

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**P14<sup>ARF</sup> METİLASYONUNUN  
NÖROBLASTOM MİNİMAL REZİDÜEL  
HASTALIKTAKİ ROLÜ**

**Uzm.Dr. ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR**

**TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2009**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**P14<sup>ARF</sup> METİLASYONUNUN  
NÖROBLASTOM MİNİMAL REZİDÜEL  
HASTALIKTAKİ ROLÜ**

TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

**Uzm.Dr. ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR**

Danışman Öğretim Üyesi: **Prof. Dr. H. NUR OLGUN**

Bu araştırma Türk Pediatrik Onkoloji Grubu tarafından “TPOG 2008 Araştırma Projelerini Destekleme Programı” kapsamında 08/535 sayı ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Doktora Programı öğrencisi Uzm.Dr. Zübeyde Erbayraktar'ın “**P14<sup>ARF</sup> Metilasyonunun Nöroblastom Minimal Rezidüel Hastalıktaki Rolü**” isimli doktora tezi ..... tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek **Başarılı** bulunmuştur.

### **JÜRİ BAŞKANI**

Prof. Dr. H. NUR OLGUN  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı

### **JÜRİ ÜYELERİ**

Prof. Dr. MÜNİR KINAY  
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Prof. Dr. GÜLDAL KIRKALI  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. NAZAN ÇETİNGÜL  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. SAVAŞ KANSOY  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İçindekiler .....	<i>i</i>
Tablo listesi .....	<i>iii</i>
Şekil listesi .....	<i>iv</i>
Kısaltmalar .....	<i>v</i>
Teşekkür .....	<i>vi</i>
<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>5</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>7</b>
2.1 Nöroblastom: Tanımı ve Özellikleri .....	7
2.1.1 Nöroblastom Tedavi Protokolünde İzlenen Stratejiler Nelerdir? .....	12
2.1.2 TPOG-NB-2003 Riske Dayalı Tedavi Yaklaşımı .....	14
2.2 Metilasyon ve Kanser .....	15
2.2.1 p14 <sup>ARF</sup> Metilasyonunun Kanser Oluşum Sürecindeki Önemi .....	17
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b> .....	<b>19</b>
3.1 Hücre Kültürü .....	20
3.1.1 Hücrelerin Çoğaltılması .....	20
3.1.2 İn Vitro Minimal Rezidüel Hastalık Modelinin Oluşturulması .....	20
3.1.3 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Testi .....	22
3.2 MYCN ve p14 <sup>ARF</sup> Gen İfadelerinin Analizi .....	23
3.2.1 Total RNA İzolasyonu .....	23
3.2.2 DNA İzolasyonu .....	23

3.2.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi .....	24
3.2.4 Real time-PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri .....	24
3.2.5 DNA Metilasyon qPCR Analizleri .....	25
3.3 Protein Düzeylerinin Ölçümü .....	28
3.3.1 Nükleer Ekstraksiyon .....	28
3.3.2 ELİSA Deneyi .....	28
3.4 İstatistiksel Analiz .....	29
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>43</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>49</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>
<b>8. EK.1 .....</b>	<b>56</b>

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1.** Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflaması (INPC)

**Tablo 2.** Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS)

**Tablo 3.** Çocuk Onkoloji Grubunun (COG) kabul ettiği ve TPOG NB 2003 Protokolünde kullanılan Nöroblastom Risk Sınıflaması

**Tablo 4.** MYCN Onkogen Analizi Yapılmamış Olguların TPOG NB 2003 Protokolündeki Nöroblastom Risk Sınıflaması

**Tablo 5.** MYCN (+) hücre gruplarında gen ekspresyon ve p14<sup>ARF</sup> metilasyon oranları

**Tablo 6.** MYCN (-) hücre gruplarında gen ekspresyon ve p14<sup>ARF</sup> metilasyon oranları

**Tablo 7.** MYCN (+) hücre gruplarında p53 protein düzeyleri

**Tablo 8.** MYCN (-) hücre gruplarında p53 protein düzeyleri

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Sınıflandırma (International Neuroblastoma Pathology Comitte-1999)
- Şekil 2.** Nöroblastomun hücresel ve moleküler belirleyicilere göre sınıflaması
- Şekil 3.** Kanser tanısı, risk belirleme ve tedavisinde epigenetik hedefler
- Şekil 4.** p14<sup>ARF</sup> geninin, p53 tümör baskılayıcı gen yolağını aktivasyon mekanizması
- Şekil 5.** Çalışmada kullanılan yöntemlerin genel akış şeması.
- Şekil 6.** TPOG-NB-2009 protokolü yüksek risk grubu tedavi şeması
- Şekil 7.** MYCN (+) hücre gruplarında MYCN geni PCR amplifikasyon eğrileri
- Şekil 8.** MYCN (+) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geni PCR amplifikasyon eğrileri
- Şekil 9.** MYCN (-) hücre gruplarında MYCN geni PCR amplifikasyon eğrileri
- Şekil 10.** MYCN (-) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geni PCR amplifikasyon eğrileri
- Şekil 11.** MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında protein düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 12.** MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geni promotor bölgesinin demetilasyon yüzdelerinin karşılaştırılması
- Şekil 13.** p14<sup>ARF</sup> promotor bölgesi metilasyon spesifik PCR amplifikasyon eğrileri
- Şekil 14.** p14<sup>ARF</sup> promotor bölgesi metilasyon spesifik PCR sıcaklık eğrileri
- Şekil 15.** MYCN (+) hücre gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 16.** MYCN (-) hücre gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması
- Şekil 17.** MYCN (+) kontrol grubu
- Şekil 18.** MYCN (-) kontrol grubu
- Şekil 19.** MYCN (+) 5-aza-CdR grubu
- Şekil 20.** MYCN (-) 5-aza-CdR grubu

## **KISALTMALAR**

NBL : Nöroblastom

MRD : Minimal Rezidüel Hastalık

TPOG : Türk Pediatrik Onkoloji Grubu

FBS : Fetal Bovine Serum

RT : Real Time

RT-PCR: Real Time – Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GADPH: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz

CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz 2A



## TEŞEKKÜR

Projenin mali kaynağını sağlayan Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Yönetim Kurulu'na,

Bu çalıŐmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçların yorumlanması aŐamalarında bilimsel görüŐlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danıŐmanım Prof.Dr. H. Nur OLGUN'a,

Laboratuvar çalışmalarının planlanması ve deneylerin gerçekleŐtirilmesi aŐamalarında bilimsel deneyim ve birikimini her zaman paylaŐan Prof.Dr. Güldal KIRKALI'ya,

Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvar olanaklarının kullanılmasını sağlayan Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr. Münir KINAY'a

Moleküler çalışmaların planlanması ve gerçekleŐtirilmesinde bilgi ve deneyimlerini paylaŐarak destek olan Zeynep ZADEOđLULARI'na, Ođr.Gr. Uzm.Dr. Serpil T. AKHİSAROğLU'na ve Doç.Dr. Ataç SÖNMEZ'e,

İstatistiksel analizlerin yapılması ve değerlendirilmesindeki katkıları için Doç.Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,

Bütün çalıŐmalarım boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eŐim Doç.Dr. R. Serhat ERBAYRAKTAR'a ve çalıŐmalarımdan dolayı benimle geçirmek istedikleri zamanlarından çaldığım canım kızım Duygu ERBAYRAKTAR ile canım oğlum Fadıl Alp ERBAYRAKTAR'a sonsuz teŐekkürlerimi bir borç biliyorum.

Zübeyde ERBAYRAKTAR

## ÖZET

### **P14<sup>ARF</sup> METİLASYONUNUN NÖROBLASTOM MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIKTAKİ ROLÜ**

Zübeyde ERBAYRAKTAR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji AD, İzmir.

Nöroblastom, primordial nöral krest hücrelerinden köken alan ve tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturan bir tümördür. Bir yaş altındaki çocukların en sık görülen tümörüdür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır.

Epigenetik değişiklikler, tümörün oluşumunda ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu değişikliklerin sonucunda görülen malign hücre genomu, spesifik histon modifikasyonlarının azalması ve bazı genlerin metilasyonu veya demetilasyonu ile karakterizedir. p14<sup>ARF</sup> metilasyonunun oluşturduğu tümöral etki, N-Myc gibi onkogenler tarafından aktive olduktan sonra p53 tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu bloke ederek hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen faktörleri inhibe etmek şeklindedir.

Bu çalışmada, Kelly (Nöroblastik, N-Myc +) ve SH-SY5Y (Nöroblastik, N-Myc -) insan nöroblastom hücre hatlarında p14<sup>ARF</sup> geni demetile edici bir ajan ile bloke edilerek Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) kemoterapi protokolünde kullanılan ilaçların tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca, p14<sup>ARF</sup> geninin N-Myc amplifikasyonu olan ve olmayan hücre hatlarındaki etkisi değerlendirilerek tümörün prognozunu ne yönde etkilediği ve sitotoksik etki değişikliği ile prognoz arasında bir ilişki bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. İlaçların hücre canlılığı ve hücre hasarına etkisi tripan mavisi boyaması ile değerlendirilmiştir. Nöroblastom hücre hatlarında sitotoksik etki farklılığı saptanmış, bu etkinin mekanizmalarını incelemek için p14<sup>ARF</sup> geninin metilasyon ve ekspresyon düzeyleri ile birlikte N-Myc ekspresyon düzeyleri hedef olarak seçilmiştir. p14<sup>ARF</sup> ve N-Myc mRNA ekspresyonu real-time PCR ile, protein ekspresyonu ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Projemizde, nöroblastomdaki minimal rezidüel hastalık modelinde p14<sup>ARF</sup> geninin N-Myc amplifikasyonu ile olan ilişkisi ve bu ilişkinin rutin kemoterapi protokolünde kullanılan ilaçlarla olan etkileşiminde demetilasyonun rolü, bugüne kadar henüz incelenmeyen epigenetik tedavi yaklaşımı sınırlarında geniş kapsamlı olarak araştırılmış, metilasyon ilişkili tedavi ile tümörün prognozu arasında bir ilişki olup olmadığına dair önemli ipuçları elde edilmiş ve bu ilişkinin yönü ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, bu öncü çalışmada nöroblastomda minimal rezidüel hastalığın önlenmesinde; gerek tedavinin kesilmesinden sonra karşımıza çıkan erken ya da geç dönemdeki relapların tedavisine yönelik yeni bir yaklaşım önerisi elde edilmiş, gerekse de rutin kemoterapi protokolünde kullanılan ilaçların p14<sup>ARF</sup> gen düzeyleri üzerindeki etkileri geniş bir perspektifte incelenmiştir. İleriye yönelik olarak, p14<sup>ARF</sup> gen düzeyleri ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin prognostik öneminin araştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır. Yine ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu hücre serilerinde bu faktörlere karşı geliştirilmiş inhibitörlerin etkinliği de tedavide bu ekspresyonların önemini ortaya koyacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Nöroblastom, p14<sup>ARF</sup> geni, DNA metilasyonu, Minimal rezidüel hastalık

## ABSTRACT

### THE ROLE OF P14<sup>ARF</sup> METHYLATION IN NEUROBLASTOMA MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Zübeyde ERBAYRAKTAR

Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, Izmir.

Neuroblastoma originating from primordial neural crest cells constitutes 8-10 % of whole childhood cancers. It is the most frequently diagnosed tumor of infancy. Because of the variations in its biological behavior, neuroblastoma may show spontaneous regression, benign transformation or aggressive progression and this uncertainty leads to difficulties in predicting prognosis and treatment.

Epigenetic changes has a significant role in the occurrence and progression of the tumor and the resultant malignant cell genome is characterized by the reduction of specific histone modifications and methylation or demethylation of genes. Tumorigenesis effect of p14<sup>ARF</sup> methylation depends upon inhibiting factors that impairs cell proliferation via blocking p53 gene expression due to its N-Myc mediated activation.

In the present study, cytotoxic effects of blocked p14<sup>ARF</sup> by demethylating agent on Kelly (Neuroblastic, N-Myc +) and SH-SY5Y (Neuroblastic, N-Myc -) human neuroblastoma cell lines assigned according to whether Turk Pediatric Oncology Group (TPOG) chemotherapy protocol drugs are added. Moreover, with the evaluation of the effects of p14<sup>ARF</sup> gene on cell lines with or without N-Myc amplification a probable change in prognosis and any relation between cytotoxic effects and prognosis were investigated. Drug induced effects on cell viability, cell damage and apoptotic cell death ratio were assessed with trypan blue dying. The difference of cytotoxic effects were observed in neuroblastoma cell lines. For to investigate the mechanisms of this effect, p14<sup>ARF</sup> gen methylation and expression levels, and N-Myc expression levels were targeted. Expressions of mRNA and protein will be determined with real-time PCR and ELISA, respectively.

So that, in this project relationship between p14<sup>ARF</sup> gene and N-Myc amplification, as well as the role of gene methylation on chemotherapeutic agents in epigenetic treatment approach which has not been studied yet in minimal residual disease model of neuroblastoma, were investigated in detail and a possible relation between this treatment model and the prognosis and its direction were demonstrated.

In conclusion, in this pioneering study we have demonstrated that not only new therapeutic approach for early or late relapses following the ending of treatment were found but also effects of chemotherapeutic agents on p14<sup>ARF</sup> gene on this model were investigated in detail. Regarding our results, investigation of transcription factors with related p14<sup>ARF</sup> gene levels may help to determine prognosis in neuroblastoma. Moreover, development of targeted therapies against these transcriptional factors may be a therapeutic approach in the near future.

**Keywords:** Neuroblastoma, p14<sup>ARF</sup> gene, DNA methylation, Minimal residual disease

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

---

Nöroblastom, çocukluk çağının en yaygın olarak görülen solid tümörlerinden birisidir. Günümüzde özellikle ileri evre nöroblastom hastalarının tedavisinde uygulanan yoğun kemoterapi protokolleri ile hastanın yaşam süresi uzayabilmektedir. Ancak yaşam süresinin uzaması ile birlikte, tüm dünyada önemli bir problem olan geç relapsların görülme sıklığı da artmaktadır. Tedavinin kesilmesinden özellikle birinci yıldan sonra ortaya çıkan relapsların (geç relaps) sorumlusu olarak minimal rezidüel hastalık varlığı düşünülmektedir. Dolayısıyla minimal rezidüel hastalığı ortadan kaldırmaya yönelik idame tedavileri giderek önem kazanmaktadır (1, 2, 3).

Son yıllarda üzerinde oldukça aktif bir şekilde çalışılan epigenetik değişikliklerin, onkogenlerin aktivasyonu, genomik instabilite ve tümör supresör genlerin transkripsiyonunun azaltılması yoluyla karsinogenez sürecini başlattıkları bilinmektedir (4). Kanser oluşumunda ve progresyonunda rol oynayan epigenetik değişikliklerin önemi anlaşıldıkça yeni terapötik hedefler ortaya çıkmaktadır.

Onkolojik tedavide amaç, etkin ancak daha az yan etkili tedavi protokolleri ile hastanın yaşam süresini uzatmak ve kaliteli bir yaşam sağlayarak en iyi sonuçları elde etmektir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, hasta ailesinin ve devletin sosyoekonomik dengesini koruyacak, hastanın hayat kalitesini yüksek tutacak, uygulamanın kolay olduğu ve hasta takibini kolaylaştıran tedavi yöntemlerini seçmek gerekmektedir. Nöroblastomda özellikle ileri evre hastalarda katedilen mesafe, uygulanan multimodal tedavi protokolleri ve alternatif tedavilere rağmen çok azdır. Dolayısıyla, acilen yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir (5, 6, 7).

Araştırmamızın amacı, nöroblastom hücre kültürlerinde in vitro minimal rezidüel hastalık modelini oluşturmak, bu modelde epigenetik tedavi yaklaşımını irdelemek, bunun için de, p14<sup>ARF</sup> genini demetile edici bir ajan olan 5'-Aza-2-deoxycytidine (5-aza-CdR) uygulayarak N-Myc ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerini incelemek, eğer varsa bu ilişkinin rutin kemoterapi protokolünde kullanılan ilaçlarla olan etkileşiminde p14<sup>ARF</sup> geni

demetilasyonunun rolünü incelemektir. Kanser hücrelerinde proliferasyonu durdurucu, diferansiyasyonu artırıcı ve apoptozisi uyarıcı etkileri olan tedavi protokollerine, antitümöral etkinlikte de sinerjizm gösterecek yeni mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu hipotezi sınamak amacıyla çalışmamızda, Kelly (Nöroblastik, MYCN+) ve SHSY5Y (Nöroblastik, MYCN-) insan nöroblastom hücre hatlarında ve minimal rezidüel hastalık modelinde, p14<sup>ARF</sup> gen metilasyonunun ve demetile edici ajan (5'-aza-CdR) ile demetilasyonunun rutin kemoterapi protokolünde kullanılan ilaçlarla (Vinkristin, Dakarbazin, İfosfamid, Doksorubisin, Siklofosfamid, Etoposid, Sisplatin) olan etkileşimi ve tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi ile p14<sup>ARF</sup> gen metilasyonunun, tümörün prognozunu ne yönde etkilediği ve sitotoksik etki ile prognoz arasında bir ilişki bulunup bulunmadığının araştırılması planlanmıştır.

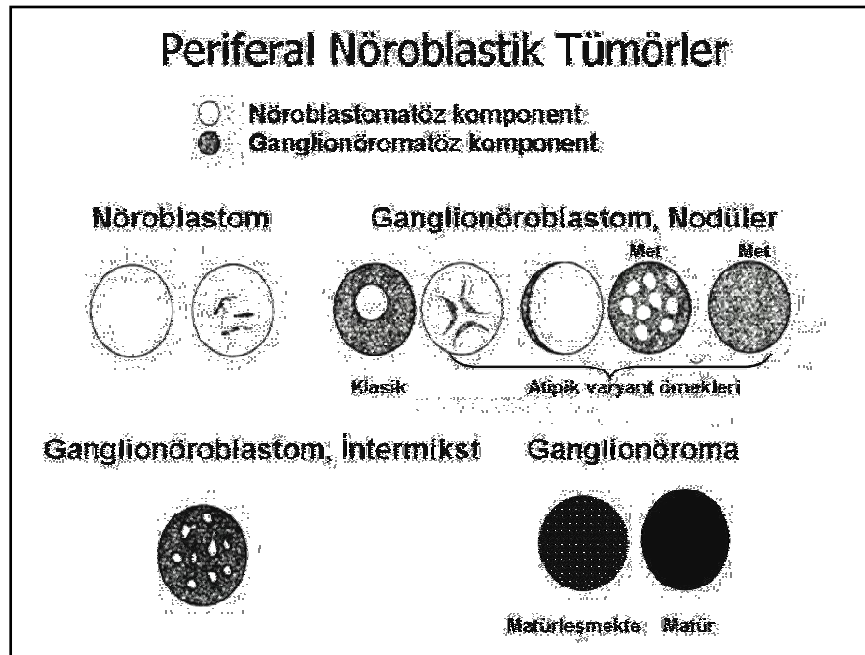
Araştırmamız, nöroblastom minimal rezidüel hastalık modelinde bugüne kadar henüz incelenmemiş olan, tümörün regresyon ya da progresyon yapma kararında kritik bir rol oynayabileceğini düşündüğümüz p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerini, p14<sup>ARF</sup> gen metilasyonunun N-Myc ekspresyonu üzerindeki etkisini ilk kez inceleyecek olması, olası etkilerinin hücrel ve moleküler mekanizmaları ile birlikte irdelenmesi, yeni tedavi yaklaşımlarının ve prognostik belirteçlerin öngörülmesini sağlayacak olması açısından literatürde öncü çalışma olacaktır.

### 2.1 NÖROBLASTOM: Tanım ve Özellikleri

Nöroblastom, çocukluk çağıının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Primordial nöral krest hücrelerinden köken alır. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. Bir yaş altındaki çocukların en sık görülen tümörü olan nöroblastom, çocukluk yaş grubunda santral sinir sistemi tümörlerinden sonra ikinci sıklıkta karşımıza çıkmaktadır (8).

Periferik Nöroblastik Tümörler (PNT), nöroblastom (NB), ganglionöroblastom (GNB) ve ganglionörom (GN)'dan oluşan bir tümör grubudur (Şekil 1). Bu tümörler başta adrenal bezi olmak üzere, sempatik sinir sistemine ait dokulardan köken alırlar. PNT histolojik olarak nöroblastomatöz ve ganglionöromatöz komponentlerden meydana gelir (9):

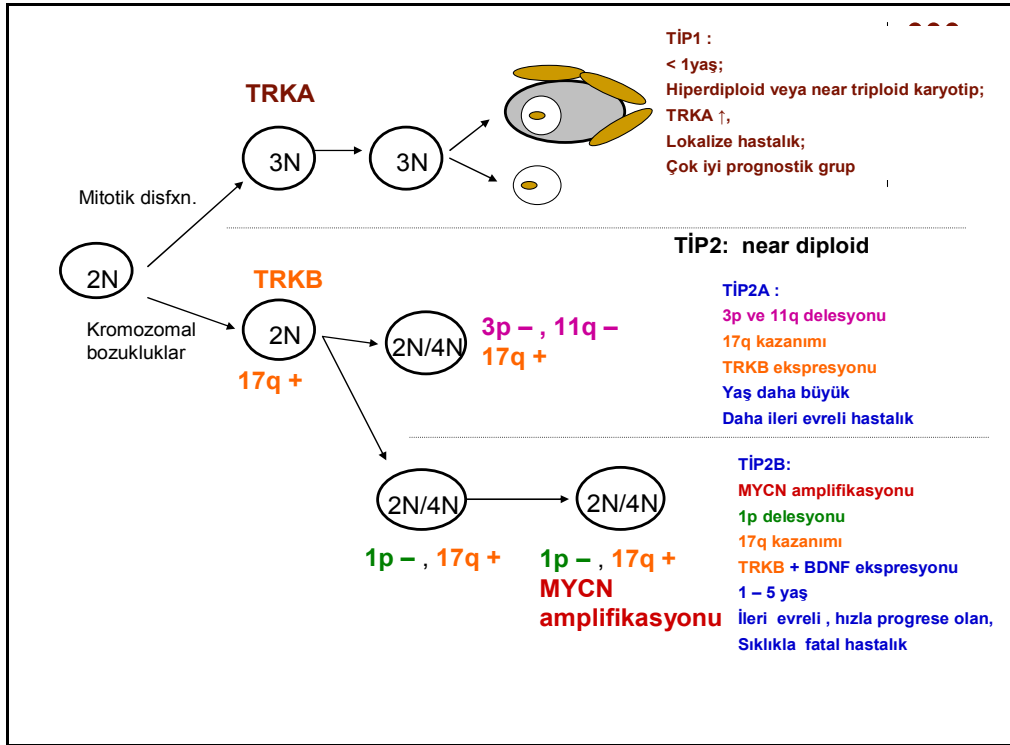
- Nöroblastomatöz komponent, andifferansiye ya da differansiye nöroblastları ve stromasında nöropili içerir.
- Ganglionöromatöz komponent, ganglion hücrelerinden, fasiküler nörotik uzantıları olan Schwann hücrelerinden (Schwannian stroma) ve matür fibröz dokudan oluşur.



Şekil 1. Sınıflandırma (International Neuroblastoma Pathology Committee-1999)



Nöroblastom gerek klinik davranışı, gerekse tümör hücrelerinde gözlenen genetik değişiklikler bakımından heterojen özellik gösteren bir tümördür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır (10). Hastalık olguların % 40'ından fazlasında letal olup çocukluk çağı tümörlerine bağlı ölümlerin yaklaşık % 15'ini oluşturur. Nöroblastom olgularında çeşitli edinsel genetik değişiklikler gözlenmektedir. Bu değişiklikler arasında MYCN onkogeninin amplifikasyonu, 1p36 ve 11q23 kromozom bölgelerinin delesyonu, 17 no'lu kromozomun uzun kolunda gözlenen dengesiz kopya sayısı artışları yeterince tanımlanmış olup, bu değişikliklerin tümör davranışı ve tedaviye yanıtla birliktelik gösterdiği bilinmektedir (Şekil 2) (11).



**Şekil 2.** Nöroblastomun hüresel ve moleküler belirleyicilere göre sınıflaması

Tümör davranışını ve tedaviye yanıtı etkileyen bir diğer kriter, tümörün histopatolojik özelliğidir. Tümör hücre tipine göre nöroblastik (N-tip), stromal (S-tip) ve intermedier (I-tip) diye başlıca üç sınıfa ayrılır. *N-tip nöroblastom hücreleri*, nöronal, dar stoplazmalı, nöroflamanlar ve psödoganglion oluşturmaya eğilimli, granin ve nörotransmitter enzim

ekspresyonu yapabilen, malign hücrelerdir. *S-tip nöroblastom hücreleri (substrate-adherent cells)*, nöronal olmayan, geniş stoplazmalı, vimentin ve CD44 ekspresyonu yapabilen, malign olmayan hücrelerdir. *I-tip nöroblastom hücreleri (stem cells)* ise hem N-tip hem de S-tip hücrelerin özelliklerine sahiptir, bu hücre tiplerinden daha malign karakterlidir. Tümörün başlaması, proliferasyonu ya da differansiyasyonu ve spontan regresyonu ile yakından ilişkilidir. I-tip hücrelerin potansiyeli ne yönde ise tümörün davranışı o yönde olmaktadır. İleri evre nöroblastom hastalarında ve rekürren nöroblastom hastalarında I-tip hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca N-tip nöroblastom hücreleri, yüksek miktarda MYCN proteini eksprese ederler ve bunlar çoğunlukla yüksek risk taşıyan tümör hücreleridir. Çünkü MYCN onkogeni transkripsiyonu aktive ederek proliferasyonu ve tümörün büyümesini artırırken, differansiyasyonu azaltır (12).

Bu bilgilerin ışığında, uluslar arası arenada, prognostik sınıf, yaş, histolojik incelemede diferansiyasyon ve mitoz karyoreksis indeksi (MKI) özelliklerini kapsayan Shimada'nın patoloji sınıflama sistemi (International Neuroblastoma Pathology Classification, "INPC") kullanılmaktadır (Tablo 1) (13).

**Tablo 1.** Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflaması (INPC)

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

Nöroblastom'un klinik evrelemede ise genel kabul gören, cerrahiye dayalı uluslar arası nöroblastom evreleme sistemidir (International Neuroblastoma Staging System, "INSS") (Tablo 2); tedavi protokollerinin oluşturulmasında yapılması gereken nöroblastom risk

sınıflamasında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Çocuk Onkoloji Grubu (Children Oncology Group "COG") nun sistemi (Tablo 3) kullanılmaktadır.

**Tablo 2.** Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS)

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

Avrupa Nöroblastom Grubu (International Society of Pediatric Oncology European Neuroblastoma Group, SIOPEN) ise, gerek cerrahi risk faktörlerine, gerekse sitogenetik, moleküler genetik, patolojik faktörlere dayalı bir risk klasifikasyon sistemi oluşturmaya çalışmaktadırlar. Bu klasifikasyon çalışmalarının da tamamlanmak üzere olduğu bildirilmiştir (14).

Nöroblastom olgularının klinikte sitogenetik, moleküler genetik, patolojik değerlendirme ve evreleme çalışmaları tamamlandıktan sonra, uygun tedavi protokollerinin seçilmesi için risk sınıflaması yapılmakta ve riske dayalı tedavi protokolleri uygulanmaktadır.

Türkiye'de nöroblastom tanılı çocuk hasta sayısını, karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla ilk kez, 1992'de Ege Bölgesi'nde İzmir Pediatrik Onkoloji Grubu (İPOG-1992) kurulmuştur. İPOG-1992 nöroblastom tedavi protokolüyle başlayan çalışmalar, daha sonra TPOG-NB-2003 (Türk Pediatrik Onkoloji Grubu - Nöroblastom - 2003) protokol çalışmasıyla devam etmiştir. TPOG-NB-2003 protokolü, Türkiye'deki 30 çocuk onkoloji merkezinde 01.10.2002 tarihinde uygulanmaya başlanmış; 2009 yılında ise, 2003 protokolü tamamlanmış ve yeni protokole geçilmiştir. Bu protokollerin amacı, Türkiye'deki nöroblastom tedavisinin standardize edilmesi ve yoğun tedavi protokollerinin ülkemiz

koşullarında uygulanabilirliğinin değerlendirilmesidir. TPOG-NB-2009 tedavi protokolünde de yukarıda sözü edilen risk klasifikasyonu (Tablo 3) kullanılmaktadır.

**Tablo 3.** Çocuk Onkoloji Grubunun (COG) kabul ettiği ve TPOG NB 2003 Protokolünde kullanılan Nöroblastom Risk Sınıflaması

<b>RİSK Grubu</b>	<b>INSS Evre</b>	<b>Yaş (yıl)</b>	<b>MYCN Amplifikasyonu</b>	<b>Shimada Histolojisi</b>	<b>DNA ploidi</b>
<b>Düşük</b>	1	0-21	herhangi	herhangi	herhangi
	2A-2B	<1	herhangi	herhangi	herhangi
	2A-2B	≥ 1	(-)	herhangi	herhangi
	2A-2B	≥ 1	(+)	iyi	herhangi
	4S	<1	(-)	iyi	> 1
<b>Orta</b>	3	<1	(-)	iyi	>1
<b>İyi Histoloji</b>	3	≥ 1	(-)	iyi	herhangi
	4	<1	(-)	iyi	>1
<b>Orta</b>	3-4	<1	(-)	iyi	1
<b>Kötü Histoloji</b>	3-4	<1	(-)	kötü	>1
	4S	<1	(-)	kötü	herhangi
	4S	<1	(-)	iyi	1
<b>Yüksek</b>	2A-2B	≥ 1	(+)	kötü	
	3	0-21	(+)	herhangi	herhangi
	3	≥ 1	(-)	kötü	herhangi
	4	>1	herhangi	herhangi	herhangi
	4	<1	(+)	herhangi	herhangi
	4S	<1	(+)	herhangi	herhangi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda tümör dokusu veya tutulu kemik iliği örneklerinde MYCN onkogen amplifikasyonu çalışılmakta ve MYCN için 10 kopyanın üzeri amplifikasyon olarak kabul edilmektedir. Hastalarda MYCN onkogen amplifikasyonu çalışılmamış ise, bu grup için yaş, INSS evre ve INPC histolojik inceleme sonucu dikkate alınarak risk sınıflaması yapılmaktadır (Tablo 4).

**Tablo 4.** MYCN Onkogen Analizi Yapılmamış Olguların TPOG NB 2003 Protokolündeki Nöroblastom Risk Sınıflaması

<b>RİSK Grubu</b>	<b>INSS Evre</b>	<b>Yaş (yıl)</b>	<b>Shimada Histolojisi</b>
<b>Düşük</b>	1	0 – 21	herhangi
	2a – 2b	0 – 21	herhangi
	4S	<1	İyi
<b>Orta</b>	3	0 – 21	İyi
<b>İyi Histoloji</b>	3	≥ 1	İyi
	4	<1	İyi
<b>Orta</b>	3 – 4	<1	Kötü
<b>Kötü Histoloji</b>	4S	<1	Kötü
<b>Yüksek</b>	3	≥ 1	Kötü
	4	> 1	herhangi

### 2.1.1 Nöroblastom Tedavi Protokolünde İzlenen Stratejiler Nelerdir?

Bugün dünyada uygulanan multimodal tedavi protokolleri, sitogenetik ve moleküler genetik özellikler, MYCN amplifikasyonu, klinik evre, yaş, DNA ploidisine göre hazırlanmış olan risk sınıflama sistemine dayanmaktadır. TPOG-NB-2009 protokolünde de bu sistem kullanılmaktadır (15).

Son yıllarda tümör biyolojisi hakkında bilgilerin artmasına, lokalize hastalıkta kombine tedavi protokolleri ile başarı sağlanmasına rağmen, özellikle 1 yaş üzeri ileri evre hastaların (E3+E4) prognozunda belirgin bir iyileşme sağlanamamıştır. Asıl problem evre 3 (E3) ve özellikle de evre 4 (E4)'dedir. Olguların yarısından fazlasının E3 ve E4'de tanı aldığı göz önüne alınırsa, nöroblastomlu hastaların büyük bir kısmında bugünkü yoğun protokoller, kök hücre desteği ve immünoterapi yaklaşımlarına rağmen halen istenen başarı elde edilememektedir. İki yıllık hastalıksız yaşam süresi (Progression-free survival, PFS) %30–35 düzeylerinde kalmaktadır. Özellikle ileri evre hastalarda (minimal rezidüel hastalık görülme sıklığı yüksek olan grup) başarısızlık nedenlerini açığa çıkaracak ve bunları tedavi edebilecek yöntemlerin gelişmesine olanak tanıyan çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (15, 16).

Nöroblastomda, Sisplatin'e dayalı kemoterapi protokolleriyle başlayan çalışmalar bugün, Sisplatin, Siklofosamid, Doksorubisin, Vinkristin, Dakarbazin, İfosamid ve Etoposid'den oluşan çoklu kemoterapötik ajanların oluşturduğu tedavi protokolleriyle devam etmektedir. Ayrıca bu protokollere ek olarak primer tümör bölgesine ve metastazlara radyoterapi uygulanmakta ve cerrahinin de katkısıyla birlikte yani, multimodal tedavi protokolleriyle hastalıkta başarı elde edilmeye çalışılmaktadır. Bu tedavi yaklaşımlarına ek olarak, özellikle ileri evre yüksek risk hastalarda yüksek doz kemoterapi protokolleri, immünoterapi protokolleri, antianjiyogenik tedaviler, apoptotik tedavi yaklaşımları, I<sup>123</sup>-metaiyodobenzilguanidin (I<sup>123</sup>-MIBG) tedavi protokolleri gündemdedir (17).

Bu protokollerle olguların yaşam süreleri uzarken, beraberinde geç relapsların da görülme sıklığı artmaktadır. Tedavi kesimini takiben 1 yıldan sonra ortaya çıkan relapslar, "geç relaps" olarak isimlendirilmektedir. Nöroblastomda geç relapslardan sorumlu olan en önemli faktör, minimal rezidüel hastalık (Minimal Residual Disease, MRD) tır. Bu nedenle MRD'yi kontrol etmeye yönelik idame tedavileri, son 15 yılda giderek önem kazanmaktadır (18).

İdame tedavilerinde; düşük doz kemoterapi (metronomik tedavi), sitotoksik ajanlar, diferansiye edici ajanlar (13-sisretinoik asit) ve immünoterapi yöntemleri (nöroblastom GD2 antijenine karşı geliştirilmiş monoklonal antikor tedavisi) denlenmektedir (19).

Alman Pediatrik Onkoloji - Hematoloji Grubu (GPOH), tedavinin geç dönemlerinde tümör hücrelerinin sensitif faza geç girmeleri nedeniyle geç relapsların olabileceği ve bu nedenle hücre ölümünün gerçekleştirilebilmesi gerektiği düşüncesinden yola çıkarak ilk kez, 1982 nöroblastom tedavi protokolünde ileri evre olgularda idame tedavisi protokolünü oluşturmuşlardır (19).

Bugün Amerika Çocuk Onkoloji Grubu, yüksek doz kemoterapi protokollerinin ardından 13-sisretinoik asit ya da monoklonal antikor gibi ajanları idame tedavisi olarak kullanmaktadır. Avrupa Nöroblastom Grubu (SIOPEN) da nöroblastomda idame tedavisi kullanmaya başlamıştır (19).

TPOG tarafından 1992 yılında hazırlanmış olan nöroblastom tedavi protokolüne göre tedavi edilen hastalarda da, geç relapslar (61. ayda) görülmektedir (20). TPOG-1992

nöroblastom tedavi protokolünden elde edilen deneyimlerle hazırlanan 2003 protokolünde, özellikle yüksek riskli hasta grubuna idame tedavisi eklenmiştir.

### **2.1.2 TPOG-NB-2003 Riske Dayalı Tedavi Yaklaşımı**

**Düşük risk grubunda (DRG);** evre 1’de sadece cerrahi, evre 2’de cerrahiye ek 3 kür kemoterapi (sisplatin, vinkristin, ifosfamid), evre 4S’de cerrahiye ek 4 kür kemoterapi (vinkristin, siklofosfamid) verilmektedir.

**Orta risk grubunda (ORG);** cerrahiye ek 2 – 4 kür kemoterapi (vinkristin, ifosfamid, dakarbazin, adriamisin / sisplatin, siklofosfamid, etoposid) verilmektedir. İdame tedavi ve 13 cis-retinoik asit 10 hafta verilmektedir. Rezidüel hastalığa radyoterapi uygulanmaktadır.

**Yüksek risk grubunda (YRG);** hastalar tanı sonrası sorumlu hekimin kararına göre konvansiyonel kemoterapi (KKT) veya yüksek doz kemoterapi(YDKT)+otolog kök hücre nakli(OKHN) ile tedavi edilmektedirler.

**YRG-KKT** kolunda 4 kür kemoterapi (vinkristin, ifosfamid, dakarbazin, adriamisin / sisplatin, siklofosfamid, etoposid), ardından geciktirilmiş cerrahi, 6 ay idame kemoterapi verilmektedir.

**YRG-OKHN** kolunda 3 kür kemoterapi (vinkristin, ifosfamid, dakarbazin, adriamisin / sisplatin, siklofosfamid, etoposid), geciktirilmiş cerrahi ve hazırlama rejiminden (karboplatin, etoposid, melfalan) oluşur. Primer tümör bölgesine radyoterapi uygulanır.

Her iki gruba da 6 ay süreyle 13-cis retinoik asit verilmektedir (18).

## 2.2 METİLASYON VE KANSER

Metilasyon, memeli DNA'sında gerçekleştiği bilinen tek kovalan olaydır ve sadece CG (CpG) dinükleotidlerinde bulunan sitozinlerde meydana gelir. 1950 yılından beri varlığı bilinen 5-metilsitozin (5 mC), modifiye bir bazdır ve genomdaki bazların yaklaşık %4'ünü oluşturur. Metile CpG dinükleotidlerinin çoğu; sentromerik tekrarlar, satellit dizileri ve tekrarlayan genler gibi dizilerde yer alır. Tüm genomun yaklaşık %2'sini ve CpG'lerin yaklaşık %15'ini oluşturan CpG adacıkları ise; 0,2-1 kb uzunluktadır ve insan genomundaki genlerin yaklaşık %50'sinin promotor bölgelerinde bulunur (21).

DNA metilasyonu memeli genomunda transkripsiyonel baskılama, kromatin yapının değiştirilmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting, tekrarlayan ve parazitik DNA dizilerinin baskılanması gibi önemli etkilere sahiptir. Normal hücreler de ekstrasjenik DNA (CpG dinükleotidleri) metileyken, gen promotorlarında bulunan CpG adacıkları demetiledir, bunun istisnası X inaktivasyonuna ve genomik imprintinge uğrayan genlerdir; bunlar, normal hücrelerde de tek alelden ekspresyonun sağlanması için sadece bir alelde metiledir. Normal dokularda imprintinge ve X inaktivasyonuna uğrayan genler dışında da ender olarak CpG adacık metilasyonu gözlenir ve sıklıkla genin susturulmasına yol açar. Promotor bölgeden çok gen içindeki CpG adacıklarında saptanır, promotorda olması durumunda ise; CpG içeriği az olan promotor bölgelerde CpG yoğun olanlara göre daha fazla gözlenir. Promotor, bir genin 5' ucunda bulunan ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraza bağlanma bölgesi oluşturan DNA dizisidir ve gen ekspresyonunun kontrolünde önemli role sahiptir. Normal hücrelerde gözlenen promotor bölge metilasyonunun hücre farklılaşmasında, dokuya özgü genlerin ekspresyonunu düzenleyerek etkili olduğu düşünülmektedir (22).

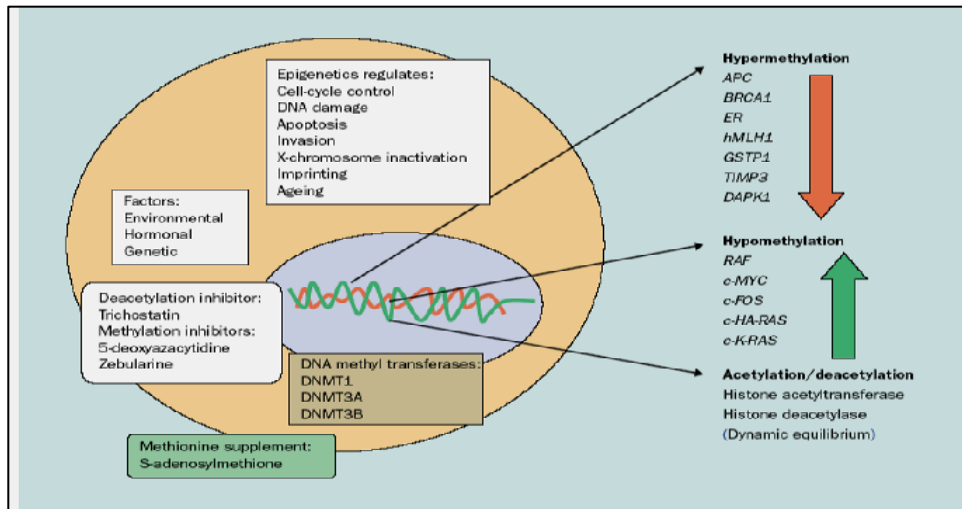
Epigenetik, en basit şekliyle çevre ve genetik arasındaki etkileşimdir; aynı genotipin nasıl olup da farklı fenotiplere yol açtığına en iyi açıklamasını sunar. Gen nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesinde kalıtılabilir değişimler gözlenmesi olarak tanımlanabilir. Epigenetik mutasyon olarak adlandırılabilen CpG adacıklarındaki metilasyon kalıbı değişikliği; her hücre bölünmesinde pasif olarak kalıtılan mutasyonların aksine, aktif olarak kalıtılır ve gen ifadesini değiştirebilir (22, 23). Epigenetiğin gen ifadesi kontrolündeki en



temel etkisi transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek mekanik değişiklikler yaratmasıdır. Bu mekanik etki, geri dönüşlü olması açısından DNA dizisinde gözlenen mutasyonlardan farklılık gösterir (23).

Kanser oluşumu; bir hücrenin, genetik yapısında ardı ardına oluşan kalıtılabilir değişikliklerin birikmesi sonucu, büyüme avantajı kazanması ile açıklanabilir. Bu süreçte etkili iki sınıf gen vardır, bunlar onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genlerin nükleotid dizisini değiştirerek hatalı protein yapımına neden olan, genin kopya sayısını değiştiren ya da transkripsiyonunu arttıran/azaltan değişiklikler kansere yol açabilir. Onkogenlerde gözlenen değişiklikler onların normalden fazla ifade bulmasına neden olurken, tümör baskılayıcı genlerde gözlenenler sıklıkla ekspresyon azalmasına yol açar. Kanser oluşumunda bir diğer hipotez de Knudson'un iki vuruş hipotezidir. Bu hipoteze göre, malign dönüşümün oluşabilmesi için organizmada tümör baskılayıcı genlerin iki alelinin de işlev kaybetmesi gereklidir. Bugün, bu iki vuruşun birinin genetik (nokta mutasyonu, delesyon, çerçeve kayma mutasyonu ...), diğerinin epigenetik (promotor metilasyonu) ya da her ikisinin de genetik veya epigenetik olabileceği bilinmektedir (24).

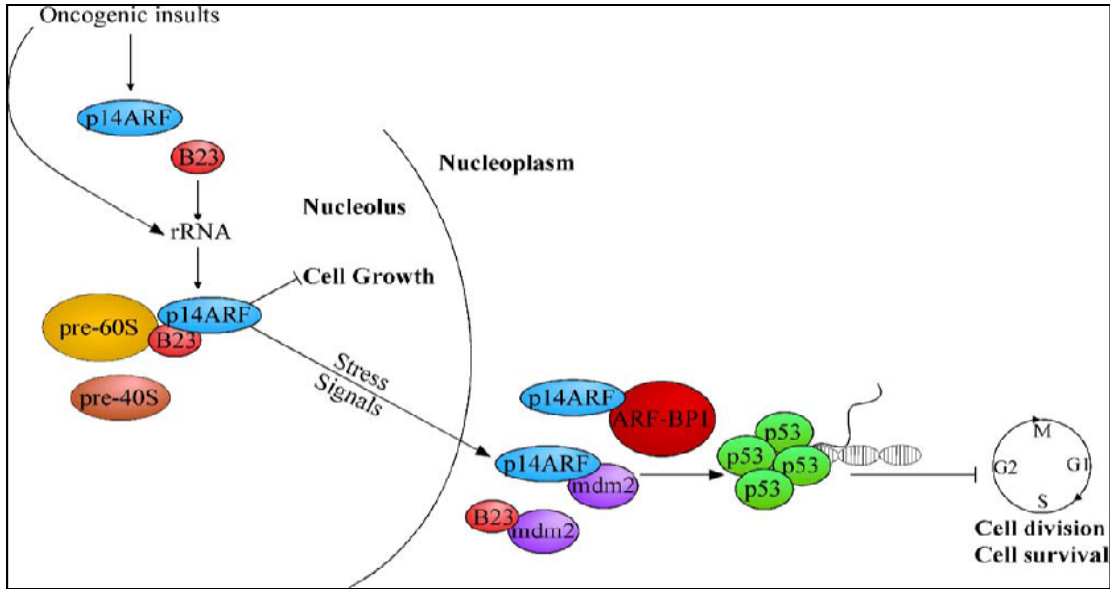
Antikanser tedaviler, sitotoksik etkilerini başlıca tümör hücrelerinde proliferasyonu durdurarak, diferansiyasyonu arttırarak ve apoptozisi uyararak gerçekleştirirler. Kanser tedavisinde son yıllardaki gelişmeler; kanser tanısı risk belirleme ve tedavisinde epigenetik yaklaşımların önemini vurgulamaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Kanser tanısı, risk belirleme ve tedavisinde epigenetik hedefler

### 2.2.1 p14<sup>ARF</sup> Metilasyonunun Kanser Oluşum Sürecindeki Önemi

Başlangıçta yüksek risk nöroblastomların çoğunda, sitotoksik tedavilere ve lokal radyoterapiye iyi yanıt alınıyor iken son zamanlarda, relaps sıklığının giderek artış gösterdiği izlenmektedir. Bunun da nedenleri arasında, tedavinin yoğunluğu ile korele bir şekilde gelişen ilaç direncinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (25). Tümör hücrelerindeki intrinsek kemorezistansın en önemli mekanizması, p53/MDM2/p14<sup>ARF</sup> yolağındaki anormalliklerdir. p53 geni, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13) lokalize olup tümör baskılayıcı olarak fonksiyon görür. Kanserlerin büyük bir çoğunluğunda p53 geninde mutasyon olduğu bilinmektedir. Onkojenik bir uyarın nedeniyle p53 geninin aktivasyonu sonucunda, hücre döngüsü duraklatılıp apoptoz ilişkili çok sayıda genin transkripsiyonu tetiklenir ve hasara uğramış olan hücre apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır (Şekil 4).



Şekil 4. p14<sup>ARF</sup> geninin, p53 tümör baskılayıcı gen yolağını aktivasyon mekanizması

INK4a/ARF loküsü, 9 nolu kromozomun kısa kolunda (9p21-22) lokalize olup, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p16<sup>INK4a</sup> ve p14<sup>ARF</sup> olmak üzere, yapısal olarak iki farklı gen ürününü kodlar. p16<sup>INK4a</sup> geni retinoblastomda, p14<sup>ARF</sup> geni p53 yolağında önemli ve aktif rol oynarlar. Bu nedenle, her iki genin hücre çoğalmasının kontrolünde etkin görevleri bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu genlerin inaktivasyonuna neden olabilecek herhangi bir durumda, hücre çoğalmasındaki kontrol ortadan kaybolarak kanser gelişimi başlayabilmektedir. p14<sup>ARF</sup> ve p16<sup>INK4a</sup> ekson 2 ve 3 için ortak kodlayıcı diziler içerirler, ancak promotor ve ekson 1

bölgeleri farklıdır. p14<sup>ARF</sup> geni, p53 geninin proteozom aracılı degradasyonu yoluyla genin inaktivasyonuna neden olan MDM2'nin ubiquitin ligaz aktivitesini inhibe ederek, p53 tümör baskılayıcı yolağı aktive eder ve hücre döngüsünü durdurur. Delesyon veya metilasyon nedeniyle p14<sup>ARF</sup> geninin inaktivasyonu sonucunda, MDM2 düzeylerinin artmasıyla p53 geni inaktive olur (26). Tüm bu mekanizmalardan da anlaşıldığı üzere, p53/MDM2/p14<sup>ARF</sup> yolağının, normal hücre döngüsünün kontrolünde kanser oluşumunda kritik bir öneme sahip olduğu belirgindir.

Nöroblastomda, p53 mutasyon oranı olguların %2'sinden azında gözlenmektedir. Relaps ile gelen olguların yapılan analizlerinde ise, sitotoksik tedavi sonrasında bu tedaviyle doğrudan ilişkili bir şekilde, p53 mutasyon oranlarının arttığını bildiren çalışmalar vardır (27). Diğer yandan, bazı nöroblastom hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, tedavi sonrasında, p14<sup>ARF</sup> gen delesyonu veya MDM2 amplifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalar ile p53 geninin fonksiyonel inaktivasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir (28).

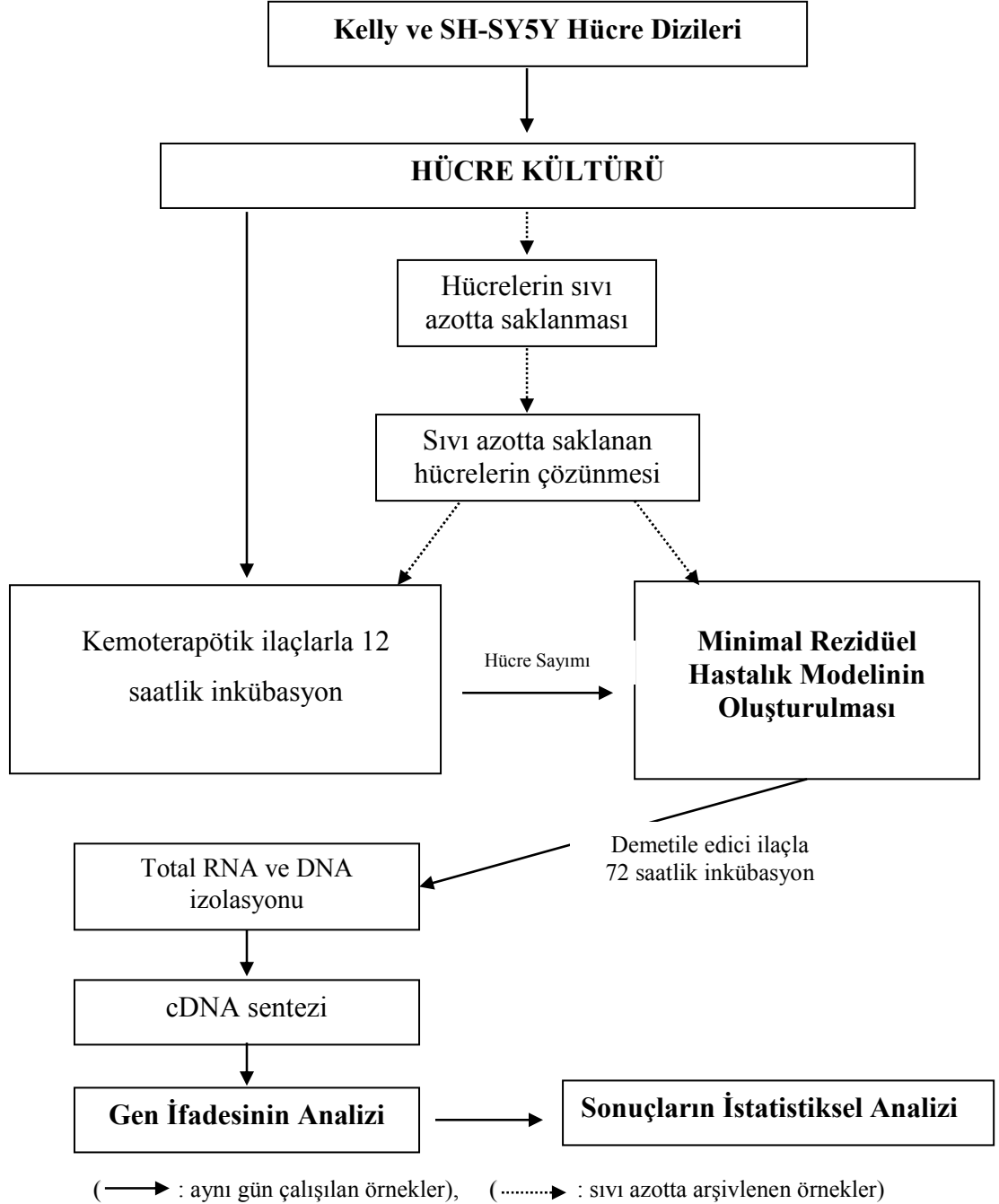
Nöroblastomda, minimal rezidüel hastalığın ortaya çıkmasındaki başlıca nedenlerden biri olan kemoterapi direncinin gelişiminde rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri *p*-glikoproteini kodlayan MDR-1 (multidrug resistance gene) geni, diğeri de p53/MDM2/p14<sup>ARF</sup> yolağındaki fonksiyon bozukluklarıdır (29).

Sonuç olarak; p14<sup>ARF</sup> geninin metilasyon ile inaktivasyonunun, hem nöroblastom oluşum sürecinde hem de tedavi verildikten sonra karşımıza çıkan minimal rezidüel hastalıkta olduğu gibi relaps gelişiminde çok önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (30). İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle kemoterapi sonrasında ortaya çıkan relaps olgularında, taksol, temozolamid ve arsenik trioksit gibi p53 yolağından bağımsız etki gösterebilecek tedavi yaklaşımlarının denenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (31).

Bütün bu bilgilerin ışığında, kanser oluşumunda ve progresyonunda rol oynayan epigenetik değişikliklerin önemi anlaşıldıkça yeni terapötik hedefler ortaya çıkmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

İnsan nöroblastom MYCN (+) hücre dizisi KELLY (ACC 355) ve MYCN (-) hücre dizisi SH-SY5Y (ACC 209), Almanya DSMZ hücre kültürü koleksiyonundan alındı. Araştırma için yapılan çalışmaların akış şeması Şekil 5'te verilmektedir.



Şekil 5. Çalışmada kullanılan yöntemlerin genel akış şeması.

### 3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ

#### 3.1.1 Hücrelerin Çoğaltılması

Sıvı azotta dondurulan hücrelerin çözündürülmesi için; sıvı azot arşivinden çıkarılan hücreler, hızla 37°C su banyosunda hafifçe sallayarak çözüldü. Hücre süspansiyonunda küçük buz kristalleri oluştuğu anda su banyosundan çıkarıldı. Şişenin dışı alkolle silindikten sonra hücreler 10 ml'lik steril dibi konik tüpe aktarıldı. İki dakika içinde hafifçe tüpü sallayarak damla damla soğuk (+4°C) RPMI-1640 (Gibco) ilave edildi. Hücre süspansiyonu 200 x g'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde döndürüldü. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler, uygun besi ortamları ile süspanse edildi.

KELLY hücreleri, %10 FBS (Sigma-Aldrich), %1 L-Glutamin (Sigma-Aldrich), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich) ilavesiyle hazırlanan RPMI ortamında 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskına ekildi, 37 C<sup>0</sup>'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. Her 3 günde bir ortam değiştirilerek yaklaşık %90 yoğunluğa gelmesi sağlandı. Daha sonra 1:3 oranında pasaj yapıldı (P2).

SH-SY5Y hücreleri ise, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin ilavesiyle hazırlanan DMEM (Gibco) ortamında 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskına ekildi, 37 C<sup>0</sup>'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. Her 4 günde bir ortam değiştirilerek yaklaşık %90 yoğunluğa gelmesi sağlandı. Yoğunluk sağlandıktan sonra 1:3 oranında pasaj yapıldı (P2).

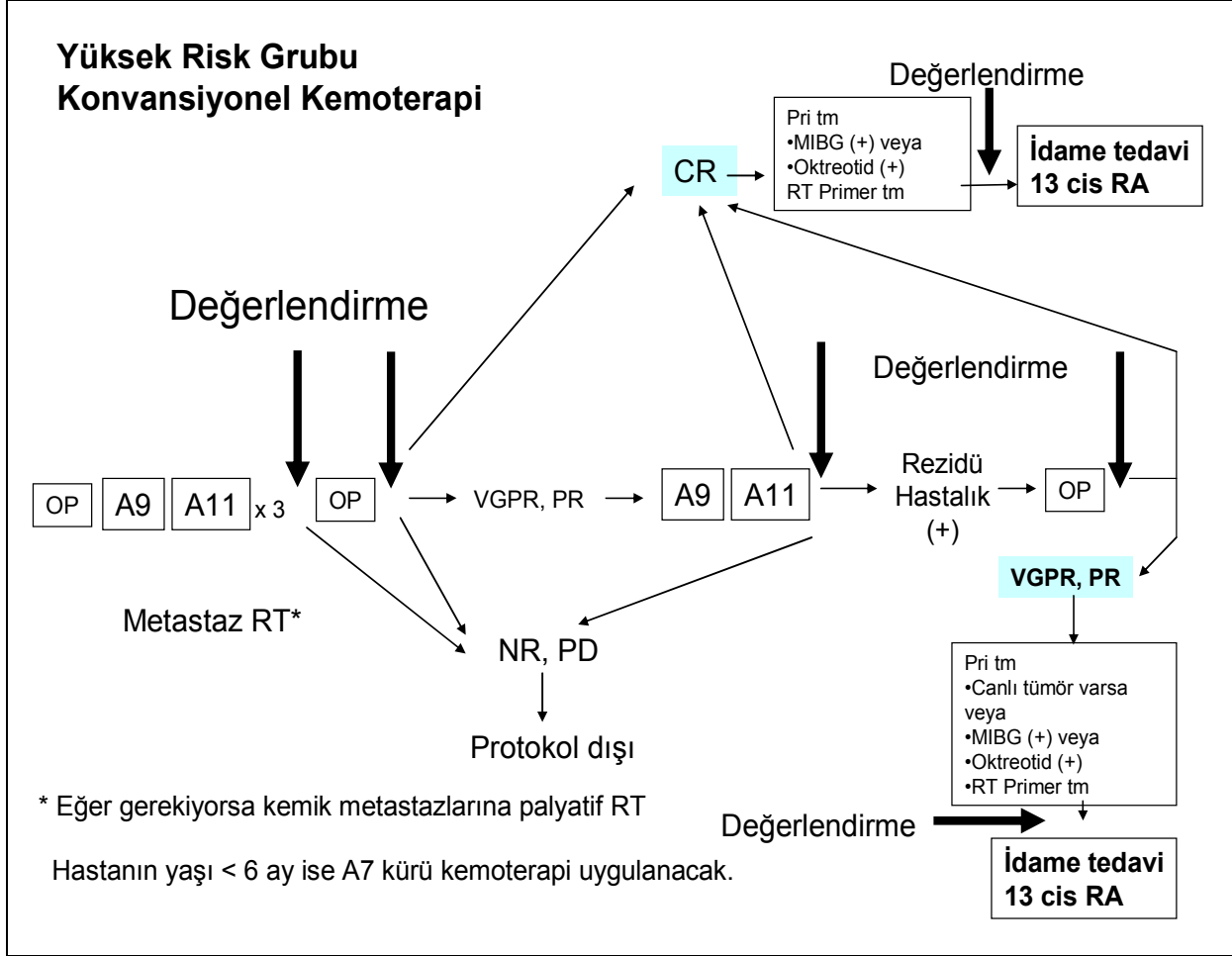
Hücre kültürü ortamlarının değiştirilmesi ve hücrelerin pasajlanması şeklindeki aşamalar, kemoterapötik ilaç eklenebilmesi için yeterli hücre sayısına ulaşmaya kadar tekrarlandı. İlaç eklendiğinde 1x10<sup>6</sup> canlı hücre kalabilmesi için öngörülen hücre sayılarının eldesi yaklaşık 2 aylık bir süreçte gerçekleşti.

#### 3.1.2 İn Vitro Minimal Rezidüel Hastalık Modelinin Oluşturulması

Nöroblastomda minimal rezidüel hastalık modelini oluşturabilmek için, başlangıçta flaska ekilen hücre sayısı, kemoterapötik ilaç eklenmesiyle %90 hücre ölümünden sonra 1x10<sup>6</sup> canlı hücre kalacak şekilde hesaplandı. Bunun için, 32 ayrı 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskına 1x10<sup>8</sup> hücre ekildi, 37 C<sup>0</sup>'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. Sonuç olarak; 16 tane MYCN (+) grup, 16 tane MYCN (-) grup oluşturuldu.

Toplam 32 hücre grubu için kemoterapötiklerin dozları, TPOG-NB-2009 nöroblastom tedavi protokolünde, 1 yaş ve üzerindeki yüksek risk grubu hastalar için düzenlenmiş olan A9

ve A11 bloklarındaki ilaç dozlarına göre, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına uygun olarak hesaplandı (Şekil 6).



Şekil 6. TPOG-NB-2009 Protokolü Yüksek Risk Grubu Tedavi Şeması

### A9 KÜRÜ

**Vinkristin** 1,5 mg/m<sup>2</sup>/doz/gün, İV puşe, 1. ve 5. günler

**DTIC (Dakarbazin)** 200 mg/m<sup>2</sup>/doz/gün, 30 dakikalık İV infuzyon, 1, 2, 3, 4 ve 5. günler

**Ifosfamid** 1500 mg/m<sup>2</sup>/doz/gün, 20 saatlik İV infuzyon, 1, 2, 3, 4 ve 5. günler

**+ %100 MESNA** 1500 mg/m<sup>2</sup>/doz/gün, 20 saatlik İV infuzyon, 1, 2, 3, 4 ve 5. günler

**Adriamisin (Doksorubisin)** 30 mg/m<sup>2</sup>/doz/gün, 4 saatlik İV infuzyon, 4 ve 5. günler

## **A11 KÜRÜ**

<b>Siklofosfamid</b>	300 mg/m <sup>2</sup> /doz/gün, 1 saatlik İV infüzyon, 1, 2, 3, 4 ve 5. günler
<b>MESNA</b>	3 x 60 mg/m <sup>2</sup> /doz, 10 dakikalık İV infüzyon, MESNA siklofosfamidin 0., 4. ve 8. saatlerinde, 1, 2, 3, 4 ve 5. günler
<b>Etoposid</b>	80 mg/m <sup>2</sup> /doz/gün, 5 saatlik İV infüzyon, 1, 2, 3, ve 4. günler
<b>Sisplatin</b>	30 mg/m <sup>2</sup> /doz/gün, 18 saatlik İV infüzyon, 1, 2, 3, 4 ve 5. günler

Yaklaşık %90 hücre yoğunluğuna ulaşmış flasklara, %90 hücre ölümünü sağlayacak dozlarda Vinkristin (1 mg/mL, Orna: 0,01125 mg), Dakarbazin (10 mg/mL, Aventis: 1,5 mg), İfosfamid (40 mg/mL, Eczacıbaşı: 11,25 mg), Doksorubisin (2 mg/mL, Farmar: 0,225 mg), Siklofosfamid (100 mg/mL, Eczacıbaşı: 2,25 mg), Etoposid (20 mg/mL, Atafarm: 0,6 mg) ve Sisplatin (0,5 mg/mL, Koçak Farma: 0,225 mg) eklendi ve 12 saatlik inkübasyon için 37 C<sup>0</sup> de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. 12 saat sonra, tripan mavisi hücre canlılık testi ile toma lamında sayım yapıldı. Kemoterapötik ilaçlarla inkübasyon sonrası canlı kalabilen %10 oranındaki hücreler yaşatılıp çoğalabilmeleri için 37 C<sup>0</sup> de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. Minimal rezidüel hastalık modelini temsil eden hücre grubu %90 yoğunluğa ulaştığında, kontrol grupları dışındaki tüm flasklara 5'-aza-CdR (5µmol/L; Sigma, St. Louis, MO: 0,18 mg) eklendi. 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler flasklardan kaldırıldı ve total RNA izolasyonları yapıldı.

### **3.1.3 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Testi**

Hücre süspansiyonunda bulunan hücrelerin % 0,4'lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi (32). Test, canlı hücrelerin boyayı membranlarından içeri geçirmeme prensibine dayanmaktadır. Kısaca, bire bir oranında hücre süspansiyonu örneği ile tripan mavisi lam üzerinde hafifçe karıştırıldı. Yaklaşık 2-3 dakika bekletildikten sonra ışık mikroskopunda canlı ve ölü hücrelerin tümü sayıldı. Tripan mavisi ile boyanmayan hücrelerin yüzdesi hesaplandı. Canlılık testi % 10'un üzerinde çıkan hücre süspansiyonları seçildi.

#### ***Tripan-Blue Solüsyonu:***

- 0,04 g Trypan-blue stain 10 ml distile suda çözüldü.
- 3 ml Trypan blue solüsyonuna 19 ml PBS ilave edildi.
- 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

## 3.2 MYCN ve p14<sup>ARF</sup> GEN İFADELERİNİN ANALİZİ

### 3.2.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA ekstraksiyonu, MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarından “High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Cat # 11 828 665 001) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Trypsin/EDTA ile kaldırılan hücreler 400 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler 200 µl fosfat tampon solusyonunda (PBS) resüspanse edildi. 400 µl lizis/ bağlayıcı (lysis/binding buffer) tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Örnekler filtreli tüpe aktarıldı ve 8000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen alt kısım atıldı ve her bir örnek için 90 µl Dnase inkübasyon tamponu (Dnase incubation buffer) ve 10µl Dnase I eklendi. 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 500 µl yıkama tamponu I (wash buffer I) eklendi 8000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen alt kısım atıldı. 500 µl yıkama tamponu II (wash buffer II) eklendi 8000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen alt kısım atıldı .Tekrar 200 µl yıkama tamponu II (wash buffer II) eklendi, 13000 x g’de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve filtreler 1,5 ml’lik ependorflara aktarıldı, 100 µl elüsyon tamponu (elution buffer) eklenip 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Ependorfa geçen kısımda RNA elde edilmiş oldu. Filtreli tüpler atıldı ve total RNA örneğinin bulunduğu tüplerdeki RNA kalitesi spektrofotometrik yöntem (PG Instrument T 80 + UV/VIS) ile değerlendirildi ve daha sonra kullanılmak üzere -80°C’de saklandı.

### 3.2.2 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları, MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarından “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Cat # 11 796 828 001) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Trypsin/EDTA ile kaldırılan hücreler 400 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler 200 µl fosfat tampon solusyonunda (PBS) resüspanse edildi. Her bir örneğe 200 µl bağlayıcı tampon (binding buffer) ve 40 µl proteinaz K eklendi. 70 C<sup>0</sup>’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 100 µl izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Filtreler toplama tüplerine geçirildi ve örnekler filtrelere aktarıldı. 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi. 500 µl inhibitör ayırım tamponu (inhibitor removal buffer) eklendi. 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi. 500 µl



yıkama tamponu (wash buffer) eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi. Yeniden 500 µl yıkama tamponu (wash buffer) eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü içindeki sıvı atıldı, 13000 x g'de 10 saniye santrifüj edildi. Filtreler ependorfa aktarıldı. Her bir örneğe 200 µl elüsyon tamponu (elution buffer) eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ependorfa geçen kısımda DNA elde edilmiş oldu. DNA kalitesi spektrofotometrik yöntem (PG Instrument T 80 + UV/VIS) ile değerlendirildi.

### 3.2.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lardan 12'şer µl total RNA örneği kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi, "SABiosciences's RT<sup>2</sup> First Strand Kit" (Cat # C-03) ile gerçekleştirildi. 8 µl'sinde 20 ng RNA olan örneklere genomik DNA eliminasyonu yapmak için 2 µl 5X gDNA eliminasyon tamponu eklendi, iyice karıştırıldı, Thermal Cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)'da 42 C<sup>0</sup>'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında buz üzerine alındı. Her bir örnek için aşağıda gösterilmiş miktarlarda RT kokteyl hazırlandı:

RT kokteyl	Miktar
5X RT tampon 3	4 µl
Primer ve eksternal kontrol miks	1 µl
RT enzim miks 3	2 µl
Rnaz içermeyen H <sub>2</sub> O	3 µl
<b><i>Toplam hacim</i></b>	<b><i>10 µl</i></b>

Hazırlanmış RT kokteyl, genomik DNA eliminasyonu yapılmış ve buz üstüne alınmış örneklere eklendi, iyice karıştırıldı. Termal Cycler'da 42 C<sup>0</sup>'de 15, 95 C<sup>0</sup>'de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnekler -20 C<sup>0</sup>'ye kaldırıldı.

### 3.2.4 Real time-PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri

RT-PCR gen ekspresyon analizleri SABiosciences's RT<sup>2</sup> qPCR Master Miksleri ile gerçekleştirildi. MYC-N (NM-005378), P14<sup>ARF</sup> (CDKN2A) (NM-000077) genleri için uygun primerler kullanıldı. "House keeping" gen olarak ise GADPH (NM-002046) seçilmiştir.

Her üç gen için PCR miksleri ayrı ayrı şu oranlarda hazırlandı:

RT <sup>2</sup> qPCR master miks	12,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	10,5 µl
Dilue edilmiş cDNA	1,0 µl
RT <sup>2</sup> qPCR primerler	1,0 µl
<b><i>Toplam hacim</i></b>	<b><i>25 µl</i></b>

PCR miksi 96 kuyucuklu örnek küvetine yüklendi ve Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480 cihazında şu protokolda reaksiyon gerçekleştirildi:

	<b>Siklus</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
<b>Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480</b>	1	10 dakika	95 C <sup>0</sup>
	45	15 saniye	97 C <sup>0</sup>
		1 dakika*	72 C <sup>0</sup>

\* Her 45 siklusun sonundaki uzama evresinde SYBR Green floresanı ölçüldü.

Erime eğrisi analizi yapıldı:

	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>65 C<sup>0</sup> den 95 C<sup>0</sup>'ye sıcaklık artışı/dakika</b>
<b>Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480</b>	1 dakika	95 C <sup>0</sup>	2 C <sup>0</sup> / dakika
	2 dakika	65 C <sup>0</sup>	

**Veri analizleri şu şekilde yapıldı:** Herbir gen Cp (Crossing point) değerlerinin ortalaması alınarak GADPH referans geni ortalama Cp değerine göre farkı hesaplandı. Daha sonra herbir genin kontrol GADPH genine göre R (ratio) ekspresyon katları hesaplandı.

### 3.2.5 DNA Metilasyon qPCR Analizleri

p14<sup>ARF</sup> geninin metilasyon durumu "Methyl-Profiler DNA Methylation qPCR Assays" (SABiosciences's DNA methylation enzyme kit, Cat # MeA-03; RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Master Mix, Cat # PA-010) ile incelendi.

Testte demetile ya da metile DNA'yı kesmek için DNA metilasyonuna duyarlı ve bağımlı enzimler kullanıldı. DNA kesiminden sonra p14<sup>ARF</sup> geninin primerleri (NM-058195) kullanılarak qPCR analizleri Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480 cihazında gerçekleştirildi.

Hipermetile, orta dereceli metile ve demetile DNA relatif konsantrasyonları “mock digest (sahte kesim)” yapılmış DNA miktarları ile karşılaştırılarak hesaplandı.

DNA kesimi için herbir örnek başına dört ayrı tüp şu şekilde hazırlandı:

- a) **Mock Digest ( $M_0$ ):** RT-PCR deneyi için gerekli olan tüm genomik DNA’yı içeren tüp.
- b) **Metilasyon duyarlı kesim ( $M_s$ ):** Demetile ya da kısmen metile DNA’nın metilasyona duyarlı enzim ile kesilip, hipermetile DNA’nın RT-PCR deneyi için bulunduğu tüp.
- c) **Metilasyon bağımlı kesim ( $M_d$ ):** Metile DNA’nın metilasyona bağımlı enzim ile kesilip, demetile DNA’nın RT-PCR deneyi için bulunduğu tüp.
- d) **Çift kesim ( $M_{sd}$ ):** Metilasyona duyarlı ve metilasyona bağımlı enzimlerin bulunduğu enzimatik kesim başarısının ölçüldüğü tüp.

Herbir örnek için kokteyl şu şekilde hazırlandı:

Bileşenler	Miktar
Çift distile su	89 $\mu$ l
5X kesim tamponu ( 5X RM buffer)	26 $\mu$ l
0,5 $\mu$ g örnek DNA	5 $\mu$ l
<b><i>Toplam hacim</i></b>	<b><i>120 <math>\mu</math>l</i></b>

Hazırlanan kokteyl vortekslendi ve şu şekilde dört ayrı tüpe bölündü:

Bileşenler	Farklı işlemlenmiş PCR tüpleri			
	$M_0$	$M_s$	$M_d$	$M_{sd}$
Çift distile su	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	- $\mu$ l
Kesim kokteyli	28 $\mu$ l	28 $\mu$ l	28 $\mu$ l	28 $\mu$ l
Enzim A (Metilasyona duyarlı enzim)	- $\mu$ l	1 $\mu$ l	- $\mu$ l	1 $\mu$ l
Enzim B (Metilasyona bağımlı enzim)	- $\mu$ l	- $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b><i>Toplam</i></b>	<b><i>30 <math>\mu</math>l</i></b>	<b><i>30 <math>\mu</math>l</i></b>	<b><i>30 <math>\mu</math>l</i></b>	<b><i>30 <math>\mu</math>l</i></b>

Tüpler vortekslendi ve iyice karıştırıldı. Termal Cycler'da 37 C<sup>0</sup>'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında enzimlerin inaktive olması için, 65 C<sup>0</sup>'de 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnekler qPCR analizleri için -20 C<sup>0</sup>'ye kaldırıldı.

Herbir örnek için şu şekilde PCR reaksiyon kokteylleri hazırlandı:

<b>PCR reaksiyon kokteylleri</b>				
	<b>M<sub>0</sub></b>	<b>M<sub>s</sub></b>	<b>M<sub>d</sub></b>	<b>M<sub>sd</sub></b>
<b>Çift distile su</b>	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl
<b>PCR master miks</b>	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
<b>PCR primer miks</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>M<sub>0</sub> kesim</b>	2 µl			
<b>M<sub>s</sub> kesim</b>		2 µl		
<b>M<sub>d</sub> kesim</b>			2 µl	
<b>M<sub>sd</sub> kesim</b>				2 µl
<b><i>Toplam</i></b>	<b><i>25 µl</i></b>	<b><i>25 µl</i></b>	<b><i>25 µl</i></b>	<b><i>25 µl</i></b>

PCR miksi, 96 kuyucuklu örnek küvetine yüklendi ve Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480 cihazında şu protokolda reaksiyon gerçekleştirildi:

	<b>Siklus</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
<b>Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480</b>	1	10 dakika	95 C <sup>0</sup>
	40	15 saniye	97 C <sup>0</sup>
		1 dakika*	72 C <sup>0</sup>

\* Her 40 siklüsün sonundaki uzama evresinde SYBR Green floresanı ölçüldü.

**Veri analizleri şu şekilde yapıldı:**

[www.sabiosciences.com/dna\\_methylation\\_data\\_analysis.php](http://www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php) adresinden tek gen metilasyon analizi için uygun program seçildi, veri girişi yapılarak analiz gerçekleştirildi.

### 3.3 PROTEİN DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

#### 3.3.1 Nüklear Ekstraksiyon

Nüklear ekstraksiyon “Aktive Motif Nuclear Extract Kit” (Active Motif, Cat # 40010) ile gerçekleştirildi. Hücre kazıma aleti ile kaldırılan hücreler 400 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz atıldı, hücreler 500 µl 1X Hipotonik tampon ile resüspanse edildi. 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Her bir örneğe 25 µl deterjan eklendi, 10 saniye vortekslendi, 14000 x g’de +4 C<sup>0</sup>’de 30 saniye santrifüj edildi. Üstte kalan kısım, yani sitoplazmik fraksiyon atıldı. 50 µl lizis tampon ile nüklear pellet resüspanse edildi, 10 dakika vortekslendi. Salımlı çalkalayıcıda 150 rpm’de buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 30 saniye vortekslendi. 14000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatandaki nüklear ekstrakt yeni bir ependorfa alındı ve -80 C<sup>0</sup>’ye kaldırıldı.

#### 3.3.2 ELİSA Deneyi

Elisa testi “Active Motif p53 Transcription Factor Assay Kits” (Active Motif TransAM p53, Cat # 41196), standart eğri çizimi için gerekli olan rekombinant p53 proteini 5000 ünite (Active Motif TransAM, Cat # 31103) olarak kullanıldı. Herbir kuyucuğa 40 µl bağlayıcı tampon eklendi. Örnek kuyucuklarına örnekler, 10 µl’de 10 µg nüklear ekstrakt olacak şekilde eklendi. Pozitif kontrol kuyucuklarına, lizis tampon ile dilüe edilmiş MCF-7 nüklear ekstraktlarından 10 µl eklendi. Negatif kontrol kuyucuklarına, 10 µl lizis tampon eklendi ve lizis tampon kullanılarak dilüe edilmiş standart proteinlerden 10’ar µl eklendi. Salımlı çalkalayıcıda 100 rpm’de oda ısısında, 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kere 200 µl 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Herbir kuyucuğa 1X antikor bağlayıcı tampon ile 1:1000 oranında dilüe edilmiş p53 antikorunu 100 µl eklendi. 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kere 200 µl 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Herbir kuyucuğa 1X antikor bağlayıcı tampon ile 1:1000 oranında dilüe edilmiş HRP antikorundan 100 µl eklendi. 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 4 kere 200 µl 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Herbir kuyucuğa önceden oda ısısına getirilmiş olan reaksiyon solüsyonundan 100 µl eklendi. Direkt ışıktan korunarak oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 100 µl durdurma solüsyonu eklendi. Spektroforometrik olarak 450/655 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.

### 3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS software versiyon 15.0 kullanılarak gerçekleştirildi.

MYCN (+) ve MYCN (-) hücre grupları arasında, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı.  $P < 0.05$  değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MYCN (+) ve MYCN (-) hücre grupları arasında, p14<sup>ARF</sup> gen metilasyon düzeyleri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı.  $P < 0.05$  değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

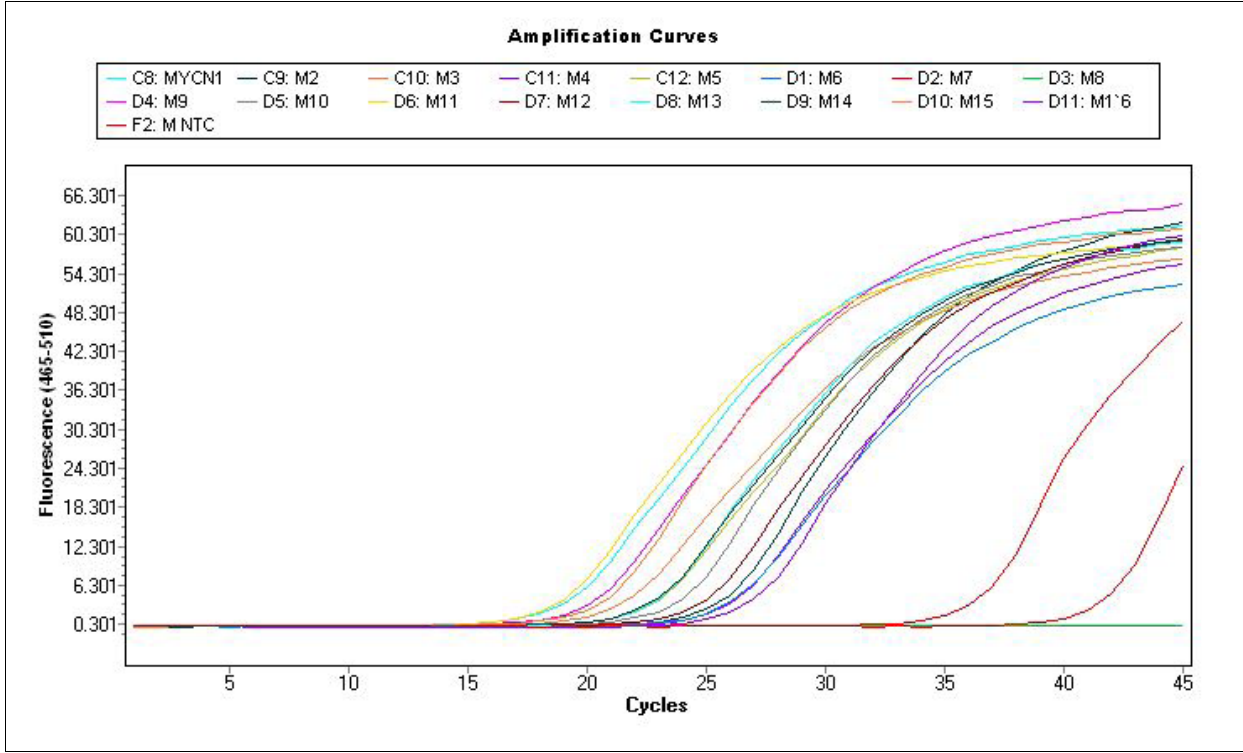
MYCN (+) ve MYCN (-) hücre grupları arasında, 5-aza-CdR'nin MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerine etkisi T testi kullanılarak karşılaştırıldı.  $P < 0.05$  değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

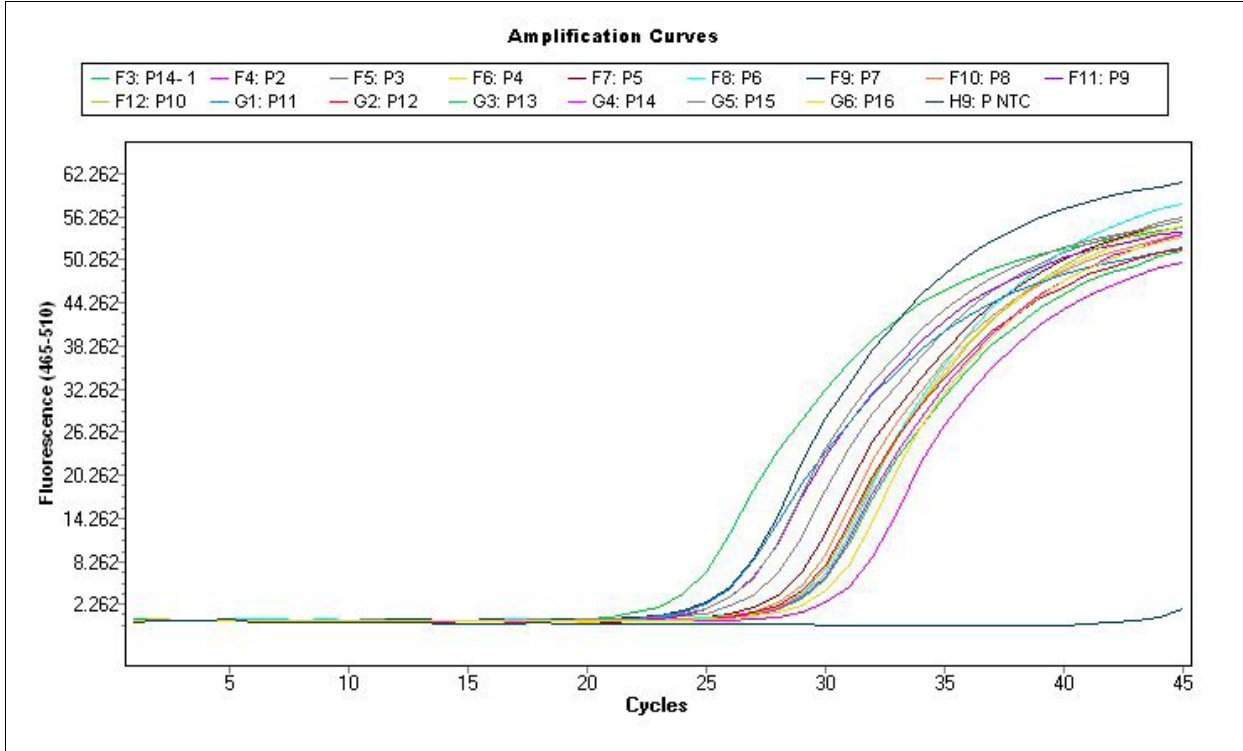
Çalışmamızda, MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen (*CDKN2A*) ekspresyon düzeyleri ve p14<sup>ARF</sup> metilasyon yüzdeleri ölçülmüştür (Tablo 5 ve 6). Ayrıca, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen protein miktarlarının değerlendirilmesi için, p53 protein düzeyleri ölçülmüştür (Tablo 7 ve 8).

**Tablo 5.** MYCN (+) hücre gruplarında gen ekspresyon ve p14<sup>ARF</sup> metilasyon oranları

KELLY	MYCN gen ekspresyon düzeyi	p14 <sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyi	p14 <sup>ARF</sup> Metilasyon Oranları (%)		
			Hipermetile	Demetile	İntermedier Metile
Kontrol	0,810	1,060	72,08	27,92	0
5-aza-CdR	0,847	1,053	0,07	99,93	0
Vinkristin	0,807	1,070	0,14	99,86	0
Vinkr.+5-aza	0,907	1,063	0,02	99,98	0
Dakarbazin	0,827	1,090	0,15	99,85	0
Dakar.+5-aza	0,850	1,027	0,07	99,93	0
İfosfamid	1,00	1,093	0,08	8,6	91,31
İfosfa.+5-aza	0,923	1,017	0,2	99,8	0
Doksorubisin	0,753	1,007	0,22	30,63	69,14
Dokso.+5-aza	0,817	1,030	0,05	99,95	0
Siklofosfamid	0,740	1,030	0,09	33,25	66,66
Siklof.+5-aza	0,853	1,033	0,14	99,86	0
Etoposid	0,847	1,143	0,1	3,54	96,36
Etopo.+5-aza	0,787	1,063	0,05	54,37	45,58
Sisplatin	0,833	1,097	0,08	99,92	0
Sisp.+5-aza	0,903	1,063	0,05	99,95	0



Şekil 7. MYCN (+) hücre gruplarında MYCN geni PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 8. MYCN (+) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geni PCR amplifikasyon eğrileri

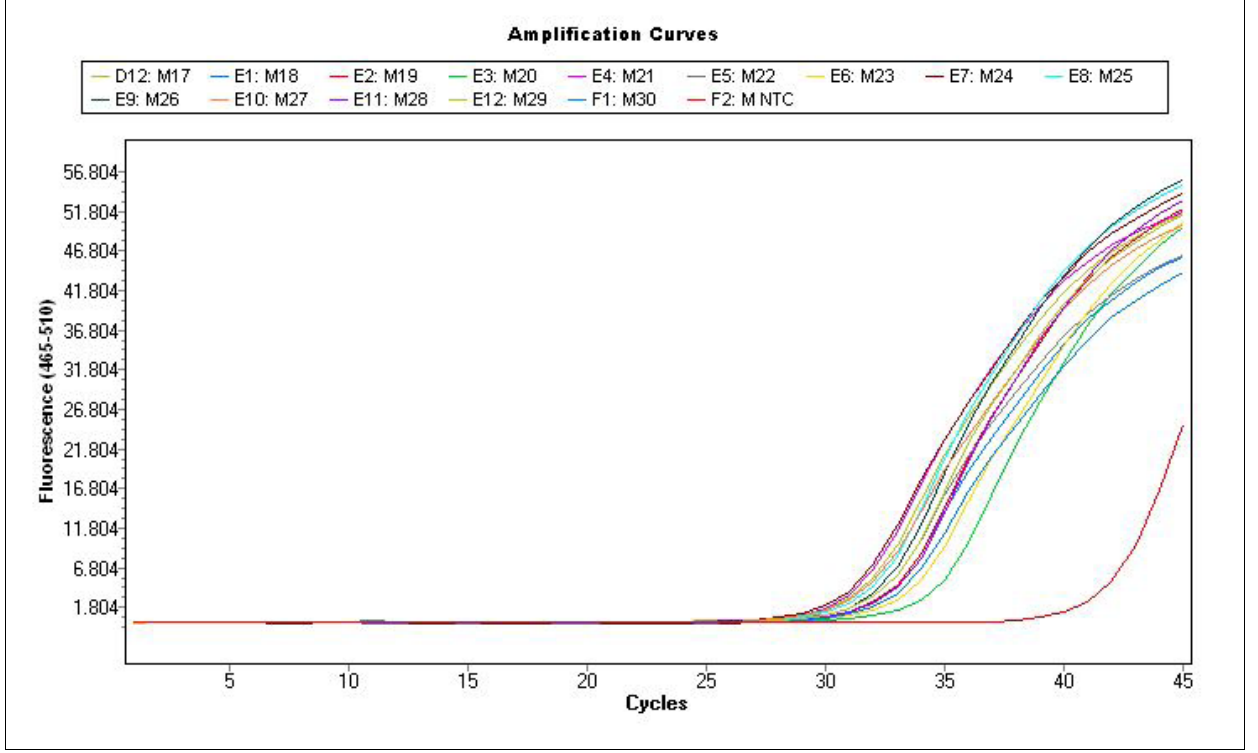


**Tablo 6.** MYCN (-) hücre gruplarında gen ekspresyon ve p14<sup>ARF</sup> metilasyon oranları

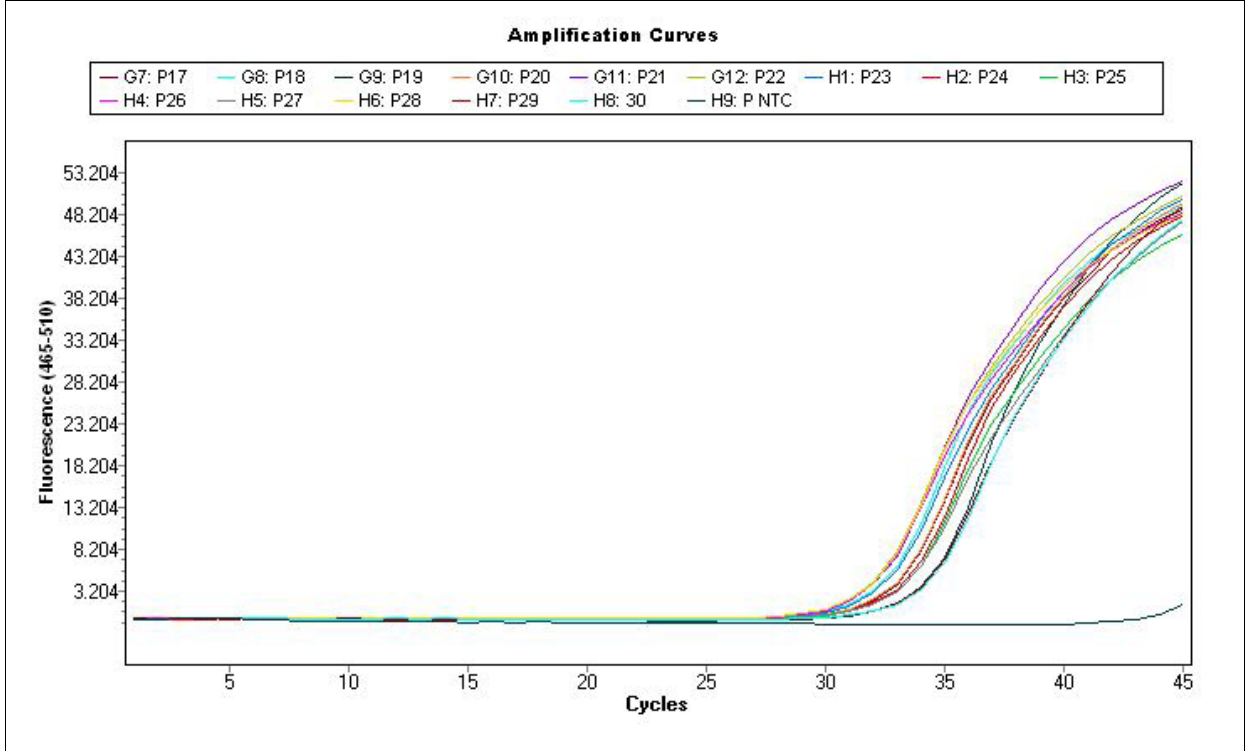
SH-SY5Y	MYCN gen ekspresyon düzeyi	p14 <sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyi	p14 <sup>ARF</sup> Metilasyon Oranları (%)		
			Hipermetile	Demetile	İntermedier Metile
<b>Kontrol</b>	1,073	1,190	2,05	62,38	35,57
<b>5-aza-CdR</b>	1,113	1,170	0,42	99,58	0
<b>Vinkristin</b>	1,163	1,227	1,78	98,22	0
<b>Vinkr.+5-aza</b>	1,130	1,153	0,46	99,54	0
<b>Dakarbazin</b>	1,137	1,210	0,49	99,51	0
<b>Dakar.+5-aza</b>	1,083	1,093	0,87	99,13	0
<b>İfosfamid</b>	1,130	1,177	0,7	99,3	0
<b>İfosfa.+5-aza</b>	1,077	1,173	0,6	99,4	0
<b>Doksorubisin</b>	1,033	1,100	0,15	99,85	0
<b>Dokso.+5-aza</b>	1,100	1,133	0,27	99,73	0
<b>Siklofosfamid</b>	1,037	1,140	1,26	98,74	0
<b>Siklof.+5-aza</b>	1,107	1,123	0,44	99,56	0
<b>Etoposid</b>	1,040	1,193	0,07	48,67	51,26
<b>Etopo.+5-aza</b>	1,097	1,187	1,15	98,85	0
<b>Sisplatin</b>	1,050	1,127	0,18	99,82	0
<b>Sisp.+5-aza</b>	1,037	1,070	0,33	99,67	0

MYCN (+) hücre gruplarında, MYCN gen ekspresyonlarının 15. siklustan itibaren başladığı, p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyonlarının ise 20. siklustan itibaren başladığı gözlenmiştir. Burada, ilgili genin ekspresyon düzeyi ne kadar yüksek ise o kadar erken siklusa girmektedir (Şekil 7 ve 8).

MYCN (-) hücre gruplarında, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> genlerinin ekspresyonları, 30. siklusa kadar gözlenmemiştir. Bu çalışmada, 30. siklustan sonra gözlenen ekspresyon değerleri dikkate alınmamıştır (Şekil 9 ve 10).



Şekil 9. MYCN (-) hücre gruplarında MYCN geni PCR amplifikasyon eğrileri



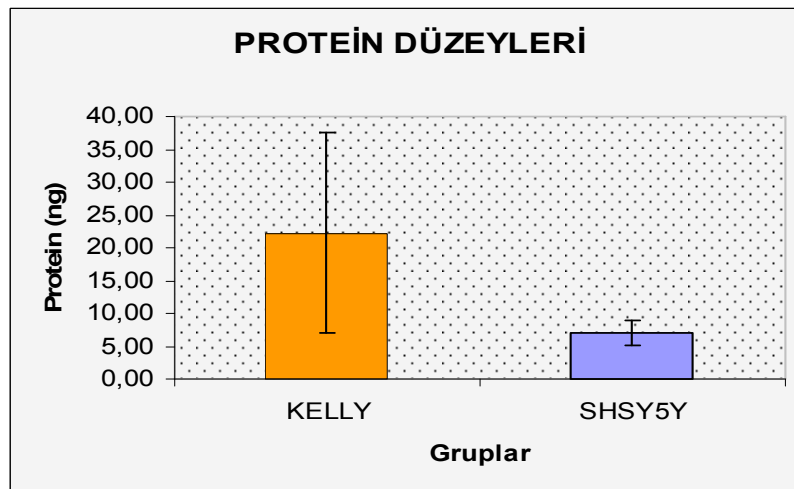
Şekil 10. MYCN (-) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geni PCR amplifikasyon eğrileri

**Tablo 7.** MYCN (+) hücre gruplarında p53 protein düzeyleri

<b>KELLY</b>	<b>PROTEİN (ng)</b>		<b>PROTEİN (ng)</b>
Kontrol	2,612	Doksorubisin	2,555
5-aza-CdR	0,532	Dokso.+5-aza	1,016
Vinkristin	1,502	Siklofosfamid	2,138
Vinkr.+5-aza	0,450	Siklof.+5-aza	0,426
Dakarbazin	0,788	Etoposid	1,389
Dakar.+5-aza	0,728	Etopo.+5-aza	0,450
İfosfamid	1,512	Sisplatin	0,768
İfosfa.+5-aza	0,511	Sisp.+5-aza	0,453

**Tablo 8.** MYCN (-) hücre gruplarında p53 protein düzeyleri

<b>SH-SY5Y</b>	<b>PROTEİN (ng)</b>		<b>PROTEİN (ng)</b>
Kontrol	0,383	Doksorubisin	0,387
5-aza-CdR	0,360	Dokso.+5-aza	0,301
Vinkristin	0,254	Siklofosfamid	0,362
Vinkr.+5-aza	0,324	Siklof.+5-aza	0,298
Dakarbazin	0,322	Etoposid	0,458
Dakar.+5-aza	0,232	Etopo.+5-aza	0,368
İfosfamid	0,251	Sisplatin	0,486
İfosfa.+5-aza	0,299	Sisp.+5-aza	0,556



**Şekil 11.** MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında protein düzeylerinin karşılaştırılması

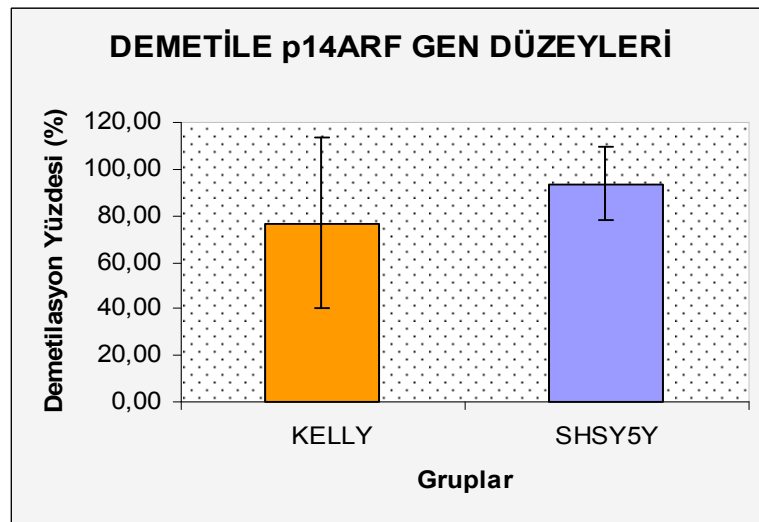
MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> genlerinin etki yolağındaki ölçülebilen tek protein p53 genine ait olduğu için p53 protein düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçta, MYCN ve ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleriyle uyumlu protein düzeyleri (ng) elde edilmiştir.

MYCN (+) hücre gruplarının protein düzeyleri, MYCN (-) hücre gruplarının protein düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0.001) (Şekil 11).

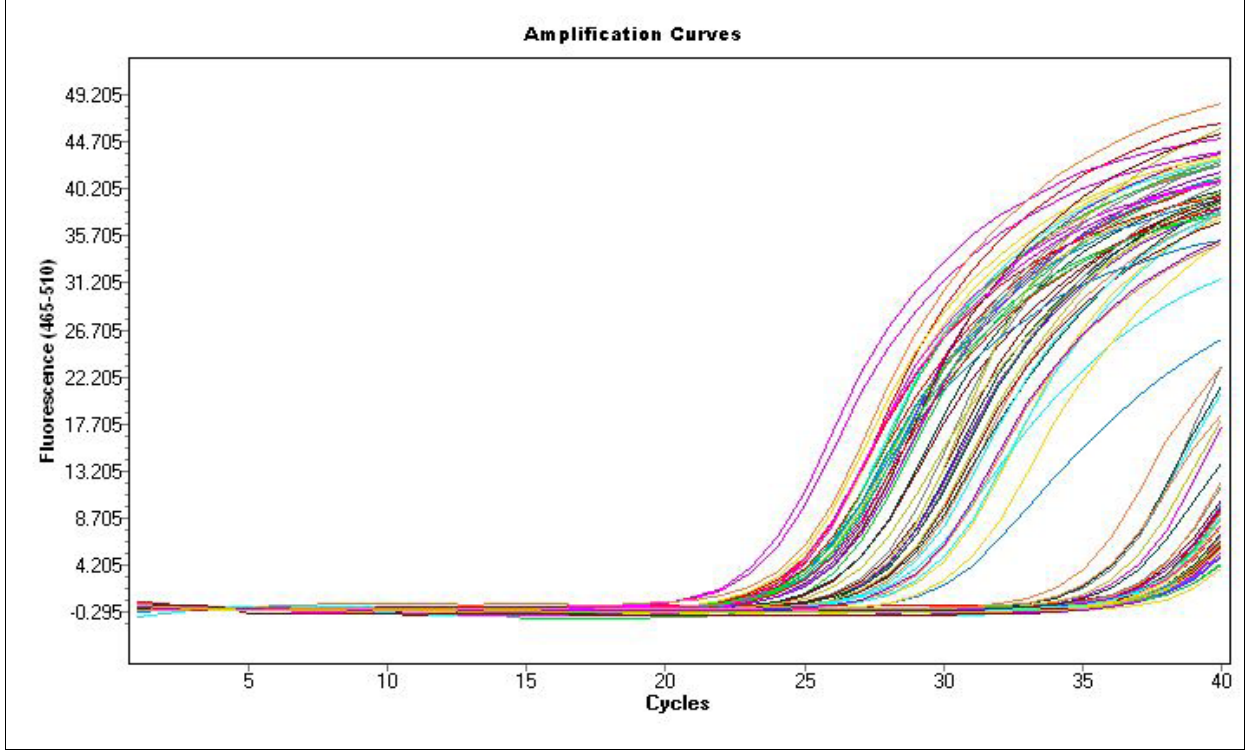
MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında, p14<sup>ARF</sup> geni promotor bölgesinin demetile edici ajan ile gerçekleştirilen demetilasyon yüzdeleri, MYCN (-) hücre grubunda anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0.034) (Şekil 12).

MYCN (+) kontrol hücre grubunda, p14<sup>ARF</sup> geni promotor bölgesinin %72,08 hipermetile, %27,92 demetile olduğu; 5-aza-CdR eklenmesiyle demetilasyon oranının %99,93'e yükseldiği bulunmuştur.

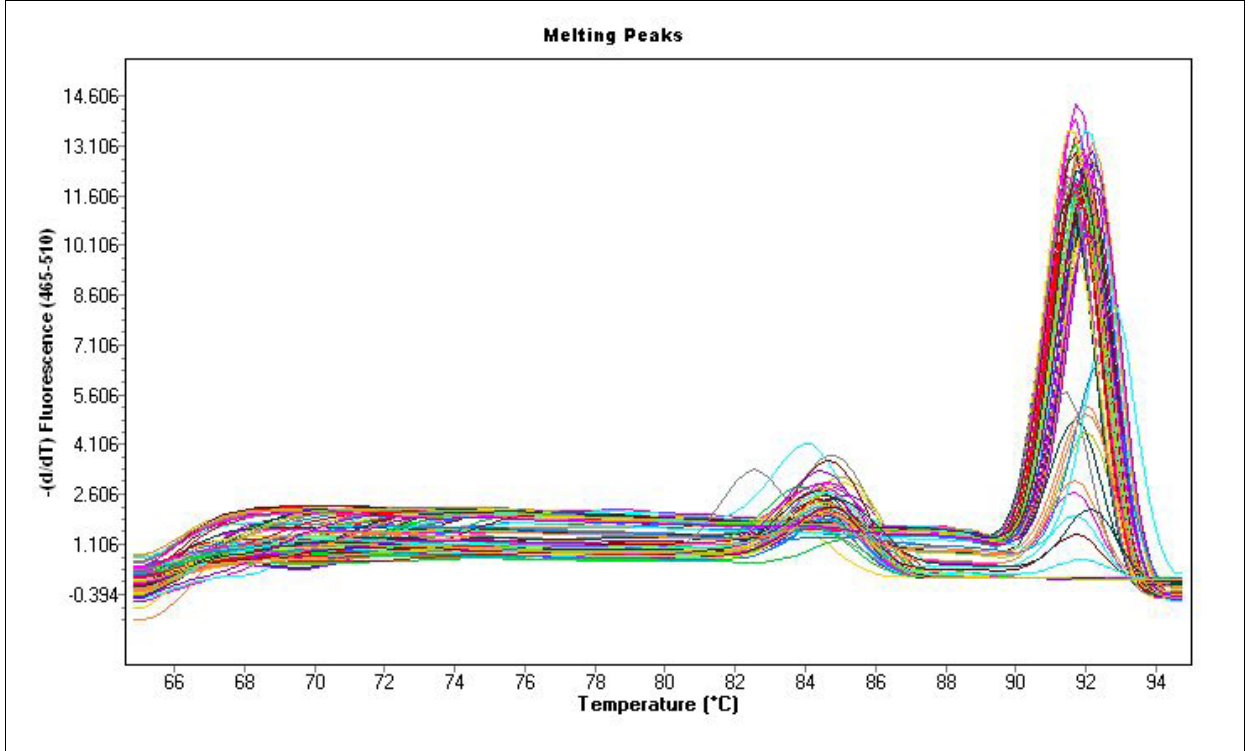
MYCN (-) kontrol hücre grubunda, p14<sup>ARF</sup> geni promotor bölgesinin %2,05 hipermetile, %62,38 demetile olduğu, 5-aza-CdR eklenmesiyle demetilasyon oranının %99,58'e yükseldiği bulunmuştur.



Şekil 12. MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geni promotor bölgesinin demetilasyon yüzdelerinin karşılaştırılması

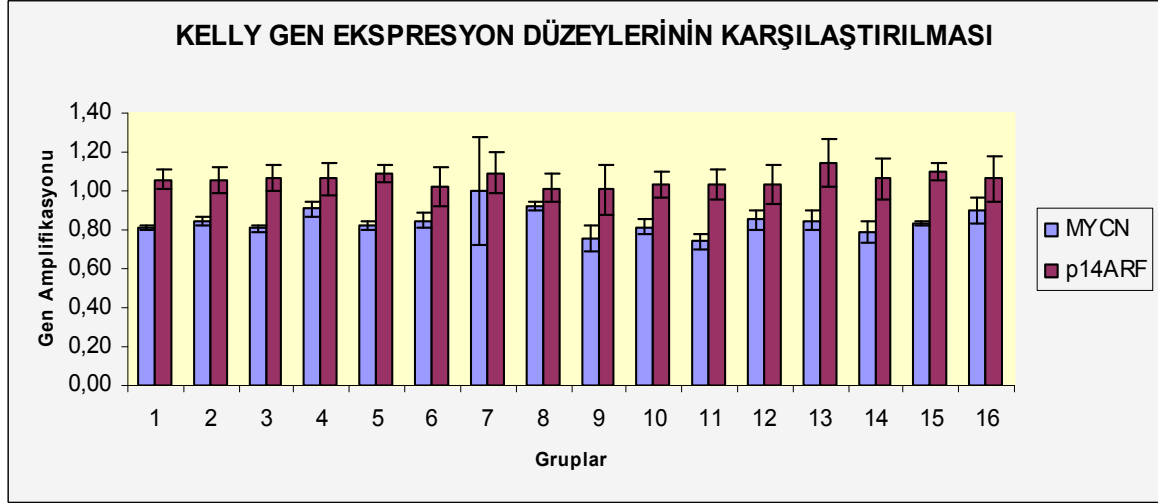


Şekil 13. p14<sup>ARF</sup> promotor bölgesi metilasyon spesifik PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 14. p14<sup>ARF</sup> promotor bölgesi metilasyon spesifik PCR sıcaklık eğrileri

MYCN (+) hücre gruplarındaki MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, RT-PCR sonuçları aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. MYCN (+) hücre gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

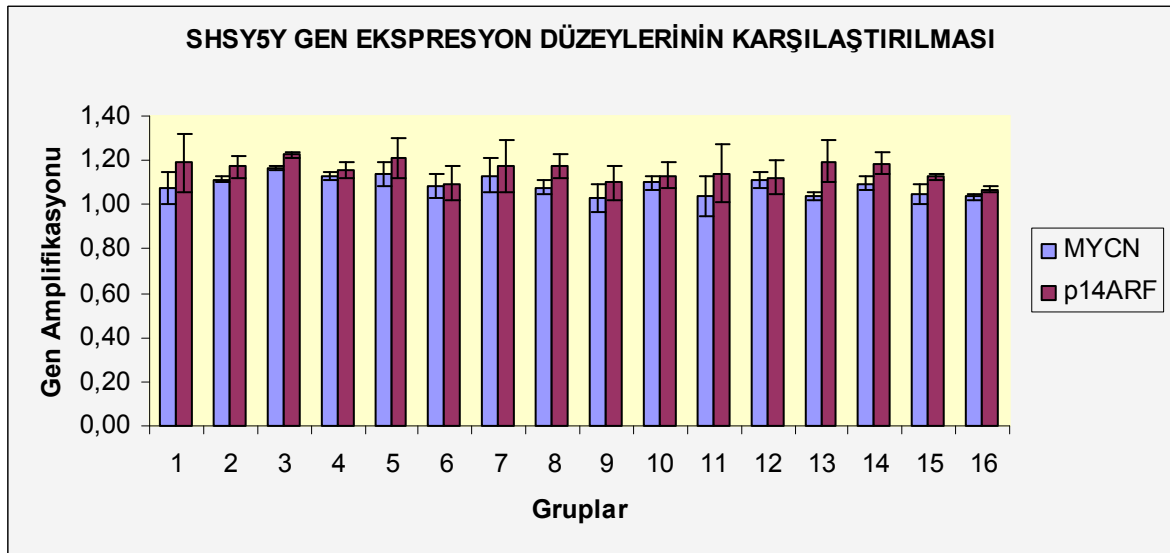
#### **MYCN gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması:**

- KELLY kontrol grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y kontrol grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,003).
- KELLY 5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y 5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Vinkristin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Vinkristin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,003).
- KELLY Vinkristin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Vinkristin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,003).

- KELLY Dakarbazin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Dakarbazin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Dakarbazin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Dakarbazin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY İfosfamid grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y İfosfamid grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,325).
- KELLY İfosfamid+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y İfosfamid+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Doksorubisin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Doksorubisin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Doksorubisin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Doksorubisin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Siklofosfamid grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Siklofosfamid grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Siklofosfamid+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Siklofosfamid+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,003).

- KELLY Etoposid grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Etoposid grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,003).
- KELLY Etoposid+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Etoposid+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Sisplatin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Sisplatin grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,003).
- KELLY Sisplatin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Sisplatin+5-aza-CdR grubunun MYCN gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).

MYCN (-) hücre gruplarındaki MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, RT-PCR sonuçları aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 16).



**Şekil 16.** MYCN (-) hücre gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

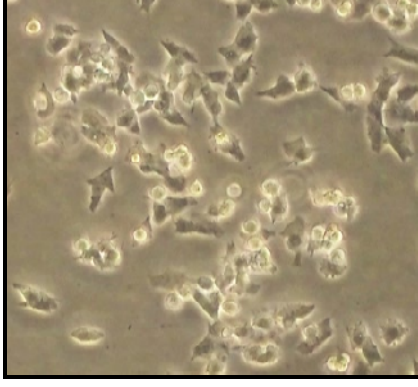


### **p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması:**

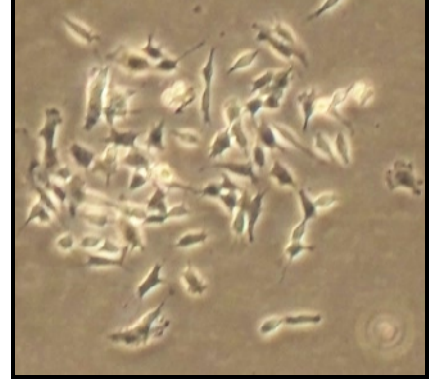
- KELLY kontrol grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y kontrol grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,106).
- KELLY 5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y 5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,009).
- KELLY Vinkristin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Vinkristin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).
- KELLY Vinkristin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Vinkristin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,023).
- KELLY Dakarbazin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Dakarbazin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,023).
- KELLY Dakarbazin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Dakarbazin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,332).
- KELLY İfosfamid grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y İfosfamid grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,106).
- KELLY İfosfamid+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y İfosfamid+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).

- KELLY Doksorubisin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Doksorubisin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,106).
- KELLY Doksorubisin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Doksorubisin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,023).
- KELLY Siklofosfamid grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Siklofosfamid grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,101).
- KELLY Siklofosfamid+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Siklofosfamid+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,106).
- KELLY Etoposid grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Etoposid grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,743).
- KELLY Etoposid+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Etoposid+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,009).
- KELLY Sisplatin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Sisplatin grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,189).
- KELLY Sisplatin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri, SH-SY5Y Sisplatin+5-aza-CdR grubunun p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinden yüksek bulunmuştur, ancak anlamlı değildir (p=0,317).

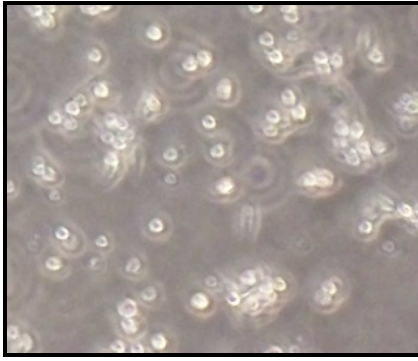
Çalışmamızda, MYCN (+) ve MYCN (-) hücrelerde, kontrol gruplarına 5-aza-CdR eklenmesiyle hücre morfolojisinde gözlenen belirgin değişiklikler aşağıda sunulmuştur (Şekil 15-18).



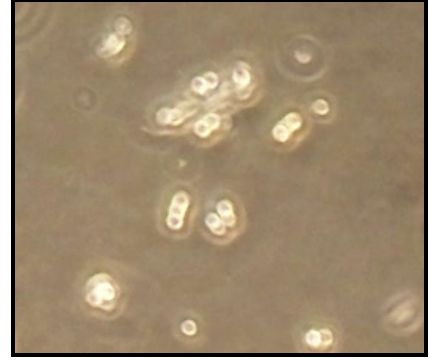
**Şekil 17.** MYCN (+) kontrol grubu



**Şekil 18.** MYCN (-) kontrol grubu



**Şekil 19.** MYCN (+) 5-aza-CdR grubu



**Şekil 20.** MYCN (-) 5-aza-CdR grubu

## 5. TARTIŞMA

---

Yüksek risk grubundaki ileri evre nöroblastom olgularından yüksek doz kemoterapi protokolleri ve periferik kök hücre nakli ile remisyon sağlanan hastalarda, erken ve özellikle geç relapsların görülmesinden sorumlu olabileceği düşünülen faktörlerden birisi minimal rezidüel hastalıktır. Günümüzde MRD'nin kontrolünde sitostatik ve sitotoksik ilaçlar, apoptotik ajanlar, immünoterapötik yaklaşımlar, anti-anjiyojenik ilaçlar, diferansiye edici ajanlar kullanılmaktadır. Ancak tüm bu tedavi yaklaşımlarına rağmen bu grupta 2 yıllık hastalıksız yaşam oranı %30-40'tır (33). Bu nedenle, daha az toksik ve daha etkin alternatif tedavi stratejilerine gereksinim bulunmaktadır.

MYCN (+) olan Kelly hücrelerinde olması beklenen MYCN geni ekspresyon düzeyleri, MYCN (-) olan SY-SY5Y hücrelerine göre anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur. Aynı hücre dizilerindeki p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, MYCN (+) hücre grubunda p14<sup>ARF</sup> gen düzeylerinin anlamlı bir şekilde yüksek olması, nöroblastomda prognozu belirleyen bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. p14<sup>ARF</sup> geni tümör baskılayıcı etkisini, diğer bir tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin nükleoplazmada yıkılmasını engelleyip hücre döngüsünü durdurarak gerçekleştirmektedir (34). Amente S. ve ark.'nın (35) çalışmalarında, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> arasında bir etkileşim bulunduğu, p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinin MYCN'in transkripsiyonel aktivitesini düzenlemede önemli olduğu bildirilmiştir. Bu bilgilerin ışığında, p14<sup>ARF</sup> geninin p53'den bağımsız olarak da tümör baskılayıcı etki gösterebileceği anlaşılmaktadır. Nitekim Datta A. ve ark.'nın (36) çalışmalarında, p14<sup>ARF</sup> geninin c-Myc gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olduğu ve MYCN geninin transkripsiyonel aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da, p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinin, başlıca olumsuz prognostik faktör olarak bilinen onkojenik MYCN düzeylerine paralel olarak yüksek bulunması ile, p14<sup>ARF</sup> geninin mitojenik bir sinyal karşısında hücrenin savunma mekanizmasında çok önemli bir görev yaptığını düşündürmektedir.

Hem MYCN (+) hem de MYCN (-) hücre gruplarında, 5-aza-CdR eklenmesiyle MYCN gen ekspresyon düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı bulunmuştur. Bu azalmanın MYCN

(+) hücre grubunda, MYCN (-) hücelere göre anlamlı bir şekilde gözlenmesi, demetile edici ajan kullanımının prognozu daha kötü olan hücrelerde daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, MYCN (+) hücrelerdeki yüksek p14<sup>ARF</sup> gen düzeyleriyle de uyumludur; demetilasyon sonucunda p14<sup>ARF</sup> transkripsiyon aktivitesinin artarak MYCN geninin transkripsiyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. Yang Q. ve ark. da (37), agresif nöroblastom primer tümör örneklerinde çeşitli genlerdeki metilasyon oranlarının yüksek olduğunu göstermişler ve tedavide demetile edici ajanların kullanılması gerekliliğini vurgulamışlardır.

Hem MYCN (+) hem de MYCN (-) hücre gruplarında, 5-aza-CdR eklenmesiyle p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur. Bu artışın MYCN (+) hücre grubunda, MYCN (-) hücelere göre anlamlı bir şekilde olması, demetile edici ajan ile bir tümör supresör geni olan p14<sup>ARF</sup> ekspresyon düzeyinin artışının tetiklendiğini göstermekte ve prognozun iyileştirilmesinde olumlu yönde katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Badal V. ve ark. (38), yaptıkları in vitro çalışmada 5-aza-CdR eklenmesiyle süreye bağımlı olarak p14<sup>ARF</sup> geninin transkripsiyonel aktivitesinin arttığını, bu durumun tümör hücrelerinin programlanmış hücre ölümüne gitmesinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Khan SH. ve ark. da (39), tümör hücrelerinde p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon artışıyla p53 aracılı apoptoz yolağının aktifleştiğini ve yeni tedavi protokollerinde bu yolağı tetikleyen p14<sup>ARF</sup> geninin hedef alınması gerektiğini bildirmişlerdir.

MYCN (+) kontrol grubu hücrelerinde p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesi, %72,08 oranında hipermetile, %27,92 oranında demetile bulunmuştur. 5-aza-CdR eklenmesiyle demetilasyon oranı %99,93 düzeyine yükselmiştir.

Vinkristin eklenen MYCN (+) hücrelerde, %99,86 oranında demetilasyon olduğu gözlenmiş, Vinkristin ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın arttığı ve Vinkristin'in demetile edici bir ajan gibi etki oluşturduğu bulunmuştur. Mikrotübül sistem inhibitörü olan Vinkristin'in, metafazda duraklamaya neden olarak mitozu engellediği bilinmektedir. Aynı zamanda, Vinkristin'in hücre siklusunun S fazına etki ederek replikasyonu durdurduğunu bildiren çalışmalar (40) da mevcuttur. Bizim çalışmamızda, Vinkristin'in hücre döngüsünde rol alan p14<sup>ARF</sup> tümör baskılayıcı genin antitümöral etki yolağındaki moleküllerle etkileştiğini düşündüren bulgular elde edilmiştir.

Dakarbazin ve Sisplatin eklenen MYCN (+) hücre gruplarında da Vinkristin'e benzeyen bir etki izlenmiş, bu ilaçların da demetile edici bir ajan gibi davranıp p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesindeki demetilasyon oranını arttırdıkları bulunmuştur.

Dakarbazin eklenen hücrelerde, %99,85 oranında demetilasyon olduğu gözlenmiş, Dakarbazin ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın arttığı bulunmuştur. Alkilleyici bir ajan olan Dakarbazin, hücre döngüsü fazlarına özgül olmayan, imidazotetrazin sınıfı kemoterapötik ilaçlar grubundandır. Diğer bir imidazotetrazin olan Temozolomid'in DNA metile edici etkisi olduğu ve bunu DNA metil transferaz (DNMT) enzimi ile yarışmalı bir şekilde gerçekleştirdiği bilinmektedir (41). DNA metilasyonu sonucunda, hücre yaşamını, proliferasyon ve diferansiyasyonunu sıkı kontrol altında tutan birçok genin önünde (promotor bölge) yer alan CpG adacıklarının metilasyonu ile gen susturulmuş olur. Bu çalışmada, aynı gruptan olmasına rağmen Dakarbazin demetile edici bir etki sergilemiştir. Bu durum, ilaçların farmakodinamiğindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Bilindiği üzere Temozolomid, karaciğerde enzimatik demetilasyon gerektirmeden fizyolojik pH'da aktif ilaç formuna dönüşebilmekte iken Dakarbazin, karaciğerde metabolik aktivasyona uğramaktadır. Bu nedenle, Dakarbazin'in metabolik aktivasyon sürecinde metile edici etkisinin ortadan kalktığı ve hatta demetile edici özellik kazandığı düşünülebilir (42).

Sisplatin eklenen hücrelerde, %99,92 oranında demetilasyon olduğu gözlenmiş, Sisplatin ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın %99,95'e yükseldiği bulunmuştur. Campbell KJ. ve ark. (43) osteosarkom hücre dizisinde, sisplatinin ARF tümör baskılayıcı fonksiyon ile benzer bir etki oluşturduğu bildirilmiştir. DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yaparak etki gösteren sisplatin, aynı zamanda NF-κB gibi antiapoptotik moleküllerin nötralizasyonu yoluyla da antineoplastik etkisini güçlendirmektedir. Shang D. ve ark. (44) mesanenin transizyonel hücreli karsinomunda, Sisplatin ile 5-aza-CdR'in birlikte verildiklerinde tümör büyümesi üzerinde sinerjistik supresyon gösterdiğini ve Siplatin ile 5-aza-CdR'in proliferasyon inhibisyonunu hücre döngüsünü G2/M noktasında durdurarak sağladığını ve bu etkinin tümör supresör gen olan p53'den bağımsız olduğunu bildirmişlerdir.

MYCN (+) hücre gruplarına İfosfamid, Doksorubisin, Siklofosfamid ve Etoposid, tek başlarına eklendiklerinde metile edici ajan gibi davranarak, p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesindeki metilasyon oranlarını arttırmışlardır. İfosfamid, Doksorubisin, Siklofosfamid'in bu etki mekanizmalarını açıklayacak herhangi bir yayına ulaşılammıştır, ancak relaps

nöroblastom hücre dizilerinde p53 mutasyonları ile ilgili bir çalışmada Melfalan, Karboplatin ve Etoposid gibi ajanlara bağlı rezistans ile p14<sup>ARF</sup> ilişkisi gösterilmiştir (45). Elde ettiğimiz verilerde gözlenen, bu ajanların p14<sup>ARF</sup> geninde oluşturduğu metilasyon, ilaç rezistansı gelişim mekanizmalarına mı, yoksa Temozolomid örneğinde olduğu gibi enzimatik bir mekanizmaya mı bağlıdır? Bu sorulara cevap bulabilmek ve bu mekanizmaların aydınlatılmasını sağlayabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

İfosfamid eklenen hücrelerde, %91,31 oranında metilasyon olduğu gözlenmiş, İfosfamid ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın %0 düzeylerine indiği ve demetilasyon oranının %99,8'e yükseldiği bulunmuştur. Bu bulgu, İfosfamid'in tek başına verildiğinde metile edici etkisinin olduğunu ancak, demetile edici bir ajan ile birlikte verildiğinde bu etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir.

Doksorubisin eklenen hücrelerde, %66,14 oranında metilasyon olduğu gözlenmiş, Doksorubisin ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın %0 düzeylerine indiği ve demetilasyon oranının %99,95'e yükseldiği gözlenmiştir. Bu bulgu, Doksorubisin'in tek başına verildiğinde metile edici etkisinin olduğunu ancak, demetile edici bir ajan ile birlikte verildiğinde bu etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir.

Siklofosfamid eklenen hücrelerde, %66,66 oranında metilasyon olduğu, Siklofosfamid ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın %0 düzeylerine indiği ve demetilasyon oranının %99,86'ya yükseldiği bulunmuştur. Bu bulgu, Siklofosfamid'in tek başına verildiğinde metile edici etkisinin olduğunu ancak, demetile edici bir ajan ile birlikte verildiğinde bu etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir.

Etoposid eklenen hücrelerde ise, %96,36 oranında metilasyon olduğu gözlenmiş, Etoposid ile 5-aza-CdR kombine edilerek verildiğinde bu oranın diğer ilaçların aksine %45,58'e kadar inemediği ve demetilasyon oranının %54,37'ye yükseldiği bulunmuştur. Bu bulgu, Etoposid'in tek başına verildiğinde metile edici etkisinin olduğunu ancak, demetile edici bir ajan ile birlikte verildiğinde bu etkisinin tamamen ortadan kaybolmadığını göstermiştir. DNA sentez inhibisyonu yaparak antitümöral etki gösteren Etoposid'in, aynı zamanda NF-κB stimülasyonu yoluyla antiapoptotik proteinleri indükleyici etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (46).

Bu çalışmada, MYCN (+) hücre gruplarında Vinkristin, Dakarbazin ve Sisplatin'in p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesini demetile edici etkilerinin, demetile edici bir ajanla arttırıldığı; İfosfamid, Doksorubisin, Siklofosfamid ve Etoposid'in p14<sup>ARF</sup> geninin promotor

bölgesini metile edici etkilerinin, demetile edici bir ajanla azaltıldığı bulunmuştur. Dolayısıyla, güncel tedavi protokollerinde kullanılan bu ilaçlarla birlikte demetile edici bir ajanın kombinasyonunun faydalı olabileceği düşünülmektedir.

MYCN (-) kontrol grubu hücrelerinde p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesi, %62,38 oranında demetile bulunmuştur. 5-aza-CdR eklenmesiyle demetilasyon oranı %99,58 düzeyine yükselmiştir. Vinkristin, Dakarbazin, İfosfamid, Doksorubisin, Siklofosfamid ve Sisplatin eklenen hücrelerde, kontrol grubundaki hücrelere göre demetilasyon oranlarında belirgin bir artış olduğu gözlenmiş, 5-aza-CdR ile kombine edilerek verildiklerinde bu oranların daha da arttığı ve sonuç olarak, bu ilaçların demetile edici bir ajan gibi etki oluşturdukları bulunmuştur.

Antimitotik bir ajan olan Doksorubisin'in kaspaz-8 mRNA ekspresyonlarını arttırarak gerçekleştirdiği apoptotik etkisinin, demetile edici bir ajan ile kombine verildiğinde daha da arttığı gözlenmiştir. Liu JQ. ve ark. (47) MYCN (-) hücre grubu olan SH-SY5Y nöroblastom hücre dizisinde yaptıkları bir çalışmada, 5-aza-CdR ile birlikte verilen Doksorubisin'in antitümöral etkinliğinde belirgin bir artış izlendiği ve bunun kaspaz-8 mRNA ekspresyon düzeylerindeki artışa paralel olduğu bildirilmiştir.

Başta nöroblastom olmak üzere, medülloblastom ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli solid tümörlerde, kaspaz-8 ekspresyonlarının metilasyon ile inaktive olduğu bilinmektedir. Bugün nöroblastom minimal rezidüel hastalığın kontrolünde diferansiye edici ajan olarak kullanılmakta olan retinoik asit ile yapılan çalışmalarda, retinoik asitin de kaspaz-8 düzeylerini arttırarak apoptozu hızlandırdığı gösterilmiştir (48).

Öte yandan, Etoposid verilen MYCN (-) hücre grubunda, p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesinin metilasyon oranlarını metile edici ajan gibi davranarak arttırdığı, 5-aza-CdR ile kombine edilerek verildiğinde ise tek başına sergilediği metilasyon profilinin ortadan kalkarak demetilasyon oranlarının arttığı gözlenmiştir.

Bu araştırmada, Etoposid'in hem MYCN (+) ve hem de MYCN (-) hücre gruplarında, p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesini metile edici etki oluşturduğu ve bu etkisinin demetile edici bir ajan eklendiğinde azaltıldığı bulunmuştur. Bu bulgu, araştırmada uygulanan diğer ilaçlardan farklı olarak sadece Etoposid'e özgüdür. Özellikle Etoposid'de görülen ve antineoplastik tedavi amacına ters düşen istenmeyen etkilerin, çeşitli tümör hücre dizilerinde



olmak üzere in vivo deneylerle de araştırılması ve mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir.

Ulaşılabilen literatür değerlendirmesinde; hem MYCN (+) ve hem de MYCN (-) nöroblastomda, gerek minimal rezidüel hastalık modelinde gerekse p14<sup>ARF</sup> ile ilgili demetile edici ajanlarla yapılmış herhangi bir araştırma bulunamamıştır. Ancak, nöroblastom dışındaki diğer pediyatrik ve erişkin solid tümörlerinde yapılan çalışmalarda, kemoterapi protokollerine eklenen demetile edici ajanların antitümör etkinliği arttırdıkları ve epigenetik tedavi yaklaşımlarında toksik olmayan yeni demetile edici ajanların geliştirilmesine ihtiyaç bulunduğu açıklanmaktadır. Nitekim, Majid S. ve ark. (49), renal hücreli karsinom hücre dizilerinde BTG3 tümör supresör geninin demetilasyonu için 5-aza-CdR ve genistein kullanarak, bu iki demetile edici bileşiğin etki düzeylerini karşılaştırmışlar ve diyetteki izoflavonların yapısında doğal olarak bulunan, toksik olmayan genistein maddesinin, yüksek toksisiteye sahip instabil bir yapıda olan 5-aza-CdR'e benzer düzeyde bir etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yine, myeloid malignansilerde demetile edici ajanların etkilerini inceleyen bir çalışmada da, demetile edici ajanların özellikle düşük doz uygulamalarında daha etkili oldukları ve demetile edici ajanlarla yapılan kombinasyon tedavilerinin çok daha etkin olabileceği gösterilmiştir (50).

Günümüzde kullanılan bazı sitotoksik ilaçların standart kemoterapide kullanılan dozlarının onda biri gibi düşük dozlarda, daha az yan etki ile MRD'nin kontrolü için uygulanan idame tedavilerinde kullanılabileceğine ve başarı elde edilebileceğine dair veriler bulunmaktadır. Nöroblastom'da uygulanan metronomik tedavinin amacı, ilaçların toksik yan etkilerini en aza indirmek, kemoterapötiklere karşı direnç gelişimini azaltmak ve antianjiyogenik etkisinden faydalanarak relapsları engellemektir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, MRD'yi kontrol edebilmek amacıyla uygun, düşük doz sitotoksik ve sitostatikler gibi demetile edici ajanların da uygulanabileceği düşünülmektedir. Ancak, Azasitidin ve Desitabin gibi toksisitesi yüksek ajanların yerine kullanılabilecek, toksik olmayan yeni demetile edici bileşiklerin geliştirilmesine ve bu ilaçlarla birlikte düzenlenecek olan kombinasyon tedavi protokollerinin hazırlanmasında farmakokinetik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

---

- 1) MYCN (+) hücre grubunda, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur.
- 2) MYCN (-) hücre grubunda, MYCN ve p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyleri anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur.
- 3) MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarının herikisinde de, demetile edici ajan eklenmesiyle MYCN gen ekspresyon düzeyinin azaldığı, p14<sup>ARF</sup> gen ekspresyon düzeyinin ise arttığı bulunmuştur.
- 4) Vinkristin, Dakarbazin ve Sisplatin, MYCN (+) ve MYCN (-) hücre gruplarının herikisinde de p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesini demetile edici etki oluşturmuşlardır ve demetile edici bir ajan eklendiğinde bu etkilerinin arttığı bulunmuştur.
- 5) İfosfamid, Doksorubisin ve Siklofosfamid, MYCN (-) hücre gruplarında p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesini demetile edici etki oluştururken; MYCN (+) hücre gruplarında metile edici etki oluşturmuşlar ve demetile edici bir ajan eklendiğinde ise metile edici etkilerinin ortadan kaybolduğu gözlenmiştir.
- 6) Etoposid'in hem MYCN (+) ve hem de MYCN (-) hücre gruplarında, p14<sup>ARF</sup> geninin promotor bölgesini metile edici etki oluşturduğu ve bu etkisinin demetile edici bir ajan eklendiğinde azaltıldığı bulunmuştur.

Sonuç olarak; nöroblastom MRD'de, p14<sup>ARF</sup> gen metilasyonunun çok önemli bir rol oynadığı ve MRD kontrolünde kullanılan ilaçların etkinliğini arttırmak ve daha etkin yeni tedavi kombinasyonlarını planlamak için, p14<sup>ARF</sup> geninin tümör baskılayıcı yolağı içerisinde bulunan, p14<sup>ARF</sup> geni ile ilişkili farklı etki ve direnç mekanizmalarının hem in vitro ve hem de in vivo aydınlatılması gerektiği anlaşılmıştır. Bu konuda yapılmış olan çalışma sayısı çok azdır, dolayısıyla yanıtlanmayı bekleyen oldukça fazla sayıda soru bulunmaktadır. Bu

soruların cevaplanabilmesi için, gerek nöroblastom ve gerekse diğer malign tümör modellerinde, ileri araştırmaların yapılmasına gereksinim bulunmaktadır.

İkinci sonuç; nöroblastom MRD kontrolünde metronomik tedavilere ek olarak, kötü prognoz belirteci olan MYCN (+) hücre grubunda daha etkili olduğu gösterilen demetile edici ajanların, bu tedavi modaliteleri ile kombine edilerek uygulanabileceği düşünölmüştür. Bunun için, daha az toksik ve daha etkin yeni alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine gereksinim vardır. Bu konuda da yapılacak olan ileri farmakokinetik çalışmalarla, doz optimizasyonlarının düzenlenmesinin ve kişiye özel tedavi protokollerinin oluşturulmasının gerekliliği, bu çalışmamız ile bir kez daha vurgulanmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

---

1. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 1999;17:2264-79.
2. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Uysal K. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG-NBL) nöroblastom 2003 tedavi protokolü.
3. Berthold F. Neuroblastoma-90 (NB-90) protocol. German Pediatric Oncology Group (GPOG-NBL) 1990.
4. Matthey KK, Perez C, Seeger RC, et al. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: A Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol*, 1998;16:1256.
5. SIOPEN Annual General Meeting, Stockholm, 30th October-3rd November, 2006.
6. Nöroblastom tedavi protokolü. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG-NBL) 1992.
7. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo H, Biedler JL, Cheung NV, Ross RA. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*, 2004;6:838-845.
8. Kang J, Rychahou PG, Ishola TA, Qiao J, Evers BM, Chung DH. N-MYC silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 2006;351:192-197.
9. Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, 2001;92(10):2699-708.
10. Mühlethaler-Mottet A, Flahaut M, Bourlout KB, Auderset K, Meier R, Joseph J, Gross N. Histone deacetylase inhibitors strongly sensitise neuroblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by a caspases-dependent increase of the pro- to anti-apoptotic proteins ratio. *BMC Cancer*, 2006;6,214:1-13.
11. Haraguchi S, Nakagawara A. A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PLoS One*, 2009 Sep 4;4(9):e6902.

12. Jacobs JF, van Bokhoven H, van Leeuwen FN, Hulsbergen-van de Kaa CA, de Vries IJ, Adema GJ, Hoogerbrugge PM, de Brouwer AP. Regulation of MYCN expression in human neuroblastoma cells. *BMC Cancer*, 2009;9:239.
13. Altungoz O, Aygun N, Tumer S, Ozer E, Olgun N, Sakizli M. Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p36 status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007;172(2):113-9.
14. Nur Olgun, SIOPEN üyesi, kişisel görüşme ile sözlü iletişim bilgisi, 2009.
15. Kim E, Shohet J. Targeted Molecular Therapy for Neuroblastoma: The ARF/MDM2/p53 Axis. *J Natl Cancer Inst*, 2009;101(22):1527-29.
16. Van Maerken T, Vandesompele J, Rihani A, De Paepe A, Speleman F. Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ*, 2009;16(12):1563-72.
17. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, Gerbing RB, London WB, Villablanca JG. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*, 2009;27(7):1007-13.
18. Park JR, Villablanca JG, London WB, Gerbing RB, Haas-Kogan D, Adkins ES, Attiyeh EF, Maris JM, Seeger RC, Reynolds CP, Matthay KK; Children's Oncology Group. Outcome of high-risk stage 3 neuroblastoma with myeloablative therapy and 13-cis-retinoic acid: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 2009;52(1):44-50.
19. Vermeulen J, De Preter K, Naranjo A, Vercruyse L, Van Roy N, Hellemans J, Swerts K, Bravo S, Scaruffi P, Tonini GP, De Bernardi B, Noguera R, Piqueras M, Cañete A, Castel V, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Michon J, Combaret V, Fischer M, Oberthuer A, Ambros PF, Beiske K, Bénard J, Marques B, Rubie H, Kohler J, Pötschger U, Ladenstein R, Hogarty MD, McGrady P, London WB, Laureys G, Speleman F, Vandesompele J. Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol*, 2009;10(7):663-71.

20. Nur Olgun, Dilek Gunes, Serap Aksoylar, Ali Varan, Ayse Erbay, Volkan Hazar, Ayhan Dagdemir, Rejin Kebudi, Emel Unal, Cengiz Canbulat, Inci Yildiz, Haldun Oniz, Sema Anak, Aynur Oguz, Nurdan Tacyildiz, Nilgun Yaris, Funda Corapcioglu, Inci Ilhan, Faik Saialioglu, Kamer Mutafoğlu Uysal, Oguz Altungoz, Vedat Koseoglu, Gulnur Tokuc, Betul Biner, Savas Kansoy. The Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma 2003 (TPOG-NB-2003): Treatment Results Of The High Risk Group. 40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology Berlin, Germany. October 2-6, 2008. SIOP Abstract Book, D110:140.
21. Hellebrekers DMEI, Griffioen AW, Engeland M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1775:76-91.
22. Tonini GP, Romani M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. *Cancer Letters*, 2003;197:69-73.
23. Gilbert SF. Ageing and cancer as diseases of epigenesis. *J Biosci*. 2009;34(4):601-604.
24. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003;33:245-54.
25. Carr J, Bell E, Pearson ADJ, Kees UR, Beris H. Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14<sup>AFR</sup> pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res* 2006;66:4.
26. Agrawal A, Yang J, Murphy RF, Agrawal DK. Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: an overview in breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2006;81(2):115-22.
27. Lim KP, Sharifah H, Lau SH, Teo SH, Cheong SC. Alterations of the p14ARF-p53-MDM2 pathway in oral squamous cell carcinoma: MDM2 overexpression is a common event. *Oncol Rep*. 2005;14(4):963-8.
28. Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, Lunec J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2003 Jul 18;197(1-2):93-8.
29. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, Triche TJ, Reynolds CP. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*, 2001;61(16):6185-93.

30. Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, Michelland S, Combaret V, Favrot MC. Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Jan;50(1):29-32.
31. Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fifth Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 933-71.
32. Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. *Int. Rev. Cytol*. 1998;177:1-56.
33. Olgun N. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu, Nöroblastom - 2009 Tedavi Protokolü (TPOG-NB-2009).
34. Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H. The ARF tumour suppressor. *Int J Biochem & Cell Biol*, 2006;38:1637-41.
35. Amente S, Gargano B, Diolaiti D, Vale GD, Lania L, Majello B. p14<sup>ARF</sup> interacts with N-Myc and inhibits its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 2007;581:821-5.
36. Datta A, Nag A, Pan W, Hay N, Gartel AL, Colamonici O, Mori Y, Raychaudhuri P. Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J Biol Chem*, 2004;279(35):36698-707.
37. Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, London WB, Cohn SL. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*, 2007;13(11):3191-7.
38. Badal V, Menendez S, Coomber D, Lane DP. Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation. *Cell Cycle* 2008;7:1,112-119.
39. Khan SH, Moritsugu J, Wahl GM. Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3266-71.
40. Abou El Hassan MA, van der Meulen-Muileman I, Abbas S, Kruyt FA. Conditionally replicating adenoviruses kill tumor cells via a basic apoptotic machinery-independent mechanism that resembles necrosis-like programmed cell death. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12243-51.
41. Everhard S, Kaloshi G, Criniere E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, Sanson M, Kujas M, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J. MGMT Methylation:

- A Marker of Response to Temozolomide in Low-Grade Gliomas. *Ann Neurol*, 2006;60:740-743.
42. Barone G, Maurizi P, Tamburrini G, Riccardi R. Role of temozolomide in pediatric brain tumors. *Childs Nerv Syst*, 2006;22(7):652-61.
  43. Campbell KJ, Witty JM, Rocha S, Perkins ND. Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor- $\kappa$ B transactivation. *Cancer Res*, 2006;66(2):929-35.
  44. Shang D, Liu Y, Matsui Y, Ito N, Nishiyama H, Kamoto T, Ogawa O. Demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine enhances susceptibility of bladder transitional cell carcinoma to Cisplatin. *Urology*, 2008;71(6):1220-5.
  45. Carr J, Bell E, Pearson ADJ, Kees UR, Beris H. Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14<sup>AFR</sup> pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res* 2006;66:4.
  46. Singh S, Khar A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2006;6(3):259-70.
  47. Liu JQ, Li AM, Zhang JH. 5-azacytidine enhances anti-tumor efficacy of doxorubicin to neuroblastoma cell lines. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2007;9(6):577-9.
  48. Jiang M, Zhu K, Grenet J, Lahti JM. Retinoic acid induces caspase-8 transcription via phospho-CREB and increases apoptotic responses to death stimuli in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008;1783(6):1055-67.
  49. Majid S, Dar AA, Ahmad AE, Hirata H, Kawakami K, Shahryari V, Saini S, Tanaka Y, Dahiya AV, Khatri G, Dahiya R. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis*, 2009;30(4):662-70.
  50. Garcia-Manero G. Demethylating agents in myeloid malignancies. *Curr Opin Oncol*, 2008;20(6):705-10.



## EK.1: ETİK KURUL ONAYI

### DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 25.04.2008/ 151

#### Etik Kurul Üyeleri

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

#### Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

#### Etik Kurul Sekreteri

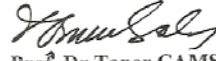
Doç.Dr. Fatma İGCI

#### DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 24 Nisan 2008 tarih ve 14/09/2008 no.lu toplantısında, 138/2008 Protokol numaralı Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Safiye AKTAŞ'ın proje yöneticisi, Uzm.Dr.Zübeyde ERBAYRAKTAR'ın sorumlusu olduğu, "p14<sup>ARF</sup> metilasyonunun nöroblastom minimal rezidüel hastalıktaki rolü" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



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

Tel: 0232 412 22 54