $X_N = K \times (1+E)^{-\Delta Ct}$ [5] formülüne indirgenir. Referans ve hedef genin E değerleri kopya sayısının hesaplanmasında dikkate alınacak ise formül;

$$\frac{(E_{ref})^{CP\ olgu}}{(E_{hedef})^{CP\ olgu}}$$ [5] şeklinde yeniden düzenlenir.

Verinin normalizasyonu kalibratör örneğe göre yapılacağı için her hangi bir örneğin kontrole oranı ise E değerine bağlı olarak diploid kopya sayısını vermektedir.

$$\text{Diploid kopya sayısı} = \frac{\dfrac{(E_{ref})^{CP\ olgu}}{(E_{hedef})^{CP\ olgu}}}{\dfrac{(E_{ref})^{CP\ kalibratör}}{(E_{hedef})^{CP\ kalibratör}}}$$

PHOX2B kopya sayısının saptanmasına yönelik çalışmada referans ve hedef genlerin E değerlerinin analizde sapma yaratmayacak kadar birbirlerine yakın olmasından dolayı 2 standart değeri (% 100 verim) ile analiz yapılmıştır. Bununla birlikte elde edilen oranlar deney bütününde aynı referansların farklı olgulardan elde edilen relatif kantifikasyonuna bağlı normalizasyon değeri olmaksızın kopya sayısını vermektedir. Veri analizinde referanslara bağlı olarak normalizasyon faktörünün elde edilmesi için QBASE plus 2 yazılımında yer alan geNORM analizi kullanılmıştır. geNORM analizi ile elde edilen M değeri aynı referans genin diğer olgularda göstermiş olduğu relatif kantifikasyon sonucundaki farka dayalı olarak kullanılan referansların analizdeki stabilitesini saptamaktadır (85). Elde edilen M değeri 1 değerine ne kadar yakın ise kopya sayısı analizinde elde edilen verinin hatalı olma olasılığı da o kadar artmaktadır. QBASE plus 2 ile gerçekleştirilen analizlerde M değerinin 0.2'nin altında olması önerilmiştir (85). Bununla birlikte geNORM normalizasyon faktörünün hesaplanmasında aşağıda belirtilen şekilde kullanılmaktadır (86).



Şekil 26: Normalizasyon faktörünün hesaplanması ve hedef gen için elde edilen relatif kantifikasyon değerinin referans genler ile normalize edilmesi (geNORM user guide update on July 8, 2008).

Şekil 26'da A, B ve C örneği için M değeri en uygun olan HK1, HK2 ve HK3'ün ΔCt değerinin her bir örneğin kendi içinde geometik ortalaması alınarak normalizyon faktörü (0,445) hesaplanmaktadır. Elde edile verinin A numaralı örnek için hedef ΔCt değerine bölünmesi ile kopya sayısına ait veri (2,245) normalize edilmektedir. M değerinin belirlenmesi ise aşağıda belirtilen şekilde hesaplanmıştır(86).

j ve *k,* A deneyinde m tane örnek için kullanılan iki referans gen ise A deneyinde M faktörü her iki referansın ΔCt değerleri oranının (a_{ij}/a_{ik}) $\log_2$ tabanına göre düzenlenmesi ile hesaplanır.

J ve *k* farklı iki referans gen ise

$A_{jk} = \{\log_2 (a_{1j}/a_{1k}), \log_2 (a_{2j}/a_{2k}), \ldots\ldots\ldots\ldots \log_2 (a_{mj}/a_{mk})\}$ [1]

Birinci örnekten m kadar örneğe Log_2 ortak tabanına alındığında;

$A_{jk} = \{\log_2 (a_{ij}/a_{ik})\}_{i=1 \longrightarrow m}$ [2] elde edilir.

J ve *k* refrans genleri ile yapılan A deneyinde ikili değişimler tanımlanır ve standart sapma olarak değerlendirilse;

V_{jk} = standart sapma (A_{jk})

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^{n} V_{jk}}{n-1}$$ formülü elde edilerek M değeri hesaplanır.

Normalizasyon faktörünün standart sapması ise;

$SD = E^{\text{delta Ct}} \times \ln E \times SD \text{ sample Ct}$ [1] ($E^{\text{referans minimum Ct- referans olgu Ct}}$) lnE ampilifikasyon veriminin logaritma değerini belirtmektedir.

SD NFn = NFn x $\sqrt{(\text{SD ref1/Ref1 geo.ort.}) + (\text{SD ref2/Ref2 geo.ort.})}$ [2] formülü ile hesaplanmaktadır (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/). QBASE plus 2 yazılımı ile yapılan analizde diploid kopya sayısı için 1.41 değeri ve altı delesyon olarak kabul edilir iken 2.44 ve üstü artış olarak kabul edilmektedir. Belirtilen deney tasarımı ve analiz yönteminin uygulanabilirliği için 1p delesyonu ve 17q artışı MLPA yöntemi ile belirlenmiş nöroblastom olguları çalışmıştır. 1p delesyonuna sahip 5 nöroblastom olgusuna (143, 180, 196, 207 ve 217) ait QPCR verisi MLPA verileri ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 12: 1p Delesyonu varlığı bilinen olgularından elde edilen kopya sayısı verileri

Olgu Numarası	QPCR Kopya Sayısı	Standart Sapma	Normalizasyon Faktötü	QPCR Delesyon Eşik Değeri	MLPA Verisi	MLPA Delesyon Eşik Değeri
143	1,03	1,93E-02	0,896	1,41	0,66	0,83
180	**0,848**	2,08E-02	0,738	1,41	0,39	0,83
196	**1,059**	3,01E-02	1,445	1,41	0,37	0,83
207	1,057	1,10E-02	0,611	1,41	0,59	0,83
217	1,023	1,38E-02	1,118	1,41	0,53	0,83

1p delesyonu bilinen nöroblastom olgularında yapılan metod doğrulama çalışmasında delesyonun varlığı gösterilmiştir. Yapılan pozitif kontrol çalışmasında elde edilen en küçük değer 0,848 iken en büyük değer 1,059 olarak saptanmıştır. Q-PCR metodu ile kopya sayısı saptanmasında 2005.KB.SAG.016 numaralı projeden elde edilen işitme kaybı hastalarına ait ve kopya sayısı değişimi olmayan bireylerden alınan perifeik kan materyalinden elde edilmiş DNA materyali diploid kopya sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır. Seçilen yöntem ile delesyonun saptanmasının ardından metod normal kopya sayısının saptanmasında 25 işitme kaybı hastası ile sorgulanmıştır.

Tablo 13: İşitme kaybı hastalarına ait periferik kandan izole edilmiş diploid kopya sayısına sahip DNA materyalinden elde edilen Q-PCR sonuçları

Olgu Numarası	QPCR Kopya Sayısı (PHOX2B)	Standart Sapma	Normalizasyon Faktötü	QPCR Normal Birey Değer Aralığı	Diploid Kopya Sayısı
K116	**1,612**	0,077	1,125	1,41-2,44	2
K118	1,761	0,142	1,008	1,41-2,44	2
K129	1,9	4,44E-02	0,569	1,41-2,44	2
K130	1,959	4,21E-02	0,857	1,41-2,44	2
K133	2,072	0,058	0,934	1,41-2,44	2
K140	1,89	0,075	1,125	1,41-2,44	2
K141	1,842	0,051	1,123	1,41-2,44	2
K143	1,94	0,089	1,103	1,41-2,44	2
K150	2,03	2,98E-02	1,228	1,41-2,44	2
K156	1,818	0,055	0,989	1,41-2,44	2
K160	1,657	0,1	1,086	1,41-2,44	2
K162	1,815	1,91E-02	0,964	1,41-2,44	2
K165	1,828	2,70E-02	0,988	1,41-2,44	2
K174	**2,258**	4,96E-02	0,533	1,41-2,44	2
K175	1,716	4,72E-02	0,763	1,41-2,44	2
K179	1,692	0,066	1,028	1,41-2,44	2
K194	1,683	1,07E-01	0,614	1,41-2,44	2
K283	1,772	0,064	0,884	1,41-2,44	2
K285	2,028	3,33E-02	1,005	1,41-2,44	2
K286	2,042	0,1	1,044	1,41-2,44	2
K287	2,071	5,80E-02	0,954	1,41-2,44	2
K289	1,834	0,052	1,111	1,41-2,44	2
K290	1,929	6,40E-02	0,989	1,41-2,44	2
K298	1,939	2,18E-02	0,769	1,41-2,44	2
K304	1,905	4,67E-02	0,987	1,41-2,44	2

Diploid kopya sayısına sahip DNA materyali ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen en küçük değer 1,612 iken en büyük değer 2,258 olarak saptanmıştır. QBASE plus 2 yazılımında diploid kopya sayısı için belirlenen üst sınırın (2,44) veri analizinde kullanılmasında bir sakınca görülmemiştir. Bununla birlikte delesyon ve normal bireylere ait kopya sayısının belirlenmesinde seçilen yöntem ve analiz metodu doğrulanmıştır.

Tablo 14: 17q artışı varlığı bilinen olgularından elde edilen kopya sayısı verileri

Olgu Numarası	QPCR Kopya Sayısı (TOB1)	Standart Sapma	Normalizasyon Faktötü	QPCR Artış Eşik Değeri	MLPA Verisi	MLPA Artış Eşik Değeri
30	3,862	0,104	1,234	2,44	1,83	1,2
52	6,302	0,463	1,331	2,44	1,88	1,2
160	5,043	0,223	0,338	2,44	1,91	1,2
200	3,504	0,107	1,318	2,44	1,91	1,2
206	2,734	0,113	1,088	2,44	2,44	1,2
210	3,553	0,082	0,673	2,44	1,83	1,2
215	4,211	0,061	1,789	2,44	1,92	1,2

17q artışı saptanan bireylerde MLPA yöntemi ile elde edilen artış verisi Q-PCR metodu ile doğrulanmıştır. Bununla birlikte yöntem kopya sayısı artışını tespit etmekte ancak MLPA metodu ile elde edilen verilere kıyasla farklı artış değerleri göstermektedir. 30 ve 52 numaralı olguların MLPA veri değeri birbirine çok yakın olmasına rağmen (1,83 ve 1,88) iki olgu için Q-PCR metodu ile elde edilen veri arasında farklılık (3,862 ve 6,302) gözlenmiştir. Belirlenen referans genler nöroblastom tümörlerinde rekuran kromozomal anomalilerinin gözlenmediği lokuslar üzerinden seçilmiştir. Kontrol genlerinin bu bölgelerden seçilmesi sonucunda nöroblastom ile ilişkili delesyon veya kazanımdan dolayı meydana gelebilecek değişimin kopya değişimi üzerine olan yanıltıcı etkisinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Ancak bir tümör dokusundan diğer bir tümör dokusuna farklılık gösterebilen kromozom seti sayısı nedeni ile referans genlerin bulunduğu kromozomların set artışından etkilenmesi kopya sayısı artışı gözlenen olgular için yanıltıcı etki oluşturabilir. Bununla birlikte yöntem ve analiz metodu ile 17q artışının varlığı tespit edilmiştir.

QBASE plus 2 yazılımı ile yapılan veri analizinde M değerinin varlığı (≤0.2) ve her bir reaksiyonun ikili olarak (duplicate) yapıldığı deneyde tekrarlar arasındaki Ct değeri farkının 0,5'in üstüne geçmemesine dikkat edilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Nöroblastik tümör örneklerinin elde edildiği KB.SAG.2007.023 numaralı proje Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurul'undan 23.07.2007 tarihinde alınan 274 sayılı karar ile onaylanmıştır. DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından KB.SAG.2009.086 sayı ile desteklenen "Nöroblastom Olgularında Edinsel *PHOX2B* Mutasyonlarının Saptanması ve Tümör Davranışı ile Birlikteliğinin Araştırılması" isimli proje DEÜ Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurul'undan 30.07.2009 tarihinde alınan 256/2009 sayılı karar ile onaylanmıştır. Nöroblastik tümör örneklerinin elde edildiği KB.SAG.2005.016 numaralı proje Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurul'undan 21.12.2004 tarihinde alınan 565 sayılı karar ile onaylanmıştır.

3.11. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada mutasyon analizi yalnızca olgular üzerinde yapılmıştır. Çalışmada normal bireylerin dahil olduğu bir kontrol grubu yer almamaktadır. Nükleotid değişimi saptanan verilerin kontrolü NCBI veri tabanı üzerindeki normal *PHOX2B* gen (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) dizisi ile karşılaştırılmıştır. Nükleotid değişimi gözlenen olgularda verinin doğrulanması için PCR reaksiyonu tekrar kurularak elde edilen sekans ürünü mutasyon analizi ile tekrar incelenmiştir. Olguların ebeveynlerine ait DNA materyali çalışma kapsamı dışında olduğu için belirlenen mutasyonların ailesel olarak aktarımına dair hiçbir çıkarım yapılamamaktadır.

Q-PCR metodu ile kopya sayısının belirlenmesinde Syber Green deteksiyon yönteminin dezavantajı elde edilecek veri doğruluğunun primerlerin özgüllüğü ve verim (E=Efficiency) değeri ile sınırlı kalmasıdır. Syber Green deteksiyon yönteminin kopya sayısı belirlenmesinde kullanılabilmesi için primerlerin birlerine yakın "anneling" sıcaklığı ve ΔG değeri göstermesi (negatif olmamak koşulu ile) gerekmektedir.

Q-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünün ve primerlerin ΔG değerine bağlı olarak gösterdiği ikincil yapılar reaksiyonun verimi direkt olarak etkilemektedir. "Comperative Ct metod" analiz yöntemi için primerlerin gösterdiği E değeri arasındaki farkın %5'i geçmemesi gerekmektedir. Bu nedenle reaksiyon sonucunda oluşacak ürün ve tasarlanan primerlerin ikincil yapıları mutlaka incelenmelidir.

Kopya sayısının belirlenmesinde oluşan diğer bir sınırlılık referans genlerin reaksiyonda olgular arasında gösterdiği M değeri stabilitesidir. Referans genlerin seçiminde tümörde rekuran kromozomal anomalilerinin gözlenmediği lokusların tercih edilmesi gerekmektedir. Rereferans genlerin bu tip lokuslar üzerinden seçilmesi delesyon veya kazanımdan dolayı meydana gelebilecek değişimin kopya sayısı üzerine olan yanıltıcı etkisini ortadan kaldıracaktır. Bununla birlikte tümörlerde birbirlerinden farklı olarak gözlenebilen kromozom seti sayısı değişimi kopya sayısının saptanmasında yanıltıcı etki oluşturabilmektedir. Tümör dokusunda gen kopya sayının saptanmasına yönelik bir çalışmada sabit bir M değeri için çoklu referans gen ile çalışılması gereklidir. Seçilen referans genlerin hangi olgu çalışılacaksa o olguda hedef genden bağımsız olarak geNORM ile M değeri hesaplanmalı ve veri güvenilirliği için kaç referans ile çalışılacaksa o kadar referans gen ile çalışılmalıdır.

4. BULGULAR

4.1 Olgu grubuna dair bulgular

Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından desteklenen KB.SAG.2007.023 numaralı proje kapsamında birimimize ulaşan nöroblastik tümör dokularından ilk 128 olgu çalışmanın evrenini oluşturmaktadır. Protokol kapsamında çalışmada yer alan olguların tanısı histo-patolojik incelenme ve moleküler sitogenetik analizlerden elde edilen veriler dikkate alınarak konulmuştur. 128 olgudan 7'sinin (% 5) ganglionörom, 7'sinin (% 5) ganglionöroblastom ve 114'nün (% 90) nöroblastom olduğu gözlenmektedir.

Tablo 15: Olguların nöroblastik tümör tiplerine göre yüzdesel olarak dağılımı

Nöroblastik Tümör Tipi	Sayı	Yüzde (%)
Nöroblastom	114	90
Ganglionöroblastom	7	5
Ganglionörom	7	5
Toplam	128	100

Nöroblastik tümörlerin cinsiyet üzerindeki dağılımı göz önüne alındığında 128 olgunun %53'ü erkek iken % 47'si kadındır.

Tablo 16: Olguların cinsiyet üzerindeki dağılımı

Cinsiyet	Sayı	Yüzde (%)
Erkek	68	53
Kadın	60	47
Toplam	128	100

Shimada sınıflandırmasında riski belirleyen faktörlerden biri olan yaş için 18 ay prognostik eşik olarak alınmış olup olgu grupları 18 ay'a eşit ve 18 ay'dan büyük ayrıca 18 ay'dan küçük olmak üzere sınıflandırılmıştır.

128 olguda 4 olgunun yaş verisi bilinmemektedir. 128 olgunun tamamında 72 olgu (% 56) 18 ay'a eşit ve 18 ay'dan büyük iken 52 olgu (% 41) 18 ay'dan küçüktür.

Tablo 17: Olguların yaşa göre yüzdesel dağılımı

Yaş Grubu	Sayı	Yüzde (%)
≤ 18 ay	72	56
18 ay <	52	41
Bilinmeyen	4	3
Toplam	128	100

Nöroblastik tümörlerde ileri prognoz ile ilişkili başlıca faktörlerden biri olan *MYCN* geni amplifikasyonunun yüzdesel olarak olgulara dağılımı incelenmiştir. 128 olgunun % 16'sında MYCN geni amplifikasyonu gözlenmekte iken % 79'unda *MYCN* geni amplifikasyonu gözlenmemektedir. Olguların %5'inde ise *MYCN* geni amplifikasyonuna ait veri bilinmemektedir.

Tablo 18: *MYCN* geni amplifikasyonunun olgulardaki yüzdesel dağılımı

MYCN geni amplifikasyonu	Sayı	Yüzde (%)
Var	20	16
Yok	101	79
Bilinmeyen	7	5
Toplam	128	100

Türk Pediatrik Onkoloji Derneği nöroblastom tedavi protokolüne kayıtlı olan birimlerde yapılan histo-patolojik inceleme bununla birlikte 1p36 delesyonu, 17q kazanımı ve *MYCN* geni amplifikasyonu gibi prognostik verilerin kullanılması ile olgular arasında evre grupları oluşturulmuştur. 114 NB tanılı olgudan 34'ünün (% 30) evre verisi bulunmamaktadır. 114 olgudan 9'u evre 1 (% 8), 12'si evre 2 (% 10), 17'si evre 3 (% 15) ve 33'ü evre 4 (% 29) iken 114 olguda 9 olgu (% 8) 4S evresi içersinde yer almaktadır.

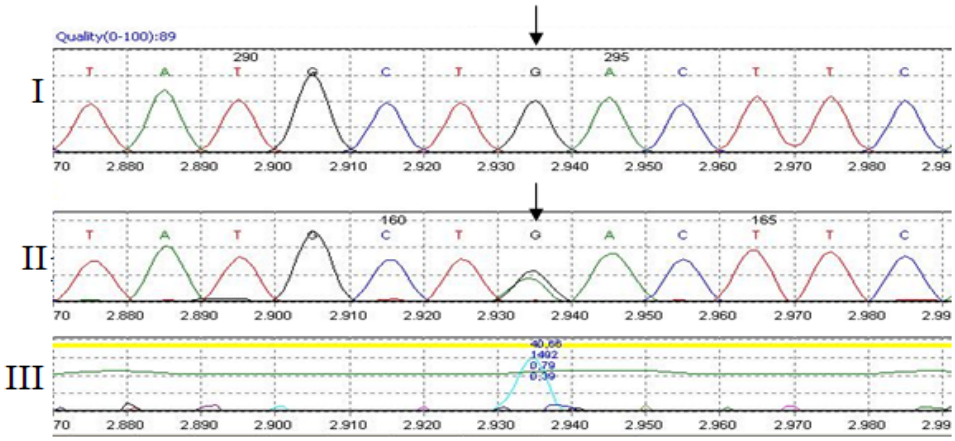
Tablo 19: Nöroblastoma tanılı olgularda evrelerin yüzdesel olarak dağılımı

Evre	Sayı	Yüzde (%)
1	9	8
2	12	10
3	17	15
4	33	29
4S	9	8
Verisi bulunmayan	34	30
Toplam	114	100

4.2 Sekans analizi sonucunda elde edilen bulgular

75 numaralı NB olgusunda, bir numaralı ekzonda heterozigot c.96G>A nükleotid değişimi ile meydana gelen yanlış anlamlı (missens) mutasyon saptanmıştır. Mutasyon sonucunda proteindeki 32. rezidüde yer alan aspartik asit, asparjin aminoasidine (32D>D/N) dönüşmektedir. Belirlenen mutasyon proteinin homeodomeini dışında meydana gelmekle birlikte filogenik olarak birbirlerinden uzak türler arasında yüksek oranda korunmuş aminoasit dizisi içersinde yer almaktadır. 75 numaralı olguda saptanan heterozigot c.96G>A nükleotid değişimi daha önce tanımlanmamıştır.

A

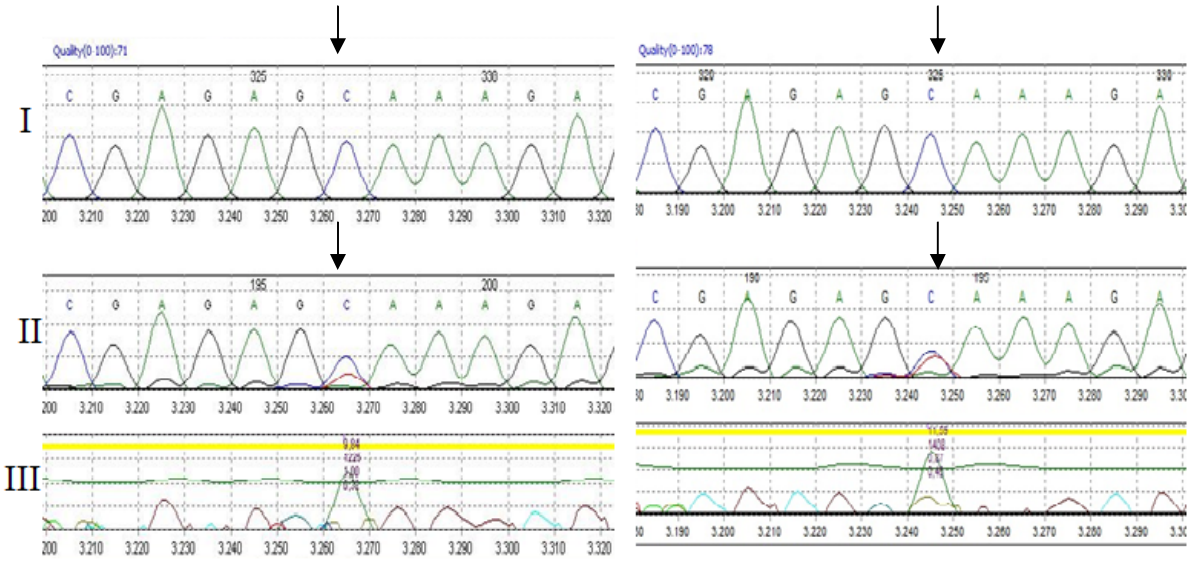


B

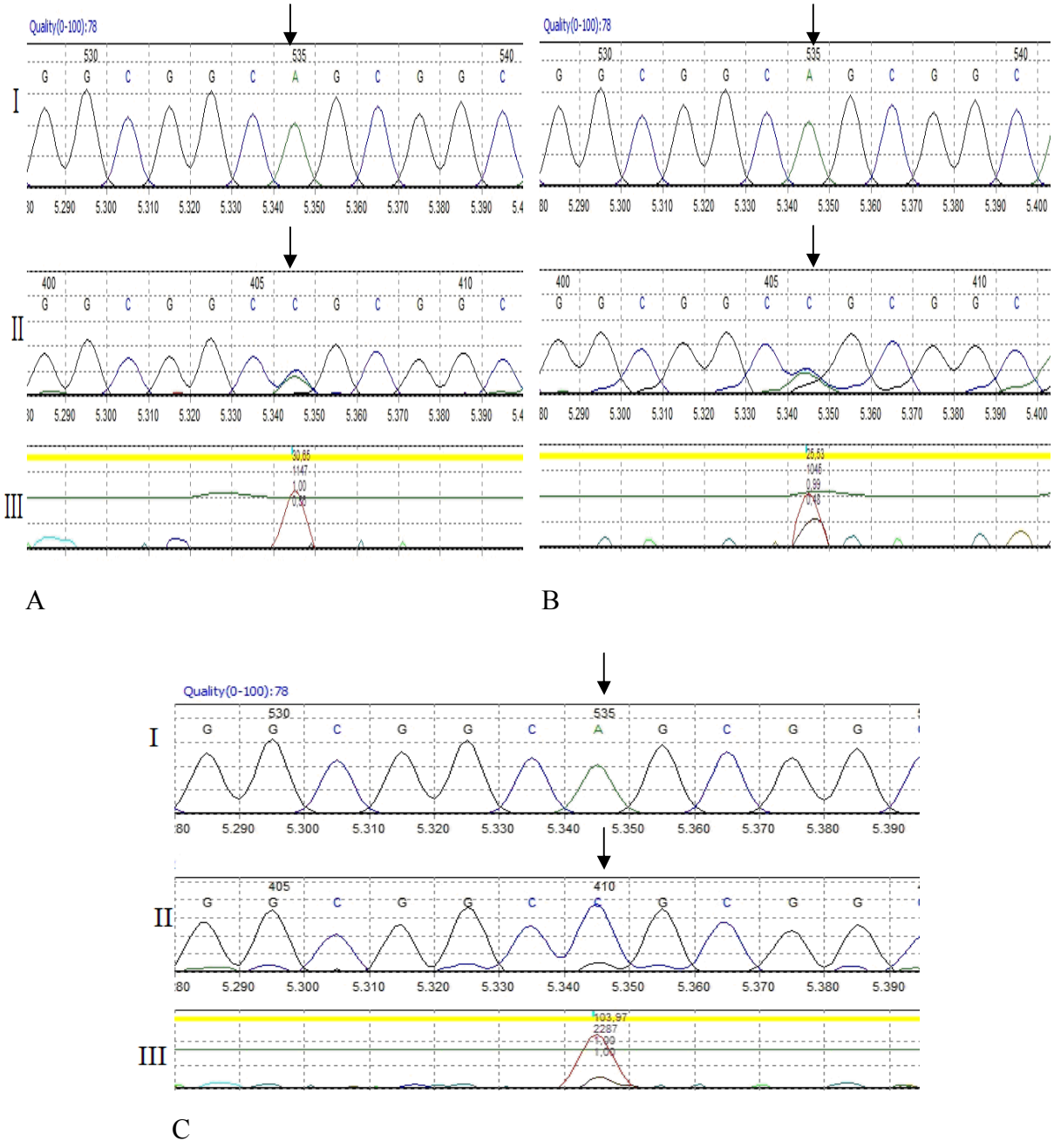
```
1    --------------------MDTSSLASAYADFSSCSQASGFQYNPIRTTFGATSGCPSL   40  Q9I9A0   Q9I9A0_CHICK
1    MYKMEYSYLNSSAYESCMAGMDTSSLASAYADFSSCSQASGFQYNPIRTTFGATSGCPSL   60  Q5I7G4   Q5I7G4_DANRE
1    MYKMEYSYLNSSAYESCMAGMDTSSLASAYADFSSCSQASGFQYNPIRTTFGATSGCPSL   60  Q99453   PHX2B_HUMAN
1    MYKMEYSYLNSSAYESCMAGMDTSSLASAYADFSSCSQASGFQYNPIRTTFGATSGCPSL   60  O35690   PHX2B_MOUSE
1    MYKMEYSYLNSSAYESCMAGMDTSSLASAYADFSSCSQASGFQYNPIRTTFGATSGCPSL   60  B1WBH8   B1WBH8_XENTR
1    MYKMEYSYLNSSAYESCMAGMDTSSLASAYADFSSCSQASGFQYNPIRT-----------   49  Q5NSW4   Q5NSW4_RAT
                          ****************************
```

Şekil 27: (A) 75 numaralı olgularda gözlenen c.96G>A nükleotid değişimi. (A) Mutasyon analizinde *PHOX2B* gen sekans dizisinin (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) .gbk uzantılı verisi (I) yazılım tarafından kullanılmıştır. II Elde sekans verisini, III pik alanı üzerindeki değişim değerini göstermektedir. (B) c.96G>A nükleotid değişimi ile meydana gelen amino asit değişimi filogenik olarak birbirlerinden uzak türler arasında korunmuş amino asit dizisi içersinde meydana gelmektedir (http://uniprot.org/align/).

9 ve 99 numaralı NB olgularında, üç numaralı ekzonda daha önce tanımlanmış ve amino asit değişimine neden olmayan heterozigot c.552C>T tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (NM_003924.3) saptanmıştır. 43 ve 47 numaralı NB olgularında, üç numaralı ekzonda daha önce tanımlanmış ve amino asit değişimine neden olmayan heterozigot c.762A>C SNP (NM_003924.3) ve 148 numaralı NB olgusunda üçüncü ekzonda tanımlanmış homozigot c.762A>C SNP (NM_003924.3) belirlenmiştir.

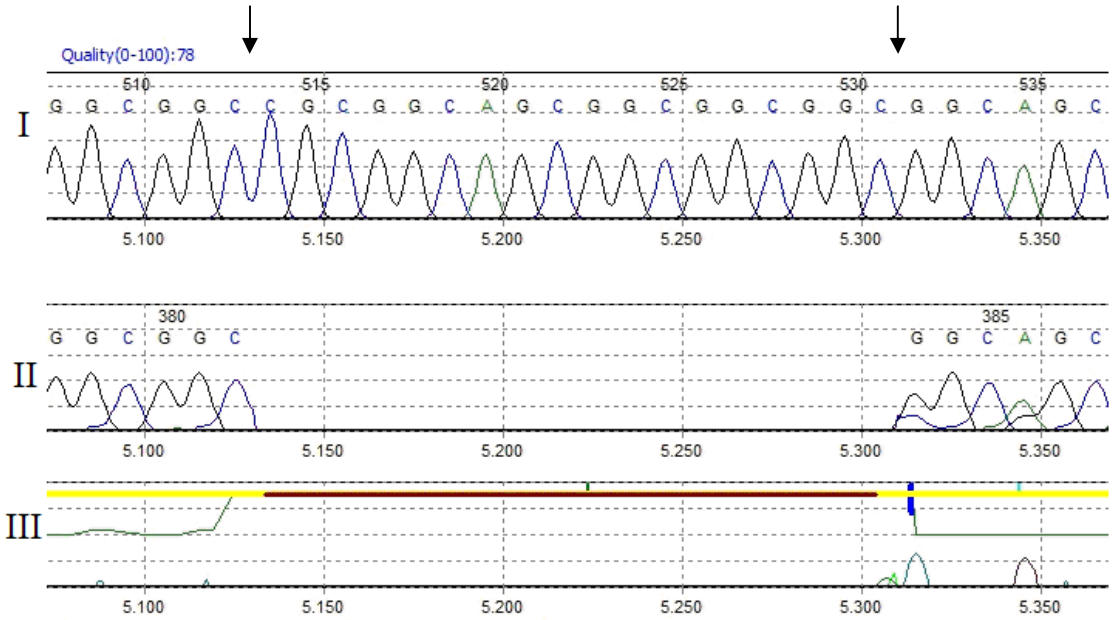


Şekil 28: 9 (A) ve 99 (B) numaralı olgularda gözlenen c.552C>T nükleotid değişimi. Mutasyon analizinde *PHOX2B* gen sekans dizisinin (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) .gbk uzantılı verisi (I) yazılım tarafından kullanılmıştır. II Elde sekans verisini, III pik alanı üzerindeki değişim değerini göstermektedir.



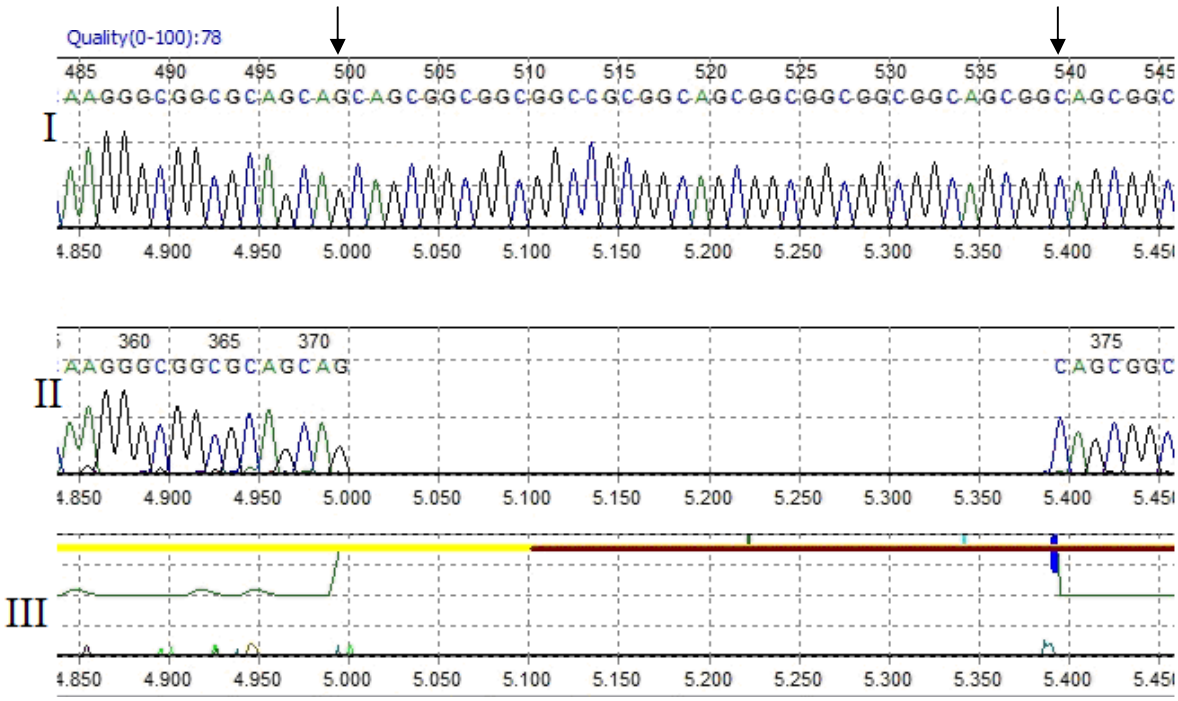
Şekil 29: 43 (A) ve 47 (B) numaralı olgularda gözlenen heterozigot, 148 (C) numaralı olguda gözlenen homozigot c.762A>C nükleotid değişimi. Mutasyon analizinde *PHOX2B* gen sekans dizisinin (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) .gbk uzantılı verisi (I) yazılım tarafından kullanılmıştır. II Elde sekans verisini, III pik alanı üzerindeki değişim değerini göstermektedir.

60 numaralı NB olgusunda, üç numaralı ekzonda 18 nükleotidlik (c.1101_1118 het-del18) heterozigot delesyon tanımlanmıştır. Genin ikinci polialanin bölgesini kodlayan dizide yer alan delesyon açık okuma çerçevesini değiştirmemektedir.



Şekil 30: 60 numaralı olguda gözlenen 18 bp'lik heterozigot delesyon (c.1101_1118 het-del18) Mutasyon analizinde *PHOX2B* gen sekans dizisinin (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) .gbk uzantılı verisi (I) yazılım tarafından kullanılmıştır. II Elde sekans verisini, III delesyonun pik alanı üzerindeki değişim değerini göstermektedir.

110 numaralı ganglionörom tanısı almış olguda, üç numaralı ekzonda 39 nükleotidlik (c.1098_1136 het-del39) heterozigot delesyon saptanmıştır. Genin ikinci polialanin bölgesini kodlayan dizide yer alan delesyon açık okuma çerçevesini değiştirmemektedir.



Şekil 31: 110 numaralı olguda gözlenen 39 bp'lik heterozigot delesyon (c.1101_1118 het-del18) Mutasyon analizinde *PHOX2B* gen sekans dizisinin (Annotation: Chromosome 4, NC_000004.11, Pubmed/gene) .gbk uzantılı verisi (I) yazılım tarafından kullanılmıştır. II Elde sekans verisini, III delesyonun pik alanı üzerindeki değişim değerini göstermektedir.

Tablo 20: *PHOX2B* gen ekzonlarında saptanan nükleotid değişimlerinin amino asit dizisi üzerindeki etkisi ve olguların tanı/evre durumu gösterilmektedir.

Hasta Numarası	Tanı / Evre	Genomik Değişim	Ekzon	SNP Numarası	Amino Asit Değişimi
9	NBL / Evre 4	c.552C>T	3	rs17885216	184S>S/S
43	NBL / Evre 4	c.762A>C	3	rs17884724	254A>A
47	NBL / Evre 4	c.762A>C	3	rs17884724	254A>A
60	NBL / Evre 1	c.1101_1118 het-del18	3	-	çerçeveyi etkilememekte (6 aa delesyon)
75	NBL / Evre 4	c.96G>A	1	-	32D>D/N
99	NBL / Evre 4	c.552C>T	3	rs17885216	184S>S/S
110	Ganglionörom	c.1098_1136 het-del39	3	-	çerçeveyi etkilememekte (13 aa delesyon)
148	NBL / Evre 4	c.762A>C	3	rs17884724	254A>A

4.3 Q-PCR ile *PHOX2B* gen kopya sayısına ait veriler

QBASE plus 2 yazılımdan ikili reaksiyonlarda ("duplicate") Ct değeri farkı 0,5'i geçmeyen ve M değeri 0,2 altında olan 87 olgunun Q-PCR metodu ile *PHOX2B* gen kopya sayısı sayısı saptanmıştır. Yapılan analiz sonucunda 87 olgunun 16'sında (% 18) kopya sayısı diploid (normal) olarak bulunmuştur. 87 olgu grubunda 71 olguda (% 82) ise kromozom seti sayısında anöploidi düzeyinde artış saptanmıştır. Bununla birlikte 87 olgu grubunda *PHOX2B* gen delesyonu veya amplifikasyonu saptanmamıştır.

Tablo 21: 39 - 97 numaralı olgular arasında saptanan *PHOX2B* gen kopya sayısı

Olgu Numarası	*PHOX2B* Kopya Sayısı	Standart Sapma	Normalizasyon Faktörü	QBASE Değer Aralığı
39	3,27	0,073	1,179	1,41-2,44
40	3,464	0,24	0,389	1,41-2,44
41	2,991	0,076	0,980	1,41-2,44
42	2,981	2,51E-02	0,850	1,41-2,44
43	3,743	0,114	1,048	1,41-2,44
44	3,315	0,121	1,220	1,41-2,44
45	3,405	4,65E-02	1,328	1,41-2,44
46	3,848	3,98E-02	0,542	1,41-2,44
47	3,8	2,02E-01	1,157	1,41-2,44
48	2,293	3,14E-02	1,274	1,41-2,44
52	4,172	4,82E-02	1,177	1,41-2,44
59	3,975	2,32E-01	1,410	1,41-2,44
60	2,565	1,22E-02	1,183	1,41-2,44
61	3,3	0,097	1,106	1,41-2,44
64	3,595	5,87E-03	1,322	1,41-2,44
66	2,943	2,74E-02	1,173	1,41-2,44
71	2,51	1,51E-02	1,202	1,41-2,44
72	1,983	2,37E-02	0,911	1,41-2,44
73	2,046	6,80E-02	0,892	1,41-2,44
74	2,765	6,10E-02	1,133	1,41-2,44
75	2,837	6,60E-02	0,897	1,41-2,44
76	2,988	3,69E-02	1,282	1,41-2,44
77	2,14	8,60E-02	0,963	1,41-2,44
78	3,228	9,50E-02	0,805	1,41-2,44
80	2,96	7,70E-02	1,100	1,41-2,44
84	2,883	1,10E-01	0,646	1,41-2,44
87	2,855	2,01E-02	1,172	1,41-2,44
95	2,969	6,90E-02	0,915	1,41-2,44
96	3,157	7,10E-02	0,755	1,41-2,44
97	3,208	5,70E-02	1,232	1,41-2,44

Tablo 22: 98 - 154 numaralı olgular arasında saptanan *PHOX2B* gen kopya sayısı

Olgu Numarası	*PHOX2B* Kopya Sayısı	Standart Sapma	Normalizasyon Faktörü	QBASE Değer Aralığı
98	3,371	4,46E-02	1,144	1,41-2,44
99	2,838	8,20E-02	0,981	1,41-2,44
100	3,106	2,33E-02	0,819	1,41-2,44
101	1,97	0,11	0,873	1,41-2,44
102	3,815	4,18E-02	0,745	1,41-2,44
103	4,702	0,104	1,101	1,41-2,44
105	3,711	4,11E-02	1,395	1,41-2,44
109	4,213	0,109	0,948	1,41-2,44
110	2,633	2,90E-02	1,118	1,41-2,44
113	2,034	0,054	0,999	1,41-2,44
114	3,133	0,184	1,302	1,41-2,44
115	2,947	2,83E-02	1,222	1,41-2,44
117	2,827	0,076	1,389	1,41-2,44
118	3,129	0,083	1,255	1,41-2,44
121	2,876	4,43E-02	0,680	1,41-2,44
122	2,142	3,18E-02	0,882	1,41-2,44
123	1,929	2,11E-02	0,695	1,41-2,44
124	1,824	4,01E-02	0,824	1,41-2,44
125	2,228	4,34E-02	0,722	1,41-2,44
126	3,236	3,22E-02	1,176	1,41-2,44
127	3,381	8,70E-02	1,039	1,41-2,44
128	3,065	4,18E-01	1,085	1,41-2,44
129	2,886	0,213	0,598	1,41-2,44
131	3,221	0,077	1,043	1,41-2,44
132	2,702	3,11E-02	0,948	1,41-2,44
133	2,559	3,10E-02	1,100	1,41-2,44
134	3,079	2,76E-02	0,966	1,41-2,44
135	2,689	0,155	1,228	1,41-2,44
136	2,978	0,154	1,067	1,41-2,44
137	2,475	0,068	0,933	1,41-2,44
140	1,992	0,136	1,027	1,41-2,44
143	2,759	0,184	1,192	1,41-2,44
144	2,943	0,13	1,072	1,41-2,44
145	3,158	2,83E-02	0,795	1,41-2,44
146	2,637	0,068	0,923	1,41-2,44
147	2,943	4,47E-02	1,240	1,41-2,44
148	2,933	0,068	1,373	1,41-2,44
149	2,533	5,85E-03	1,078	1,41-2,44
150	3,111	0,079	1,092	1,41-2,44
151	2,433	0,102	0,602	1,41-2,44
152	1,955	5,10E-02	0,991	1,41-2,44
153	3,826	4,74E-02	1,156	1,41-2,44
154	3,866	4,56E-01	1,213	1,41-2,44

Tablo 23: 156 - 176 numaralı olgular arasında saptanan *PHOX2B* gen kopya sayısı

Olgu Numarası	*PHOX2B* Kopya Sayısı	Standart Sapma	Normalizasyon Faktörü	QBASE Değer Aralığı
156	2,84	2,43E-02	1,180	1,41-2,44
157	3,44	5,30E-02	1,203	1,41-2,44
158	3,358	4,88E-02	0,554	1,41-2,44
163	3,541	1,71E-01	0,898	1,41-2,44
164	3,428	9,20E-02	1,195	1,41-2,44
166	3,158	1,97E-01	0,810	1,41-2,44
168	2,637	0,078	0,982	1,41-2,44
169	2,02	0,074	0,797	1,41-2,44
171	3,285	1,32E-02	1,051	1,41-2,44
172	2,057	2,72E-02	0,984	1,41-2,44
173	2,727	6,40E-02	1,169	1,41-2,44
174	2,542	4,01E-02	0,977	1,41-2,44
175	2,634	2,22E-02	1,129	1,41-2,44
176	1,999	2,31E-02	0,952	1,41-2,44

5. TARTIŞMA

Nöroblastom (NB), sempatik sinir sistemine ve adrejenik hücre tipine farklılaşan nöral krest hücrelerinden köken alan bir tümördür. Bu nedenle nöral krestten köken alan sempatik sinir sistemi ve adrenal medullanın gelişim göstereceği herhangi bir yerde oluşum gösterebilmektedir. NB tümörlerinde bir dizi edinsel genetik değişiklik tanımlanmıştır ve bunlardan bazılarının, tedavi yanıtı ve tümör davranışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu anomalilerden 1p, 11q, 14q delesyonları ve 17q kazanımı tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Belirlenen bu kromozomal anomaliler NB tümörlerinde tek başına bağımsız prognostik etki gösterebildikleri gibi, birliktede prognoza etki edebilmektedir. NB'de tanımlanmış ve reküran olarak gözlenen kromozomal delesyon bölgelerinde tümör süpresör genlerin bulunabileceği öngörülmüştür. Ancak, şu ana kadar yapılan çalışmalarda reküran delesyon bölgelerinde ikili vuruş ("double hit") modeli ile uyumlu hiç bir gen saptanamamıştır. NB tümörlerinde *MYCN* geni dışında bilinen bir proto-onkogenin ya da tümör süpresör genin değişimi tanımlanamasada yakın zamanda yapılan çalışmalar *ALK* ve *PHOX2B* genlerinde meydana gelen mutasyonların NB oluşumunda etkili olabileceğini vurgulamaktadır (78, 87). NB'de nadir bir şekilde gözlenen *PHOX2B* mutasyonlarının tümör oluşumundaki etki mekanizması hakkında ise farklı görüşler savunulsa da gözlenen mutasyonların nasıl bir etki ile tümör oluşumunu tetiklemesi henüz bilinmemektedir.

Nöral krest hücrelerinin sempatik sinir sisteminde yer alan glia ve nöron hücrelerine farklılaşmasında ayrıca adrenal medulla'nın oluşumunda *PHOX2B* geni rol oynamaktadır. Nöron hücrelerinin nörotransmiter madde sentezinde görev üstlenen dopamin beta hidroksilaz enzimi bu genin işlevi sonucunda sentezlenmektedir. Sempatik sinir sistemi oluşumunun yanı sıra adrenal medulla içersinde adrejenik fenotipe sahip olan kromafin hücreleri *PHOX2B* gen ifadesi sonucunda nöral krest hücrelerinden farklılaşmaktadır. Gelişim sürecinde geçici bir şekilde ifade edilen bu gen adrejenik fenotipe sahip nöron ve kromafin hücrelerinde devamlı olarak ifade edilmektedir. Konjenital Santral Hipoventilasyon sendromu (CCHS) olguları üzerinde yapılan çalışmalarda *PHOX2B* geninde ikinci polialanin bölgesini kodlayan bölgede tekrar dizilerinin arttığı (poli-alanin stretch expansion) saptamıştır (73). CCHS sendromunda *PHOX2B* gen allellerinden birinde oluşan bu değişimin otozomal dominant olarak aktarıldığı gözlenmiştir (73). Bu çalışmada CCHS sendromlu hastalarda sendromla birlikte NB oluştuğu bildirilmiştir (73).

Kalıtsal olarak ortaya çıkan NB olguları üzerinde yapılan çalışmalar gende meydana gelen mutasyonların homeodomein içersinde yer aldığını göstermektedir (75, 76). Homeotik transkripsiyon faktörlerinde yer alan homeodomein proteinin özgül DNA dizisine bağlanmasında görevlidir (32). Bu nedenle transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan proteinin bu mutasyonlar sonucunda işlev kaybına uğrayabileceğine dair çıkarım yapılmıştır. Sporadik NB tümörlerinde *PHOX2B* gen mutasyonları çoğunlukla 3 numaralı ekzon içersinde yer alan polialanin bölgesinde farklı boyutlarda gözlenen delesyonlar şeklinde ortaya çıkmaktadır (78, 88). Saptanan delesyonlar *PHOX2B* geninin açık okuma çerçevesinde hata oluşturmakta ve sentezlenen proteinde defektlere neden olmaktadır. Sporadik olgularda saptanan delesyonlar *PHOX2B* geninde sadece polialanin bölgesi içersinde değil "homoedomain" kodlayan dizinin 5' dışında 8 bp'lik ayrıca 3 numaralı ekzon içersinde tek nükleotidlik olarak meydana geldiği (600delC) bildirilmiştir (78, 79).

Çalışmada 75 numaralı NB olgusunda tanımlanan c.96G>A nükleotid değişimi filogenik olarak birbirlerinden uzak türler arasında korunmuş olmakla birlikte homeodomein dışında yer almaktadır. Protein dizisinde korunmuş bu rezidü değişimine bağlı olarak üç boyutlu yapıda meydana gelebilecek değişimin NB etkeni olabileceği düşünülmektedir. Adrejenik fenotipe sahip hücrelerde *MYCN* geni ifadesine bağlı olarak tümör oluşumu gözlenmesi ve ilerleyen evrede oluşan primer tümörün $PHOX2B^{+}$ hücrelerinden köken aldığı saptanmıştır (24). *PHOX2B* gen mutasyonu ile birlite *MYCN* geni ifade düzeyinin artması tümör oluşumu ve prognozda etkili olabilir. c.96G>A nükleotid değişimi tanımlanan 75 numaralı olguda *MYCN* geni amplifikasyonu gözlenmekle birlikte olgu 4. evrede yer almaktadır. *PHOX2B* gen mutasyonu ile birlikte *MYCN* geni amplifikasyonu olgu bazında prognoza etki edebilme yorumuna karşın tüm olgular düşünüldüğünde *PHOX2B* gen mutasyonlarının nadir bir şekilde gözlenmesi nöroblastom prognozundaki genel etkisi anlamlı olmamaktadır. İlgili literatürde sporadik nöroblastom olgularında *PHOX2B* gen polialanin bölgesinde yer alan delesyonların saptanmış olduğu olgular farklı prognoza sahip evrelerde yer almıştır (78). Altmış numaralı NB olgusu ve 110 numaralı ganglionörom olgusunda saptanan ve tanımlanmamış boyutlarda meydana 18 ve 39 bp'lik delesyonlar daha önceki çalışmalarda tanımlanan delesyonların aksine genin açık okuma çerçevesini etkilememektedir.

Çalışma kapsamında polialanin delesyonu saptanan olgular (60 ve 110) düşük evre ve olgun tümör fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Sporadik nöroblastom olgularında farklı baz çifti büyüklüklerinde gözlenebilen polialanin delesyonlarının *PHOX2B* gen ürününün üç boyutlu yapısını değişik biçimlerde etkilemesi olgularda gözlenen evre farklılıkları ile ilişkili olabilir.

Tümör oluşumunu tetikleyen mekanizmalar, bir gende meydana gelen mutasyonların protein fonsiyonuna olan etkisine bağlı olarak farklı şekillerde meydana gelebilmektedir (89). Genin bir allelinde meydana mutasyon gen ürünün daha az fonsiyona ya da hiçbir şekilde fonksiyon göstermemesine neden olabilir (89). Bununla birlikte tek allelde gözlenebilen bir mutasyon oluşan proteinde yeni veya anormal fonksiyon oluşturabileceği gibi yabanıl tip ("wild type") allelde oluşturulan protein ürüne antagonistik etki yaratabilecek proteinin oluşumuna sebep olabilir (89). Genin tek alallelinde meydana gelebilecek değişim ile tümör oluşumun gözlenmesi değişime uğramış allelin tek başına süreci tetiklemesinden dolayı genin onkogen etki mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir. Bir genin her iki allelinin mutasyon tarafından etkilenmesi ya da bir allelin mutasyon diğer allelin delesyon ile kaybı sonucu tümör oluşumunun gözlenmesi genin tümör süpresör olarak görev gösterebileceğini göstermektedir (90). De Pontual ve ark.'nın 13 NB hücre hattı ve 45 primer tümör örneği üzerinde yapmış oldukları primer tümörlerin % 10'nunda gözlenen *PHOX2B* gen allel kaybı ve saptanan mutasyonlar ikili vuruş hipotezi ile ilişkilendirilememiştir (30). Başka bir çalışmada her iki adrenal medullada bilateral NB tümör oluşumu gözlenen ve *PHOX2B* geninde c.28A>G mutasyonu (N10S) saptanan olguda, genin diğer allelinde kayıp olduğu bildirilmiştir (31). Q-PCR metodu ile kopya sayısının saptanmasına yönelik olan çalışmada *PHOX2B* genine ait her hangi bir delesyon saptanmamıştır. Heterozigot mutasyonlar ile birlikte diğer allelin kaybının olmaması *PHOX2B* genin nöroblastom oluşumunda onkogen olarak davranabileceğini düşündürmektedir. Saptanan mutasyonların *PHOX2B* proteininin üç boyutlu yapısı üzerindeki etkisi nedeni ile NB oluşumunda etkili olabilir.

6. SONUÇ

Çalışma kapsamında, *PHOX2B* gen mutasyonları NB olguları arasında oldukça nadir bir şekilde gözlenmektedir. Bununla birlikte genin 3 numaralı ekzonu içersinde yer alan ve polialanin kodlayan dizide meydana gelen delesyonlar proteinde defektlere neden olmaktadır. Ancak çalışmada saptanan delesyonlar bölge olarak diğer çalışmalarla tutarlı olmasına karşın okuma çerçevesini değiştirmemektedir. Saptanan mutasyonlar *PHOX2B* proteininin üç boyutlu yapısı üzerindeki etkisi nedeni ile NB oluşumunda etkili olabilir. Bununla birlikte *PHOX2B* gen mutasyonları düşük evre ve olgun tümör fenotipi ile ilişkili gözükmektedir. Bu nedenle *PHOX2B* geninin mutasyonları ile NB prognozu arasında bir ilişki kurulamamıştır. Q-PCR metodu sonucunda elde edilen veri doğrultusunda *PHOX2B*'nin onkogen olarak nöroblastom oluşumunda etkili olabileceği düşünülmektedir.

PHOX2B geninin NB oluşumu üzerine olan etkisinin aydınlatılması için in vitro mutagenez ve *PHOX2B* gen ifadesinin belirlenmesine yönelik çalışmalar kurgulanabilir. Elde edilen veriler doğrultusunda *PHOX2B* mutasyonlarının işlevsel olarak mı yoksa gen ifadesinde meydana gelen değişimin bir sonucu olarak NB oluşumunda nasıl bir etki oluşturduğunu açığa kavuşturabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Smith EI, Castleberry RP. Neuroblastoma. Curr Probl Surg 1990: 27: 573-620.

2. Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. J Clin Pathol 2001: 54: 897-910.

3. Ambros PF, Ambros IM, Strehl S et al. Regression and progression in neuroblastoma. Does genetics predict tumour behaviour? Eur J Cancer 1995: 31A: 510-515.

4. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. J Clin Oncol 1999: 17: 2264-2279.

5. Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. Cancer 1977: 40: 2256-2263.

6. Gilbert F, Balaban G, Moorhead P et al. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. Cancer Genet Cytogenet 1982: 7: 33-42.

7. Ritke MK, Shah R, Valentine M et al. Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in neuroblastoma. Cytogenet Cell Genet 1989: 50: 84-90.

8. White PS, Maris JM, Beltinger C et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. Proc Natl Acad Sci U S A 1995: 92: 5520-5524.

9. Takayama H, Suzuki T, Mugishima H et al. Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. Oncogene 1992: 7: 1185-1189.

10. Hogarty MD, Liu X, Guo C et al. Identification of a 1-megabase consensus region of deletion at 1p36.3 in primary neuroblastomas. Med Pediatr Oncol 2000: 35: 512-515.

11. Weith A, Martinsson T, Cziepluch C et al. Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. Genes Chromosomes Cancer 1989: 1: 159-166.

12. Fong CT, Dracopoli NC, White PS et al. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. Proc Natl Acad Sci U S A 1989: 86: 3753-3757.

13. Maris JM, Weiss MJ, Guo C et al. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol 2000: 18: 1888-1899.

14. Guo C, White PS, Hogarty MD et al. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. Med Pediatr Oncol 2000: 35: 544-546.

15. Guo C, White PS, Weiss MJ et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. Oncogene 1999: 18: 4948-4957.

16. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. Int J Cancer 2001: 91: 680-686.

17. Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK et al. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1997: 150: 81-89.

18. Lastowska M, Nacheva E, McGuckin A et al. Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group. Genes Chromosomes Cancer 1997: 18: 162-169.

19. Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD et al. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. Eur J Cancer 1997: 33: 1627-1633.

20. Slamon DJ, Boone TC, Seeger RC et al. Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene. Science 1986: 232: 768-772.

21. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U et al. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. EMBO J 1991: 10: 3703-3712.

22. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ et al. Biology and genetics of human neuroblastomas. J Pediatr Hematol Oncol 1997: 19: 93-101.

23. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science 1984: 224: 1121-1124.

24. Alam G, Cui H, Shi H et al. MYCN promotes the expansion of Phox2B-positive neuronal progenitors to drive neuroblastoma development. Am J Pathol 2009: 175: 856-866.

25. Takita J, Hayashi Y, Kohno T et al. Allelotype of neuroblastoma. Oncogene 1995: 11: 1829-1834.

26. Perri P, Longo L, Cusano R et al. Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. Oncogene 2002: 21: 8356-8360.

27. Smith JS, Tachibana I, Lee HK et al. Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. Genes Chromosomes Cancer 2000: 29: 16-25.

28. Hallstensson K, Thulin S, Aburatani H et al. Representational difference analysis and loss of heterozygosity studies detect 3p deletions in neuroblastoma. Eur J Cancer 1997: 33: 1966-1970.

29. Caron H, van Sluis P, Buschman R et al. Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumour suppressor gene locus. Hum Genet 1996: 97: 834-837.

30. de Pontual L, Trochet D, Bourdeaut F et al. Methylation-associated PHOX2B gene silencing is a rare event in human neuroblastoma. Eur J Cancer 2007: 43: 2366-2372.

31. Krona C, Caren H, Sjoberg RM et al. Analysis of neuroblastoma tumour progression; loss of PHOX2B on 4p13 and 17q gain are early events in neuroblastoma tumourigenesis. Int J Oncol 2008: 32: 575-583.

32. Vollmer JY, Clerc RG. Homeobox genes in the developing mouse brain. J Neurochem 1998: 71: 1-19.

33. Catron KM, Iler N, Abate C. Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. Mol Cell Biol 1993: 13: 2354-2365.

34. Cargnin F, Flora A, Di Lascio S et al. PHOX2B regulates its own expression by a transcriptional auto-regulatory mechanism. J Biol Chem 2005: 280: 37439-37448.

35. Anderson DJ. Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification. Curr Opin Neurobiol 1993: 3: 8-13.

36. Anderson DJ. Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. Annu Rev Neurosci 1993: 16: 129-158.

37. Unsicker K, Finotto S, Krieglstein K. Generation of cell diversity in the peripheral autonomic nervous system: the sympathoadrenal cell lineage revisited. Ann Anat 1997: 179: 495-500.

38. Pattyn A, Morin X, Cremer H et al. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. Nature 1999: 399: 366-370.

39. Kim HS, Seo H, Yang C et al. Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites. J Neurosci 1998: 18: 8247-8260.

40. Hong SJ, Kim CH, Kim KS. Structural and functional characterization of the 5' upstream promoter of the human Phox2a gene: possible direct transactivation by transcription factor Phox2b. J Neurochem 2001: 79: 1225-1236.

41. Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F et al. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. Development 1998: 125: 599-608.

42. Liu MT, Kuan YH, Wang J et al. 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. J Neurosci 2009: 29: 9683-9699.

43. Pattyn A, Goridis C, Brunet JF. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. Mol Cell Neurosci 2000: 15: 235-243.

44. Pattyn A, Morin X, Cremer H et al. Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. Development 1997: 124: 4065-4075.

45. Adachi M, Browne D, Lewis EJ. Paired-like homeodomain proteins Phox2a/Arix and Phox2b/NBPhox have similar genetic organization and independently regulate dopamine beta-hydroxylase gene transcription. DNA Cell Biol 2000: 19: 539-554.

46. Arnold K, Bordoli L, Kopp J et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 2006: 22: 195-201.

47. Schwede T, Kopp J, Guex N et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res 2003: 31: 3381-3385.

48. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 1997: 18: 2714-2723.

49. Morikawa Y, Zehir A, Maska E et al. BMP signaling regulates sympathetic nervous system development through Smad4-dependent and -independent pathways. Development 2009: 136: 3575-3584.

50. Stanke M, Stubbusch J, Rohrer H. Interaction of Mash1 and Phox2b in sympathetic neuron development. Mol Cell Neurosci 2004: 25: 374-382.

51. Yang C, Kim HS, Seo H et al. Paired-like homeodomain proteins, Phox2a and Phox2b, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. J Neurochem 1998: 71: 1813-1826.

52. Stanke M, Junghans D, Geissen M et al. The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. Development 1999: 126: 4087-4094.

53. Lucas ME, Muller F, Rudiger R et al. The bHLH transcription factor hand2 is essential for noradrenergic differentiation of sympathetic neurons. Development 2006: 133: 4015-4024.

54. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. Nature 1994: 367: 380-383.

55. Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A et al. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. Development 1996: 122: 349-358.

56. Leon TY, Ngan ES, Poon HC et al. Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3. J Pediatr Surg 2009: 44: 1904-1912.

57. Hatano M, Iitsuka Y, Yamamoto H et al. Ncx, a Hox11 related gene, is expressed in a variety of tissues derived from neural crest cells. Anat Embryol (Berl) 1997: 195: 419-425.

58. Hatano M, Aoki T, Dezawa M et al. A novel pathogenesis of megacolon in Ncx/Hox11L.1 deficient mice. J Clin Invest 1997: 100: 795-801.

59. Shirasawa S, Yunker AM, Roth KA et al. Enx (Hox11L1)-deficient mice develop myenteric neuronal hyperplasia and megacolon. Nat Med 1997: 3: 646-650.

60. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci 1991: 14: 453-501.

61. Borghini S, Bachetti T, Fava M et al. The TLX2 homeobox gene is a transcriptional target of PHOX2B in neural-crest-derived cells. Biochem J 2006: 395: 355-361.

62. Anderson DJ. MASH genes and the logic of neural crest cell lineage diversification. C R Acad Sci III 1993: 316: 1082-1096.

63. Le Douarin N. Migration and differentiation of neural crest cells. Curr Top Dev Biol 1980: 16: 31-85.

64. Anderson DJ, Michelsohn A. Role of glucocorticoids in the chromaffin-neuron developmental decision. Int J Dev Neurosci 1989: 7: 475-487.

65. Huber K, Combs S, Ernsberger U et al. Generation of neuroendocrine chromaffin cells from sympathoadrenal progenitors: beyond the glucocorticoid hypothesis. Ann N Y Acad Sci 2002: 971: 554-559.

66. Ernsberger U, Reissmann E, Mason I et al. The expression of dopamine beta-hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and Phox2 transcription factors in sympathetic neurons: evidence for common regulation during noradrenergic induction and diverging regulation later in development. Mech Dev 2000: 92: 169-177.

67. Huber K, Bruhl B, Guillemot F et al. Development of chromaffin cells depends on MASH1 function. Development 2002: 129: 4729-4738.

68. Huber K, Karch N, Ernsberger U et al. The role of Phox2B in chromaffin cell development. Dev Biol 2005: 279: 501-508.

69. Berry-Kravis EM, Zhou L, Rand CM et al. Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype. Am J Respir Crit Care Med 2006: 174: 1139-1144.

70. Rohrer T, Trachsel D, Engelcke G et al. Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies. Pediatr Pulmonol 2002: 33: 71-76.

71. Gozal D. Congenital central hypoventilation syndrome: an update. Pediatr Pulmonol 1998: 26: 273-282.

72. Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. Nat Genet 2003: 33: 459-461.

73. Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L et al. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. Am J Med Genet A 2003: 123A: 267-278.

74. Sasaki A, Kanai M, Kijima K et al. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. Hum Genet 2003: 114: 22-26.

75. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. Am J Hum Genet 2004: 74: 761-764.

76. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. Am J Hum Genet 2004: 75: 727-730.

77. Perri P, Bachetti T, Longo L et al. PHOX2B mutations and genetic predisposition to neuroblastoma. Oncogene 2005: 24: 3050-3053.

78. van Limpt V, Schramm A, van Lakeman A et al. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. Oncogene 2004: 23: 9280-9288.

79. McConville C, Reid S, Baskcomb L et al. PHOX2B analysis in non-syndromic neuroblastoma cases shows novel mutations and genotype-phenotype associations. Am J Med Genet A 2006: 140: 1297-1301.

80. Raabe EH, Laudenslager M, Winter C et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. Oncogene 2008: 27: 469-476.

81. Longo L, Borghini S, Schena F et al. PHOX2A and PHOX2B genes are highly co-expressed in human neuroblastoma. Int J Oncol 2008: 33: 985-991.

82. Wilzen A, Nilsson S, Sjoberg RM et al. The Phox2 pathway is differentially expressed in neuroblastoma tumors, but no mutations were found in the candidate tumor suppressor gene PHOX2A. Int J Oncol 2009: 34: 697-705.

83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001: 25: 402-408.

84. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001: 29: e45.

85. D'Haene B, Vandesompele J, Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. Methods 2010: 50: 262-270.

86. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002: 3: RESEARCH0034.

87. Chen Y, Takita J, Choi YL et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. Nature 2008: 455: 971-974.

88. Serra A, Haberle B, Konig IR et al. Rare occurrence of PHOX2b mutations in sporadic neuroblastomas. J Pediatr Hematol Oncol 2008: 30: 728-732.

89. Wilkie AO. The molecular basis of genetic dominance. J Med Genet 1994: 31: 89-98.

90. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 1971: 68: 820-823.

TÜRK PEDİATRİK ONKOLOJİ GRUBU
NÖROBLASTOMA TEDAVİ PROTOKOLÜ
GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Çalışma Başlığı: *Nöroblastik Tümörlerdeki Bölgesel DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin, Allelik Dengesizliklerin Tanımlanması ve Schwann Hücresi-Nöroblastik Hücre Etkileşiminin Hücre Hattı Modellerinde Araştırılması.*

İyi ve kötü huylu tümör hücrelerinin kalıtım materyalinde çeşitli değişiklikler (bozukluklar) olmaktadır. Bu bozukluklar tümör hücrelerine ait kromozomların yapılarında ya da sayılarındaki değişiklilikler şeklinde olabildiği gibi, kalıtım materyali olarak işlev yapan DNA molekülündeki nükleotid dizi değişiklikleri şeklinde de olabilmektedir. Tümör hücrelerine ait kalıtım materyalinin çeşitli yöntemlerle incelenmesi; bu hastalıklara tanı konulabilmesine, hastalığın seyrine ya da tedavi yanıtına ilişkin bilgi verebilmektedir.

Tanı veya tedavi amaçlı test yapılması:

1. Yapılan test nöroblastom ön tanısı konmuş hastalarındaki DNA ve/veya kromozom değişikliklerine yönelik olup sadece bu hastalığa yönelik bilgi verir. Diğer hastalıklarla ilgili herhangi bir bilgi veya fikir vermez.
2. Yapılan test ya da testler Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından desteklenen, 2007.KB.SAG.023 no'lu projeden finanse edilmekte olup, Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastoma Protokolü çerçevesinde sürdürülmektedir. Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmaktadır. Hasta örnekleri yalnızca bu protokole katılan birimlerden kabul edilmektedir.
3. Söz konusu proje bir araştırma projesi olup, klinik anlamı olan sonuçlar, hasta yararı birincil derecede gözetilmek üzere refere eden hekime ve/veya hastaya aktarılacaktır.
4. Bu çalışmada kar amacı güdülmemektedir. Örneği gönderilen hiçbir hastadan maddi bedel ya da bağış talep edilmemektedir.
5. Biyolojik örneğin söz konusu protokole katılan merkezlerden analizin yapıldığı merkeze uygun koşullarda ve zamanında aktarılması konusunda proje ekibi sorumluluk taşımamaktadır.
6. DNA ve/veya RNA analiz testleri için hastadan biyolojik örnek (kan, kemik iliği, tümör dokusu) almak gereklidir.
7. Örneğin yeterli olmadığı veya uygun koşullarda alınmadığı durumlarda sonuç elde edilemeyebilir. Bu durumlarda yeniden aynı veya farklı dokudan örnek alınması gerekebilir.
8. Sonuçlar genellikle 2-4 hafta içinde verilir. Bazı özel durumlarda bu süre daha uzun olabilir.
9. Sonuçlar hasta (veya hastanın belirlediği bir yakını) ve hastayı laboratuara refere eden hekim (veya onun tayin ettiği bir vekil) dışında üçüncü şahıslara kesinlikle aktarılmaz.
10. Hastaya ait tüm kişisel ve tıbbi bilgiler bir kayıt numarası altında, yalnızca proje çalışanları tarafından erişilebilen bir veri tabanında saklanacaktır. Üçüncü şahıslara (işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi) bu kayıt numarasındaki örneğin kime ait olduğu kesinlikle söylenmeyecektir.
11. Sonucun normal çıkmış olması yapılmakta olan rutin kontroller ve tedavinin kesilmesi anlamını taşımamaktadır.
12. Laboratuara gönderilen örnekten hekim tarafından istenen tetkik yapıldıktan sonra kalan örnekte;
    a. Nöroblastom tanısı almış hastalık ile ilgili, aynı hastalık veya rahatsızlığa sahip kişilere yarar sağlayacak ve içinde bulunduğum tıbbi durumun, temel biyolojik mekanizmalarına ışık tutacak deneyimli ve konusunda uzman kişilerce yapılacak olan, insan haysiyetini ve kimliğini koruyan, biyoloji ve tıbbın uygulanmasında kişiler arasında ayrım yapılmasına yol açmayan ve her türlü diğer hak ve özgürlüklerimi güvence altında tutan moleküler ve hücresel düzeydeki temel araştırmalarda kullanılması,
    b. Elde edilen bilgilerin tıbbi gizlilik altında korunacağı
    c. Hekimimin istediği tetkik dışında araştırma amaçlı vermiş olduğum bu ikinci izni istediğim zaman geri alabileceğimi, bu durumun devam eden ve daha sonra devam edecek laboratuar testlerimi aksatmayacağı,
    d. Vermiş olduğum örneğin dahil olacağı araştırmaların, genetik (kalıtım) materyalinin kullanılacağı çalışmalar olabileceği,
    e. Bu araştırmalardan elde edilen verileri, adım ve kişisel bilgilerim kullanılmadan hakemli bilimsel dergilerde Türkçe veya başka dillerde yayınlanabileceğinin bilinciyle **KABUL EDİYORUM.**

Yukarıdaki yazıyı okudum (veya sorumlu tarafından bana okundu) ve anladım. Yazıdaki tıbbi terimler açıklanarak soru sormak ve karar vermek için yeterli süre tanındı. Bu bilgiler ışığında benden/çocuğumdan ..... örneği alınarak nöroblastom genetik belirteçlerinin ("marker") saptanmasına yönelik moleküler analizlerin yapılmasına, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızam ile izin veriyorum. Elde edilen sonuçların hekimim veya onun tayin ettiği bir vekile elektronik ortamda, faks, posta, kurye veya kargo yoluyla gönderilmesine ya da elden verilmesine izin veriyorum.

Gönüllünün (Velayet sahibinin)*	**Açıklama Yapan Sorumlunun**
Adı:	**Adı:**
Soyadı:	**Soyadı:**
Tarih:	**Tarih:**
Adres/Tel:	**Adres/Tel:**
İmza:	**İmza:**
Olur Alma İşleminde Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin	
Adı Soyadı, Unvanı: Tarih:	İmza:

*Hasta küçük çocuk ise velayet sahibi belirtilecektir. Bu form bir sayfadır ve bir kopyası hastaya/yakınına verilmiştir.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Etik Kurul Üyeleri
Prof.Dr.A.Arzu SAYINER
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Servet AKAR
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 30 Temmuz 2009' tarih ve 22/18/2009 no.lu toplantısında; 256/2009 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Oğuz Altungöz'ün proje yöneticisi ve Yüksek Lisans öğrencisi H.Onur Çağların sorumlusu olduğu, "**Neuroblastom olgularında edinsel Phox2B mutasyonlarının saptanması ve tümör davranışı ile birlikteliğinin araştırılması** " isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr.A.Arzu SAYINER
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

Tel: 0232 412 22 54

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 23.07.2007/ 274

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

Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

tik Kurul Sekreteri
atice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 19 Temmuz 2007 tarih ve 11/18/2007 no.lu toplantısında, 241/2007 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yard.Doç.Dr.Oğuz ALTINGÖZ'ün sorumlusu olduğu **"Nöroblastik tümörlerdeki bölgesel DNA kopya sayısı değişikliklerinin, allelik dengesizliklerin tanımlanması ve Schwann hücresi-Bnörablastik hücre etkileşiminin hücre hattı modellerinde araştırılması"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karara verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

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

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

Tel: 0232 412 22 54

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 21.12.2004/198

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Doç. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Doç. Dr. Uğur MUNGAN
Doç. Dr. Hüray İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Doç. Dr. Özgül SAĞOL
Doç. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mehmet Ali KOÇDOR
Doç. Dr. Kamer UYSAL
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR

Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun **21 Aralık 2004** tarih ve **15/17/04** no.lu toplantısında, **Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yard. Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'ün** sorumlu olduğu **565** protokol no.lu **"Kalıtımsal ve Non-Sendromik İşitme Kaybı Olguların Aday Lobuslardaki Mutosyonel Analizi"** isimli projenin hasta onam formunun hastanın anlayabileceği bir dille yeniden gözden geçirilerek tıp terimlerinden uzak bir şekilde yazılması gerekli görülmüştür.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Klinik ve Laboratuar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

ÖZGEÇMİŞ

1.GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	15.02.2011		
T.C. KİMLİK NO	15208577094		
ÜNVANI ADI SOYADI	Hasan Onur Çağlar, B.Sc.		
YAZIŞMA ADRESİ	Güzelyalı Mah. 41 Sokak No:1 Mediha Hanım Apt. Daire 4 Güzelyalı / İZMİR		
DOĞUM YILI	20.06.1985		
TEL		**GSM**	0 506 996 43 12
E-POSTA	biyonur@yahoo.com	**FAX**	-

2. EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	DERECE	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM/ANABİLİM DALI
10.06.2008	Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Biyoloji Böl. Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Opsiyonu

*(Lisans, Yüksek Lisans, Doktora, Tıpta Uzmanlık)

3. AKADEMİK VE MESLEKİ DENEYİM

KURUM/KURULUŞ	ÜLKE	ŞEHİR	BÖLÜM/BİRİM	GÖREV	GÖREV DÖNEMİ
Çekirge Devlet Hastanesi	Türkiye	Bursa	Servis Mikrobiyoloji Lab.	Stajer	Temmuz-Ağustos 2005

* (Başlangıç Tarihi – Bitiş Tarihi)

4. PROJE DENEYİMİ

PROJE ADI	KURUM	BÜTÇE	TARİH	GÖREV	PROJE TÜRÜ	ARDEB NO
Nöroblastom olgularında edinsel *PHOX2B* mutasyonlarının saptanması ve tümör davranışı ile birlikteliğinin araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	40.215 TL	2009-2011	Yürütücü	Yüksek Lisans	-

* (Yürütücü, Araştırmacı/Uzman, Danışman, Bursiyer, Diğer)
** (Kurumsal (BAP v.b.), Ulusal, Uluslararası)
*** (TÜBİTAK ARDEB projeleri için 123A456 formatındaki proje numarası)