

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTİK TÜMÖRLERDEKİ BÖLGESEL  
DNA KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN ve  
ALLELİK DENGESİZLİKLERİN  
TANIMLANMASI**

SAİT TÜMER

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK  
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

DEU.HSI.PhD-2006970169

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTİK TÜMÖRLERDEKİ BÖLGESEL  
DNA KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN ve  
ALLELİK DENGESİZLİKLERİN  
TANIMLANMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK  
DOKTORA TEZİ

SAİT TÜMER

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. OĞUZ ALTUNGÖZ

(Bu araştırma DEÜ-Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından  
2007.KB.SAG.023 sayı ile desteklenmiştir.)

DEU.HSI.PhD-2006970169

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi Sait Tümer “NÖROBLASTİK TUMÖRLERDEKİ BÖLGESEL DNA KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN ve ALLELİK DENGESİZLİKLERİN TANIMLANMASI” konulu Doktora tezini 21/05/2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BASKAN

Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Nur OLGUN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Doç. Dr. Yusuf BARAN

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

ÜYE

Prof. Dr. Erdener ÖZER

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı

Yedek ÜYE

Doç. Dr. Cemal ÜN

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

Yedek ÜYE

Yard.Doç.Dr. Çiğdem ERESEN

YAZICIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## İÇİNDEKİLER

Tablolar Dizini.....	IV
Şekiller Dizini.....	V
Kısaltmalar .....	VI
Teşekkür .....	VII
Özet.....	1
Abstract.....	2
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ.....</b>	<b>3-5</b>
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	3
1.2. Araştırmanın Amacı.....	4
1.3. Araştırmanın Hipotezleri .....	4
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>6-16</b>
2.1.Nöroblastom ve Epidemiyolojisi .....	6
2.2.Nöroblastomun Genetik Özellikleri .....	7
2.2.1.Genetik Yatkınlık ve Kalıtsal Özellikler .....	7
2.2.2. Onkogen Aktivasyonu ve Amplifikasyonlar .....	8
2.2.3.DNA Ploidisi .....	8
2.2.4.Kromozomal ve Allelik Kayıplar .....	9
2.2.5.Kromozomal ve Allelik Kazanımlar.....	10
2.3. <i>MYCN</i> Amplifikasyonu ve Replikasyon Zamanlanması.....	11
2.4. Nöroblastom Histopatolojisi, Evreleme ve Risk Gruplama Sistemi .....	13
2.5.Nöroblastomda Genetik Analiz Yöntemleri .....	15
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>17-38</b>
3.1. Araştırmanın Tipi .....	17
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı .....	17
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi .....	17
3.4. Çalışma Materyali .....	17
3.5. Araştırmanın Değişkenleri .....	17

3.6. Veri Toplama Araçları .....	18
3.6.1. Floresans in situ Hibridizasyonu (FISH) Protokolü .....	18
3.6.2. Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	21
3.6.3.Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) .....	22
3.6.4. Double Minutes (DM) İçeren Hücre Dizisinde DM'lerin Replikasyon Zamanının Saptanması .....	29
3.6.4.1. Hücrelerin Hazırlanması .....	29
3.6.4.2. Çözeltilerin Hazırlanması .....	29
3.6.4.3. Deney Aşamaları .....	30
3.6.5. Dizin CGH (Array CGH; aCGH) .....	32
3.6.5.1. DNA Ölçümleri ve DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	33
3.6.5.2. Örneklerin işaretlenmesi .....	34
3.6.5.3. Hibridizasyon ve Yıkamalar .....	36
3.6.5.4. Tarama ve Analiz.....	36
3.7. Araştırma Planı .....	37
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi .....	38
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	38
3.10. Etik Kurul Onayı .....	38
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39-57</b>
4.1. Olguların Seçimi ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi .....	39
4.2. FISH Sonuçları .....	41
4.3.MLPA Sonuçları.....	41
4.3.1. Hastalarda Saptanan Genetik Değişikler .....	41
4.3.2. Olguların MLPA Sonuçlarına Göre Gruplandırılması .....	45
4.3.3. Prob Setlerinde Yer Alan Genlerin Kopya Sayılarının Saptanması .....	49
4.3.4.MLPA ve FISH Çalışmalarının Karşılaştırılması.....	49
4.3.5. Amplikon Analizleri .....	49
4.3.6. Sonuçların İstatistiksel Anlamda Değerlendirilmesi .....	52
4.3.6.1.Klinik ve Genetik Parametreler Arasındaki İlişki .....	52
4.3.6.2.Genetik Parametrelerin Kendi Aralarındaki İlişkileri.....	52
4.4. DM'lerin Replikasyon Zamanı Çalışmalarının Sonuçları .....	53

4.5. Dizin CGH (aCGH) sonuçları .....	55
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>58-64</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>65-66</b>
<b>7.REFERANSLAR .....</b>	<b>67-79</b>
<b>8.EKLER .....</b>	<b>80-94</b>
Ek1. Etik Kurul Raporu .....	80
Ek2. Bilgilendirilmiş Onam Formu .....	81
Ek3. Özgeçmiş.....	82-88
Ek4. Tezden Yapılan Yayınlar .....	89-94

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflaması (INPC) .....	14
<b>Tablo 2.</b> Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS) kıstasları.....	15
<b>Tablo 3.</b> MLPA çalışmalarında kullanılan prob setlerin içeriğinde yer alan genler.....	24
<b>Tablo 4.</b> Dizin CGH yapılan olguların MLPA sonuçları ve klinik verileri .....	33
<b>Tablo 5.</b> Dizin CGH yapılan olguların ana ve ara stok DNA ölçümleri ve saflıkları.....	33
<b>Tablo 6.</b> NB tanısı alan hastalara ait klinik özellikler.....	40
<b>Tablo 7.</b> <i>MYCN</i> geni FISH sonuçları .....	41
<b>Tablo 8.</b> NB olgularında kromozom kollarındaki aberasyonların dağılım tablosu .....	43
<b>Tablo 9.</b> MLPA sonuçlarına göre olguların gruplandırılması.....	45
<b>Tablo 10.</b> MLPA sonuçlarına göre oluşturulan grupların olgulara göre dağılımları .....	47
<b>Tablo 11.</b> <i>MYCN</i> amplifikasyonu gözlenen olgularda amplikonların genlere göre dağılımı ..	51
<b>Tablo 12.</b> Çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçları .....	53
<b>Tablo 13.</b> Dizin GCH sonuçları .....	57

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. MLPA metodolojisinin grafiksel gösterimi .....	23
Şekil 2. Dizin CGH yapılan olguların agaroz jel görüntüsü .....	34
Şekil 3. NB tanısı alan olguların evre dağılımları .....	39
Şekil 4. NB tümörlerinde <i>MYCN</i> lokus spesifik FISH sonuçları .....	42
Şekil 5. NB olgularında MLPA ile analiz sonuçları.....	44
Şekil 6. Klinik parametrelerin gruplara göre dağılımları .....	46
Şekil 7. MLPA sonuçlarına göre gruptaki genetik aberasyonların dağılımları.....	48
Şekil 8. SiMa ve Kelly hücre hattında BrdU katılımı deney sonuçları .....	54
Şekil 9. Dizin-CGH çalışmasının Nexus-6 yazılımı ile yapılan analizi .....	56



## **KISALTMALAR**

**NB:** Nöroblastom

**FISH:** Floresans *in situ* hibridizasyonu

**MLPA:** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

**aCGH:** Array Comparative Genomic Hiybrization

**HSR:** Homogeneously Staining Regions

**DM:** Double Minutes

**TPOG:** Türkiye Pediatrik Onkoloji Grubu

**pNT:** Periferal nöroblastik tümör

**INSS:** International Neuroblastoma Staging System

**INPC:** International Neuroblastoma Pathology Classification System

**GNB:** Ganglionöroblastom

**GNR:** Ganglionörom

**MKI:** Mitotik Karyoreksis İndeksi

**LOH:** Loss of Heterozygosite

**Mb:** Mega baz

**Kb:** Kilo baz

**TSG:** Tümör Baskılayıcı Gen

**SNP:** Tek Nükleotid Polimorfizmi

**BrdU:** Bromodeoksiüridin

**DAPI:** 4,6-diamidino-2-phenylindole

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca sadece eğitim değil öğrenimime de katkılarını hiçbir zaman kısıtlamadan sunan, bu zaman zarfı boyunca bize bilimsel ve gelişimsel anlamda yeni ufuklar açan değerli hocam Doç. Dr. Oğuz Altungöz'e teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Projemizin gelişiminde deneylere, fikri ve bireysel katkılarının yanı sıra bu süreçte her anlamda bana desteğini hissettiren değerli dostum Ar. Gör. Özkan Bağcı'ya teşekkür ederim. Projemizin temelini oluşturan tümör örneklerinin toplanmasında ve bize gönderilmesini koordine eden Türkiye Pediatrik Onkoloji Derneği üyelerine ve özellikle projemize yaptıkları ciddi katkılar için Prof. Dr. Nur Olgun ve Doç. Dr. Dilek Güneş'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımızın bir kısmını yürüttüğümüz İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü BİYOMER'den Doç. Dr. Çağlar Karakaya ve çalışmalarımıza gösterdiği özenden dolayı Uzman Evrim Balcı'ya teşekkür ederim.

Çalışmaları yürüttüğüm Anabilim Dalındaki tüm öğretim üyelerimize ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Üniversite eğitimimin en başından itibaren benimle birlikte sevinen, üzülen ve tüm bu süreçlere görünmeden en büyük katkıyı veren değerli Hocam Prof. Dr. Özlem Yılmaz'a ayrıca teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum. Birçok noktada kendisini örnek almaya çalıştığım saygıdeğer hocamız Prof. Dr. Orhan Terzioğlu'na teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim eşim ve tüm aileme teşekkür ederim.

# NÖROBLASTİK TÜMÖRLERDEKİ BÖLGESEL DNA KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN ve ALLELİK DENGESİZLİKLERİN TANIMLANMASI

Sait Tümer

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

## ÖZET

Periferal nöroblastik tümörler, özellikle nöroblastom (NB), en sık gözlenen çocukluk çağı neoplastik oluşumdur. klinik davranış bakımından kendiliğinden spontan gerileyen benign ganglionöromdan agresif ve metastatik malign tipe kadar farklılık gösterebilmektedir. NB karmaşık ve heterojen genetik değişiklikler içermektedir. En sık gözlenen değişiklikler; ploidi sapmaları, *MYCN* geninin amplifikasyonu, 1p, 3p, 11q delesyonları ve 17q kol kazanımlarıdır. Bu çalışmada, 249 NB tümörü olan olguda genomik skalada gözlenen genetik değişiklikler (*MYCN* geninin amplifikasyonu, 1p, 3p, 11q delesyonları ve 17q kol kazanımı) ve klinik özellikler (yaş, tümör evresi ve histolojisi) çok değişkenli lojistik regresyon analiziyle değerlendirildi. Ayrıca 11q delesyonu ve 3p delesyonu gözlenen olgularda dizin CGH çalışmaları yapıldı. Aynı zamanda amplikon gözlenen hücre hatlarında replikasyonunun hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında olabileceğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Olguların tamamında; 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 12, 14 ve 17. kromozom kollarında 100'den fazla prob kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirildi. PCR ile çoğaltılan ürünlerin nicel analizi kapiller elektroforez ile gerçekleştirildi. NB tanı olgularda *MYCN* amplifikasyonu % 23.3, 1p delesyonu % 31.7, 3p delesyonu % 20.8, 11q delesyonu % 26.2, 17q kazanımı % 77.2 oranında gözlemlendi. *NAG*, *DDX1* ve *ALK* gen amplifikasyonu ile *MYCN* amplifikasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu. SiMa hücre hattına DM yapılarının kendini eşlemesinin hücre döngüsünden bağımsız olmadığı ve S-fazında olduğu gösterildi. MLPA sonuçlarına göre 4 tümör grubu oluşmuştur. *Grup1*; *MYCN* amplifikasyonu ve 1p delesyonundan en az birini taşıyanlar. *Grup2*; 11q delesyonu ve 3p delesyonundan en az birini taşıyanlar. *Grup3*; *MYCN* amplifikasyonu veya 1p ve 11q veya 3p delesyonlarından en az ikisini taşıyanlar. *Grup4* ise bu anomalileri taşımayan tümörler. Grup1, 2 ve 3'de olguların çoğunluğu 12 ay üstü yaş, yüksek evre, kötü histoloji grubunda olduğu saptandı. Sonuç olarak, NB'de çoklu genetik değişikliklerin saptanmasında MLPA kullanılması etkin ve duyarlı bir yaklaşım olup, tümörlerin çoklu genetik özellikleri bakımından sınıflandırılmasını ve tedavi protokollerinin etkin bir biçimde uygulanmasına destek sağlayabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Nöroblastom, MLPA, genom ölçekli analizler, dizin CGH, *MYCN* amplifikasyonu.

# ANALYSIS OF ALLELIC IMBALANCES AND LOCAL DNA COPY NUMBER CHANGES IN NEUROBLASTIC TUMORS

Sait Tumer

Dokuz Eylul University, Medical School, Department of Medical Biology and Genetics,  
Balcova-İzmir

## ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is a neoplasm of sympathetic nervous system and the most frequent extra cranial solid tumor of early childhood. The tumors have variable clinical presentation, ranging from a benign tumor which is regress spontaneously or mature into ganglioneuroma to an aggressive and metastatic malignant progression. NB has very complex and heterogeneous genetic alterations. The most common alterations are ploidy changes, amplification of the *MYCN*, deletions of chromosomes arms 1p, 3p and 11q and gains of 17q arm. In this study, we analyzed genomic scale of the genetic alterations and clinical parameters of the primary neuroblastic tumors in 249 cases with MLPA. Also, we investigated a significance of association between clinical (age, tumor stage and histology) and genetic (*MYCN* amplification, 1p, 3p, 11q deletions and 17q gain) parameters with multivariate logistic regression analyses. In addition, array CGH analyses were observed in tumors with 11q and 3p deletions. At the same time, we thought that amplicons observed in cell lines may be replicated at any stage of the cell cycle. MLPA analyses of multiple loci at chromosomes 1, 2, 3, 4, 7, 9, 12, 14, and 17 were performed using more than one hundred probes. Amplified PCR products were separated with a capillary electrophoresis and fragments were analyzed with it. Major anomalies in NB were *MYCN* amplification (23.3%), 1p (31.7%), 3p (20.8%), 11q (26.2%) deletions and 17q (77.2%) gain. There was a highly significant amplification of *MYCN* gene and *NAG*, *DDXI* and *ALK* amplifications. Replication of double minutes on SiMa cell line was shown dependent on the cell cycle (S phase). Genetic analysis of multiple loci by MLPA revealed four different tumor groups: (*Grup1*) Tumors with *MYCN* amplification and 1p deletion or at least one of them, (*Grup2*) Tumors with 11q and 3p deletions or at least one of them, (*Grup3*) *MYCN* amplification and/or 1p deletion and 11q and/or 3p deletions at least one of them, (*Grup4*) tumor with anomalies other than 1p, 3p, 11q deletions or *MYCN* amplification. The majority of the patients in the Group1, 2 and 3 were detected over 12 months of age, high stage and poor histology. In conclusion, our results show that MLPA can confidently and effectively be utilized to detect multiple genomic imbalances at a time, and these changes can be classified into genetic subtypes of NB. Also, MLPA applications could be effectively supported by treatment protocols.

**Keywords:** Neuroblastoma, MLPA, genome-wide analyses, array CGH, amplification of the *MYCN* gene.

## 1.GİRİŞ ve AMAC

### **1.1. Problemin Tanımı ve Önemi**

Nöroblastom (NB), erken çocukluk döneminde sıklıkla gözlenen, sempato-adrenal hücre soyunun herhangi bir evresinden köken aldığı düşünülen ve klinik davranış bakımından son derece çeşitlilik gösteren bir tümördür. Tümör bazı hastalarda kendiliğinden farklılaşma ve gerileme özelliği gösterirken, diğer hastalarda tedavi uygulanmasına rağmen agresif ilerleme gösterebilmektedir [1]. Tümörün bu değişken klinik davranışı, NB'nin biyolojik ve prognostik özelliklerine yönelik yoğun araştırma yapılmasına yol açmıştır. Bu klinik çeşitlilikte, tümörün patofizyolojisini anlamamız ve daha özgül tedavi yaklaşımlarının bulunmasını sağlayabilecek çok sayıda genetik ve biyolojik özellikler arasında bazı anlamlı birliktelikler olduğu görülmüştür.

NB'nin biyolojik ayırıcı özelliği tümör hücrelerinde somatik olarak ortaya çıkan karmaşık, heterojen genetik dengesizliklerdir. Bu genetik değişikliklerden bazılarının (1p ve 11q delesyonları, 17q kazanımı ve *MYCN* geni amplifikasyonu) prognostik anlamı tanımlanmış olmasına rağmen, kromozom düzenlenmeleri nedeniyle oluşan dengesiz lokuslarda tutulum gösteren genler büyük ölçüde bilinmemektedir. Tümör davranışıyla ilişkilendirilebilen en anlamlı genetik değişiklik *MYCN* genin amplifikasyonudur. *MYCN* geni, olguların yaklaşık % 20-25'inde amplifikasyon ile kopya sayısını arttırdığı ve bunun da prognostik anlamının olduğu net olarak bilinmektedir [1]. *MYCN* amplifikasyonu gözlenmeyen % 75-80'lik kısımda genomik dengesizliklerin saptanması ve klinik fenotiple ilişkilendirilmesi, yeni genetik prediktif belirteçlerin tanımlanarak, hastalığın risk katmanlarının belirlenmesi bakımından önem taşımaktadır.

Karmaşık genomik dengesizlikleri barındıran bu tür tümörlerde en iyi yönetsel yaklaşım genom ölçeğinde analizdir. Son yıllara kadar her biri ayrı ayrı farklı yöntemler ile (Fluoresans *in situ* Hibridizasyonu; FISH, Southern blot, PCR) çalışılan çeşitli genetik belirteçlerin klinik anlamlılığı, tek değişkenli analizlerle saptanabiliyordu. Göreli olarak daha yeni birer teknik olan Dizin CGH ("Array Comparative Genomic Hybridization") ve MLPA ("Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification") genomdaki tüm genetik dengesizlikleri tek basamakta çalışılabilmesine olanak sağlamıştır. MLPA dizin CGH'den üstün olarak, çoklu kopya sayısı değişikliklerini aynı anda ve kantitatif olarak, duyarlı bir şekilde saptayabilen alternatif bir yöntemdir.

*MYCN* amplifikasyonu mikroskobik düzeyde DM (Double Minutes) ve HSR (Homogenously Staining Regions) yapıları şeklinde gözlenebilmektedir. HSR şeklinde gözlenen amplifikasyonlar ilgili kromozom bölgesinde ya da farklı bir kromozomda ektopik olarak yerleşebilmektedir. DM'ler küçük sentromer içermeyen, metafaz plağında dağınık olarak yerleşim gösteren kromozom benzeri DNA parçalarıdır. Her bölünme sonunda iki hücreye eşit oranda DM dağılmadığı düşünülmektedir. Metafaz sırasında iğ ipliklerine tutunamayan kromozomlar kutuplara çekilemezler. Sentromer içermeyen DM'lerin kutuplara çekilmeleri söz konusu olmadığı için her bölünme sırasında sayısının azalması beklenmektedir. Ancak beklenenin aksine sayı azalmaz hatta artış bile gösterebilir. DM'lerin replikasyonunun hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında döngünün zamanlamasına bağımlı olmadan, "S" fazı dışında da replike olabileceği düşünülmektedir.

## **1.2. Araştırmanın Amacı**

Bu çalışmada; 249 NB tümörü olan olguda, sayısal genomik dengesizliklerin bütününi yarı genomik ve tam genomik ölçekte saptayabilen yöntemsel yaklaşımları ("Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" MLPA, array-CGH) kullanarak, bu ölçekteki bütün değişikliklerin birliktelik ilişkileri, kopya sayıları, kırılma noktaları gibi özellikler analiz edilecektir. Elde edilen veriler tümör oluşumu, progresyonu ve klinik davranışla ilişkileri açısından incelenecektir. Çalışmada farklı NB serilerinde günümüze kadar anomalileri saptanan lokusların tümünü kapsayan DNA prob setleri kullanılmıştır. Çalışmanın dizin CGH bileşeninde segmental dengesizlik gösteren olgularda kırılma noktası yığılım bölgelerinin, en küçük ortak delesyon alanlarının ve olası yeni amplikonların tanımlanması hedeflenmektedir. Aynı zamanda hücre hatlarında gözlenen *MYCN* amplifikasyonunun, replikasyon sonunda kayıpsız bir şekilde çıktığı görünen DM'lerin replikasyonunun hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında döngünün zamanlamasına bağımlı olmadan, "S" fazı dışında da replike olabileceğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## **1.3. Araştırmanın Hipotezleri**

NB'de genetik parametreler ile tümör fenotipi arasında ilişki bulunmaktadır. NB olgularında genomik dengesizliklerin saptanması ve klinik fenotiple ilişkilendirilmesi, yeni genetik prediktif faktörlerin ve hastalığın risk gruplamasına olanak tanır. Genetik

değişikliklerin bütünsel yaklaşımlı analizi, daha net bir genotip-fenotip ilişkisi ortaya koyabilir. NB olgularında saptanan genom ölçeğindeki genetik dengesizliklerin çok değişkenli analizi, tümör davranışını etkileyen yeni genetik belirteçlerin saptanmasını sağlayabilir. Dizin CGH dengesiz kromozom düzenlenmelerinin kırılma noktalarının saptanması NB'deki yapısal kromozom düzenlenmelerinin oluşum mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunabilir. *MYCN* amplifikasyonu pozitif olgularda hastalık agresif seyretmektedir. *MYCN* amplifikasyonu kopya sayısı niceliğinin MLPA yöntemiyle saptanması 2p24 amplikonlarının daha iyi tanımlanmasına ve amplikonların oluşum mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunabilir. *MYCN* amplifikasyonlarının metafaz plağında görülme şekillerinden biri olan DM'ler hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında replike olması amplifikasyon mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlayabilir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1.Nöroblastom ve Epidemiyolojisi**

Nöroblastom (NB) nöral krestten türeyerek, adrenal medulla ve sempatik sinir sistemin gelişimini oluşturmaya yönelik nöroektodermal hücrelerden köken alan embriyonel bir tümördür. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturur ve bu dönemde en sık rastlanan, kromozom düzeyindeki kazanım, kayıp veya yeni düzenlenmeler şeklinde kendini gösteren genomik karasızlıkla karakterize bir tümördür [1,2]. Tümör hücrelerinde gözlenen bu tür edinsel genetik değişikliklerin karmaşık olması, çoğunlukla öngörülemez, değişken klinik davranış NB'nin temel özelliklerindedir. NB genellikle bölgesel lenf düğümleri, kemik ve kemik iliğine yayılabilir. İnfantlarda öncelikle deri ve karaciğere metastaz yapmasına rağmen iyi prognoz gösterebilirler. İleri yaş olgularda da sıklıkla metastaz gözlenir ve büyük çoğunluğu kötü prognoz sergiler [3]. Olguların yaklaşık % 40-50'sinde tanıda metastaz saptanmasına karşın spontan regresyon sıklığı diğer tümörlere göre 10-100 kat daha fazladır [4].

NB insidansı 15 yaş altı çocuklarda dünya genelinde yıllık 10.5 milyon civarında olduğu ve yaklaşık olarak çocuklarda kanserden ölenlerin % 15'inin NB nedeniyle öldüğü saptanmıştır. Kuzey Amerika ve Avrupa arasında insidans bakımından belirgin bir anlamlı fark gözlenmemektedir. NB erkeklerde dişilere göre daha sık gözlenmektedir (oranı 1.2:1). İnsidansı özellikle 0-4 yaş arası en yüksek değerinde olup medyan yaş 18-23 aydır. [3,5].

Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) NB 2003 protokolünün Ekim 2006 verilerine göre; Türkiye'de ortalama tanı koyma yaşı 22 (0.3-210) aydır. Erkeklerde dişilere göre görülme sıklığı oransal olarak 1.01'dir [6]. İzmir'de 1997-2002 yılları arasında çocukluk çağı kanser insidansına yönelik yapılan çalışmada NB'ninde yer aldığı periferik sinir hücrelerinden kaynaklı (pNT) kanserlerin göreceli sıklığının % 7.1 olduğu saptanmıştır [7].

NB etiyolojisi bilinmemesine karşın çevresel faktörlerin (pestisid, elektromanyetik alan, prenatal alkol maruziyeti gibi) tümör oluşum sürecinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [3]. Ancak yapılan farklı çalışmalarda bu maruziyetlerin tümörogeneze etkisi doğrulanmamıştır [5]. Olgularda tutarlı olarak gözlenen NB insidansını, tümörogenezin genetik faktörlerin eşliğinde oluştuğu hipotezini desteklemektedir [3].

Periferik nöroblastik tümörler (pNT), özellikle NB "küçük mavi yuvarlak hücre" grubundan köken alan çocukluk çağı neoplastik oluşumdur. Bu hücreler nöral krestin



sempatikoadrenal hücrelerinin öncüllerinden türemiştir. Nöral krestten köken alıp adrenal medulla ve sempatik sinir sistemine hedeflenen nöroektodermal hücrelerin oluşturduğu embriyonel bir tümördür. Tümörler çoğunlukla adrenal medulla (% 50), abdomen ve pelviste (% 30) ve daha az sıklıkta göğüste gözlenmektedir [5,8,9]. NB farklılaşmamış “undifferentiated” tümör olup nöroblast denilen küçük yuvarlak hücrelerden oluşmaktadır. Farklılaşma arttıkça tümör stromasında yer alan schwann hücrelerinde de artış gözlenir ve tümör NB’den ganglionöroblastom (GNB) ve benign ganglionöroma (GNR) doğru evrilir [1,3].

## 2.2.Nöroblastomun Genetik Özellikleri

NB’de sıklıkla tutulum gösteren *MYCN* amplifikasyonu dışında, gen düzeyinde diğer kanserlerde rolü olduğu bilinen genlerin aberasyonları gözlenmemektedir. NB’nin biyolojik özelliği, tümör hücrelerinde gözlenen somatik genetik değişikliklerin son derece karmaşık olmasıdır. NB tümörlerinde günümüze kadar yapılan sitogenetik ve moleküler düzeydeki çalışmalar; rastlantısal olmayan, tutarlı genetik değişikliklerin tanımlanmasını sağlamıştır [10-14]. En sık gözlenen değişiklikler; ploidy sapmaları, *MYCN* geninin amplifikasyonu, 1 no’lu kromozomun p kolunun delesyonu, 11 no’lu kromozomun q kolunun delesyonu ve 17 no’lu kromozomun q kolundaki sayısal artışlardır [1,8,14]. Tutarlı sporadik genetik değişikliklerin yanı sıra, bazı olgularda konstitüsyonel kromozom anomalileri gözlenebilmektedir. Özellikle 1p lokusunun NB yatkınlığı ile ilgili olabileceği, 1p36 lokusunun ailesel olgularda tutulum gösterdiği saptanmıştır [5].

### 2.2.1.Genetik Yatkınlık ve Kalıtsal Özellikler

Ailesel NB nadir görülmekle birlikte, tüm NB olguları içerisinde % 1’lik kısmı oluşturmaktadır. Sınırlı sayıda ailede soyağaçları çıkartılıp linkaj analizleri yapılmıştır [15]. Kromozom 1p36 lokusundaki bazı genlerde (*NF1*, *RET*, *GDNF*, *GDNFRA*, *EDNRB*, *EDN3*) yatkınlık olduğu düşünülse de yapılan linkaj analizleri negatif sonuç vermiştir [16,17]. Kuzey Amerikalı bir ailede 16p12-p13 lokusu ve Avrupalı bir ailede 4p12 lokusunda yapılan linkaj çalışmalarında anlamlı yatkınlıklar saptanmıştır [18,19]. Son yapılan çalışmalarda bu lokuslara 2p ve 12p kromozom kolları da aday lokuslar olarak dahil edilmiştir [15].

*MYCN* amplifikasyonu dışında NB’ de *PHOX2B* ve *ALK* genlerinin farklı ekzonlarında gözlenen mutasyonların ailesel olduğu gösterilmiştir. *PHOX2B* konjenital merkezi

hipoventilasyon hastalığında tutulum gösteren bir gen olup, konstitüsyonel *PHOX2B* mutasyonları ailesel NB olgularında ve aynı zamanda % 2.3 oranında da sporadik NB olgularında saptanmıştır [20-22]. Yapılan son çalışmalarda *ALK* onkogenin NB patogenezinde özellikle tirozin kinaz bölgesinde yer alan mutasyonların önemli rol oynadığı gösterilmiştir [20,23-25]. *PHOX2B* ve *ALK* genlerinde gözlenen mutasyonların nöroblastik dokunun malign transformasyona katkısı olduğu düşünülmektedir [26].

### **2.2.2. Onkogen Aktivasyonu ve Amplifikasyonlar**

İstisna olgular dışında NB tümörlerinde, gen düzeyinde tutarlı bir şekilde gözlenen tek genetik aberasyon bir onkogen olan *MYCN* geni amplifikasyonudur [27-29]. Olguların % 20-25'inde gözlenen bu mutasyonel olay, ileri evre (evre 3-4) ve kötü prognozla ilişkilidir [27,30,31]. 2p24 kromozom bandında yerleşim gösteren *MYCN* geni amplifikasyona uğradığında, kromozom dışı kromatin yapılardan oluşan DM (“double minutes”) ve HSR (“homogenously staining regions”) yapıları sıklıkla gözlenmektedir [32-39]. *MYCN* amplikonu 10 kb'la 40.3 Mb arasında değişen bir boyutlarda olabilmekte ve birlikte amplifiye olan komşu genleri içerebilmektedir [40-45]. Oluşan amplikonların içerdikleri genler ve 2p üzerinde farklı kesintili amplikonların bulunma durumları olgular arasında farklılık gösterebilmektedir [46]. Amplikon içinde her zaman yerleşim gösteren ve *MYCN* genini kapsayan 100-200 kb'lık bölgeye komşu genlerin (*DDX1*, *NAG*) biyolojik rolü ve klinik fenotipe etkisi bilinmemektedir [47]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *ALK* genin de bu amplikon içerisinde nadiren yer alabildiği gösterilmiştir. Ancak yaygın görüş farklı amplikonlar şeklinde gözlendiği yönündedir. [20,48,49].

### **2.2.3.DNA Ploidisi**

Diploid ve hiperdiploid DNA içeriği konvansiyonel sitogenetik yöntemlere ek olarak, akış hücre ölçer (“flow cytometry”) kullanılarak saptanmaktadır [50]. Yapılan çalışmalarda DNA içeriği ile tümör evresi arasında birliktelik saptanmış ve yüksek evreli tümörlerin daha çok diploid olduğu gösterilmiştir. Hiperdiploid tümörler tam ya da kısmi gerileme gösterirken, diploid tümörler tedaviye iyi yanıt vermemektedir. Yapılan diğer çalışmalarda bu ilişki doğrulanmıştır [51-56].

Paralel olarak klasik sitogenetik analiziyle yapılan doğrudan kromozom sayımları da NB tümör hücrelerindeki ploidy değişikliklerinin rolüne ilişkin veri sağlamıştır. Buna göre;

near-diploidy, near-triploidy ve near-tetraploidy olmak üzere üç farklı ploidi düzeyi tanımlanmıştır [57,58]. Son yapılan çalışmalarda, tümör DNA içeriği “near-diploid” ( $\approx$ % 45) ve “near-triploid” (hiper-diploid) ( $\approx$ % 55) olarak iki gruba ayrılmıştır. Near-diploid olgular genellikle tutarlı genetik değişiklikleri taşıyıp ve kötü prognoz gösterirken, near-triploid olgularda tutarlı değişiklikler gözlenmez ve hastaların klinik tabloları iyidir [3,9].

#### **2.2.4.Kromozomal ve Allelik Kayıplar**

NB tümörlerinde sıklıkla saptanan ve özellikle tümör baskılayıcı genler (TSG) özelinde tartışılan kromozomal veya allelik kayıplar gözlenmektedir. Sıklıkla delesyona uğrayan bölgeler; 1p, 3p, 4p, 9p, 11q, 14q, 16p, 18q ve 19q kromozom kollarıdır [9,59,60].

##### *1p Kromozom Kolu Delesyonları*

Bir no’lu kromozomun NB genetiğindeki önemi, primer tümörlerde ve NB hücre hatlarında yapılan sitogenetik analizlerle ortaya konmuştur [61]. Diğer sitogenetik çalışmalarda da özellikle 1p delesyonları olmak üzere 1p değişimleri yüksek sıklıkta saptanmıştır. Bir no’lu kromozomun kısa kolunda NB gelişiminde rol oynayan bir ya da fazla sayıda genin bulunduğu düşüncesi böylelikle ağırlık kazanmıştır. 1p delesyonları yalnızca NB tümörlerinde değil, çok sayıda farklı malign hastalıklarında neoplastik hücrelerde gözlenmektedir [62]. Özellikle 1 ve 17 no’lu kromozomların uzun kolları arasında, 17q kazanımına yol açan dengesiz translokasyonun NB hücrelerinde reküran olarak gözlendiğini bilinmektedir [63-65]. NB olgularının % 25-35’inde gözlenen 1p delesyonları; *MYCN* amplifikasyonu ve ileri evreyle birliktelik göstermektedir [66]. 1p kromozom kolunun farklı bölgelerindeki heterozigosite kayıpları (LOH) çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [67-76]. Ayrıca, çeşitli çalışmalar 1p’de bulunan birden fazla lokusun NB tümörlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir [77]. Ancak, 1p kromozom kolunda saptanan heterozigosite kayıplarının klinik anlamı ve prognozla ilişkisi tartışmalıdır [78,79]. 1p bölgesinin en küçük ortak delesyon alanında günümüze kadar yapılan çalışmalarda, bu bölgede yerleşim gösteren ve Knudson “çift vuruş” etki moduyla uyumlu bir TSG henüz bulunamamıştır.

##### *11q Kromozom Kolu Delesyonları*

NB’de sıklıkla gözlenen diğer bir allelik kayıp ya da delesyon bölgesi 11 no’lu kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. 11q delesyonu, *MYCN* amplifikasyonu saptanan

olgularda nadiren gözlenmektedir ve diğer klinik parametrelerden bağımsız prognostik değeri olduğu gösterilmiştir [80,81]. Olguların % 15-20'sinde 11q kromozom kolunun delesyonu gözlenmektedir [14,82]. 11q delesyonu, *MYCN* amplifikasyonu olan olgularda saptanmamakta ve ileri evre (Evre 3/4), ileri yaş (>12 ay) ve kötü histoloji ile çok anlamlı derecede birliktelik göstermektedir [83,84].

### *3p Kromozom Kolu Delesyonları*

NB olgularında TSG olabileceği öngörülen 3p kromozomu üzerinde lokalize bazı genlerin belirlenmesiyle bu bölgedeki delesyonlar önem kazanmıştır. Olguların % 15'inde 3p'nin delesyonu gözlenmektedir. Özellikle *VHL* ve *RASSF1A* genlerindeki delesyonların TSG ile ilişkisinden dolayı NB patogenezinde önemli olabileceği ortaya konmuştur [85-87]. Spitz ve ark. yaptığı çalışmada 3p ve 11q delesyonlarının özellikle *MYCN* tek kopya olgularda yüksek risk NB grubu için önemli birer belirteç olduğu vurgulanmıştır [87].

### *14q Kromozom Kolu Delesyonları*

TSG lokusu olabileceği sıklıkla düşünülen kromozom kollarından biri olan 14q kolundaki LOH sıklığı %20-30 civarındadır. 14q delesyonlarının prognostik anlamı olduğunu ortaya koyan makaleler olmakla birlikte bu ilişki bugün tartışmalıdır. *MYCN* diploid olan olgularda 14q delesyonları görülmektedir [88,89].

## **2.2.5.Kromozomal ve Allelik Kazanımlar**

NB tümörleri ve hücre hatlarında konvensiyonel sitogenetik analizlerde ilk gözlenen genetik anomalilerden birisi kromozom 17'nin uzun kolundaki bölgesel artıştır [90]. *MYCN* geninin bulunduğu 2p kromozom kolundaki artışlar son yıllarda yapılan çalışmalarda dikkat çekmektedir [91]. En sık gözlenen 17q kazanımları dışında, daha az sıklıkla rastlanan 1q, 7p, 11p, 12q kromozom kollarındaki kazanımların prognostik anlamı hala araştırma konusudur [92-94].

### *17q Kromozom Kolu Kazanımları*

17 no'lu kromozomun uzun kolunun birkaç kopya artmasıyla ortaya çıkan 17q kazanımları olguların % 50'den fazlasında gözlenmekte olup, agresif klinik fenotiple ilişkilendirilmiştir. 17q kazanımının bağımsız prognostik değeri olduğu yönünde bulgular

yayınlanmıştır [95]. Bu kromozom kolundaki sayısal kazanım, dengesiz translokasyonlardan kaynaklanmakta ve kırılma noktaları 17q22-qter segmentinde dağılım göstermektedir [96,97]. Sitogenetik düzeydeki çözünürlükte 17 no'lu kromozomun uzun kolundaki kırılma noktaları genellikle 17q11-21 bölgesinde dağılım göstermektedir [65,98,99]. Geçmişte yapılan çalışmalarda iki karşıt görüş yer almaktadır. 17q kazanımlarının kötü prognozla, *MYCN* amplifikasyonu ve 1p delesyonları ile ilişkili olduğunu savunanlar [95,100] ve bu ilişkinin olmadığını savunanlar olarak ikiye ayrılmaktadır [101]. Caren ve ark. yaptığı çalışmada *MYCN* amplifikasyonu ve 11q delesyonu olmayan ancak 17q kazanımı olan olguların, 17q kazanımı olmayan olgulara göre daha kötü prognoz gösterdiği saptanmıştır [102].

### **2.3. *MYCN* Amplifikasyonu ve Replikasyon Zamanlanması**

Gen kopya sayısının veya dozajının ploidi düzeyine oranla çok miktarda artışı durumlara verilen ad gen amplifikasyonudur. Kanser hücrelerinde onkogenlerin amplifikasyon yoluyla aktive olduğu ve bu aktivasyonun gen kopya sayısı artışına bağlı ifade artışından kaynaklandığı bilinmektedir. Genler amplifikasyona uğradığında, mikroskopik düzeyde kromozom dışı kromatin yapılarından oluşan DM (“double minutes”), HSR (“homogenously staining regions”) ve genomda farklı bölgelerde amplikonlar şeklinde gözlenmektedir. DM'ler küçük, küresel, asentromerik ikili kromatin yapılarıdır. HSR ise kromozom içine yerleşmiş gimsa boyamada homojen bant paterni gösteren yapılarıdır. Bu yapılar gen amplifikasyonlarının sitogenetik düzeydeki belirteçleridir. Amplikon; ilgili geni ve bazen proksimal genleri de kapsayacak şekilde sayısal artışa uğrayan genomik segmenttir. Tümördeki amplikonların boyutu birkaç kb'dan onlarca Mb'a kadar olabilmektedir [103].

*MYCN* amplifikasyonu ilk kez NB hücre hatlarında Schwab ve ark. tarafından gösterilmiştir [27]. Nöroblastik tümörlerde amplifiye olan *MYCN* geni kopya sayısı 10 ile 500 kat artış gösterebilmektedir. Amplikonun DNA boyutu ise 100 kb ila 1 Mb hatta daha büyük olabilmektedir [1]. *MYCN* geni amplifiye olurken telomer ve sentromer yönündeki proksimal genler, bu amplikonun içinde amplifiye (“coamplified”) olabilmektedir. Özellikle telomerik yönünde yer alan *NAG* ve *DDX1* genlerinin *MYCN* ile birlikte amplifiye oldukları gösterilmiştir [45,104]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ailesel NB'de tutulum gösteren *ALK* geninin de *MYCN* ile birlikte amplifiye olduğu gösterilmiş ancak bu amplifikasyonların birkaç olgu hariç kesintili amplikonlar şeklinde birkaç parça olduğu saptanmıştır [46].

*MYCN* geni *myc* ailesinden bir onkogendir. Bu aileden *MYCC*; birçok kanser tipinde; meme, kolon glioblastom, Burkitt's lenfomada, *MYCL* küçük hücreli akciğer kanserlerinde gösterilmiştir. *MYCN* proteinin aktif hale gelmesi için bir nükleer fosfoprotein olan *MAX* ile heterodimer oluşturması gerekmektedir. Bu heterodimer hedef gen ekspresyonunu başlatmak için DNA E-box elemanına bağlanır. *MYCN* proteini N-terminal trans aktivasyon domaini (Myc box) ve C-terminal bölgesinde helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH-LZ) motifi bulundurmaktadır. DNA E-box bölgesine bağlanan *MYCN/MAX* heterodimeri miktarı ne kadar fazla ise hedef genin ifadesi de o oranla artış gösterir [105].

DNA amplifikasyonu ile gen dozajının artırılması yoluyla işleyen bir genetik mekanizmadır. Takvime bağlı amplifikasyonlarda (*Drosophila* overinde koryon geni, avian myogenezinde aktin geni) bu mekanizma gelişimsel sürecin bir parçası olarak işlev görmektedir. Memelilerde ise bu takvime bağlı olmayan ve aberasyon olarak nitelenen gen artışları sitotoksik ilaç maruziyetine yanıt olarak ve ya tümöröenez sürecinde gözlenmektedir [106].

Tümör hücrelerinde gözlenen amplifikasyonlar ile ilgili farklı modeller öne sürülmüştür. Kromozom içi amplifikasyonları açıklamaya yönelik model "breakage-fusion-bridge" (BFB) döngüsüdür. Bu model büyük DNA bölgelerinin *in situ* olarak kromozomal rekombinasyon ile amplifiye olduğuna dayanmaktadır. Diğer bir model olan translokasyon-delesyon-amplifikasyon modeli ("episome model" veya "deletion-plus-episome") birçok tümörde gösterilmiştir. Bu model de kromozomdan kopan DNA parçaları halka şeklinde birleşip amplifiye olarak DM'leri oluşturur. Bunlar da kromozoma entegre olarak HSR yapılarını oluşturmaktadır [107,108]. Bu modellerden farklı olarak, *Drosophila* oositlerinde doğal süreçte koryon geni 16-60 kat amplifiye olmaktadır [109]. Bu doğal olgu "onionskin" (soğan zarı) şeklinde replikasyon çatalının iki yönlü açılması ile oluşur ve amplikonlar içe doğru büyürken kenar kısımlarda daha az gen kopya sayısı gözlenir [109].

Replikasyonda DNA üzerindeki transkripsiyonel, gen bakımından zengin ve ökromatin bölgeler pasif olanlara göre "S" fazının erken dönemlerinde replike olmaktadır. Bazı durumlarda replikasyon zamanı aynı bölge/allel için eş zamanlı gözlenmez. Örneğin dişi bireylerde inaktif X ve normal X kromozomu replikasyon zamanı bakımından eş zamanlı değildir [110]. Aynı şekilde nonoallel genlerde de eş zamanlı replikasyon gözlenmez. Replikasyon zamanı mitotik kromozomlardaki bant düzenlenmesi ile de ilişkilidir. GC nükleotid içeriği yüksek olan DNA bölgeleri AT zengin bölgelere göre daha erken replike

olmaktadır [111]. Amplikonların (DM ve HSR) replikasyon zamanı ile ilgili yapılan çalışmalarda, amplikonun yerleştiği nükleer lokalizasyonun zamanlama ile ilgili olduğunu ve gen aktivitesi veya bant düzenlenmesi ile ilişkili olmadığı ortaya konmuştur [110].

#### **2.4. Nöroblastom Histopatolojisi, Evreleme ve Risk Gruplama Sistemi.**

Klasik olarak pNT'lerin alt tipleri; nöroblastom (NB), ganglionöroblastom (GNB) ve ganglionöromdan (GNR) oluşmaktadır. Shimada 1984 yılında, tümörün histopatolojik özelliklerinden yararlanarak bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. Tümörler nöroblast farklılaşması, "Schwannian stroma" içeriği, "Mitoz Karyoreksis İndeksi" (MKI) ve tanı yaşı dikkate alınarak iyi ve kötü histoloji olarak gruplanmıştır. [112]. Sonraki çalışmalarda tümör sınıflandırmaları Shimada sınıflandırmasının modifikasyonu "International Neuroblastoma Pathology Classification System" (INPC) olarak kullanılmıştır [113]. INPC sınıflandırma sistemine göre pNT'lerin dört temel grubu bulunmaktadır. Bunlar;

*a.NB (Schwannian stroma fakir);*

- Differansiye olmayan tip (Andifferansiye)
- Az diferansiye tip
- Differansiye tip (Tablo 1).

*b.GNB, intermiks (Schwannian stroma zengin)*

*c.GNB, nodüler (Schwannian stroma zengin/stroma baskın ve stroma fakir)*

*d.GNR (Schwannian stroma baskın).*

"International Neuroblastoma Staging System" (Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi) (INSS)'ye göre hastalığın sınıflandırılması ilk olarak Brodeur tarafından 1988 yılında yapıldı ve 1993 yılında güncellendi [114,115]. Güncellenmiş haliyle tümörlerin evre sınıfları Tablo 2'de verilen kıstaslara göre yapılmıştır.

**Tablo 1.** Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflaması (INPC) [113].

<b>Shimada Sınıfı</b>	<b>Yaş</b>	<b>Differansiyasyon</b>	<b>MKI</b>
Kötü	<18 ay	Andifferansiye	Herhangi
İyi	<18 ay	Az differansiye veya Differansiye	Düşük (<%2) veya Orta (%2-4)
Kötü	<18 ay	Herhangi	Yüksek (>%4)
Kötü	18 ay-5 yıl	Andifferansiye veya Az differansiye	Herhangi
İyi	18 ay-5 yıl	Differansiye	Düşük (<%2)
Kötü	18 ay-5 yıl	Differansiye	Orta (%2-4) veya Yüksek (>%4)
Kötü	>5 yıl	Herhangi	Herhangi

Yapılan birçok çalışmada olguların risk gruplarının oluşturulmasında birçok biyolojik özellik kullanılmıştır. Bunlar; *MYCN* kopya sayısı, histopatoloji, tümör ploidi, INNS evresi ve hasta tanı yaşıdır. Özellikle tümör ploidi ve *MYCN* kopya sayısı riskin belirlenmesinde etkin rol oynamaktadır. Öte yandan diğer bağımsız prognostik faktörlerden 1p, 11q allelik kayıpları ve TrkA ekspresyonu ve diğerleri için geniş prospektif tedavi ve biyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [3].



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

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

## **2.5.Nöroblastomda Genetik Analiz Yöntemleri**

Yakın zamana kadar NB tümörlerindeki çeşitli genetik belirteçler özellikle “floresans *in situ* hibridizasyon” (FISH) ya da heterozigosite kayıplarını (LOH) gösteren PCR tabanlı yöntemlerle analiz edilebilmekteydi. Bu nedenle genetik parametrelerin geniş ölçekli ve çok değişkenli analizi mümkün olamıyordu. Normal kromozom alanlarına, kontrol ve tümör genomik DNA’sının birlikte hibridizasyonuna dayalı Komparatif Genomik Hibridizasyon (CGH) tekniği, tek bir deneysel basamakta bütün genomik dengesizliklerin 5-10 Mb çözünürlüğünde saptanabilmesini sağlamıştır [116]. Ancak bu çözünürlük genetik düzenlenmelerden kaynaklanan genomik dengesizliklerin kırılma noktalarını, gen düzeyindeki kazanımların ve delesyonların saptanması için yeterli değildir. Bu sınırlılıkların aşılması dizin (“array”) tabanlı CGH veya SNP dizinleri (“SNP array”) kullanılarak, dengesiz kromozom düzenlenmelerini yüksek çözünürlükte saptayabilen sistemler ile sağlanabilmektedir. Ancak bu sistemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, *MYCN* onkogenin kopya sayısı artışının derecesi tümör fenotipiyle ilişkilendirebilmesi büyük önem taşımaktadır.

Ancak, genomik dizi tabanlı CGH teknolojisi yüksek çözünürlükte bölgesel DNA kopya sayısı değişikliklerini göstermesine rağmen, kopya sayısı artışının kesin değerini saptayamamaktadır. Buna farklı bir çözüm olarak; eş-zamanlı nicel PCR ve çoklu ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA) mutlak kopya sayısını ölçen, duyarlı, çözelti ortamında çoklu prob hibridizasyonu yapılabilen ve PCR temelli metodolojik bir yaklaşımdır. MLPA tekniği özgül olarak tümör genomundaki hedeflere bağlanan problemlerin evrensel primer çiftleri kullanarak PCR' la çoğaltılıp kapiller elektroforezinde nicel olarak ölçülmesine dayalı bir yöntemdir [117-119].

Kopya sayısının belirlenmesinde ve kopya sayısı değişikliklerin analizinde kullanılan birçok yöntemin (FISH, kantitatif gerçek zamanlı PCR, southern blot, LOH analizleri gibi) yanında, multipleks PCR mantığında çalışan MLPA birçok avantajı ile sıklıkla kullanılmaktadır. FISH ve LOH çalışmaları uzun zamanda sonuç verirken southern blotta çok fazla DNA'ya ihtiyaç duyulmaktadır. PCR çalışmaları ile çoklu ekzon içeren genlerin hepsinin analizlerinin yapılması teknik açıdan mümkün olsa bile analiz süreleri uzamaktadır. Kantitatif gerçek zamanlı ve multipleks PCR çalışmaları floresans boyaların sayısı ile sınırlıdır. Oligonükleotid ve cDNA mikrodizin sistemleri herhangi bir ekzonun delesyonunu veya duplikasyonunu tekrarlanabilir ve duyarlı bir şekilde saptayamamaktadır [118]. MLPA ise 30'dan fazla hedefte delesyon, amplifikasyon ve duplikasyonları çok az miktarda DNA kalıbı (20 ng) kullanarak aynı anda analiz edebilen duyarlı, hızlı, kantitatif olarak kopya sayısını saptayan bir yöntemdir [118].

NB olgularında genomik dengesizliklerin saptanması ve klinik fenotiple ilişkilendirilmesi, yeni genetik prediktif faktörlerin ve hastalığın risk katmanlarının tanımlanması bakımından önem taşımaktadır. En iyi yöntemsel yaklaşım genom ölçeğinde analiz ile tümörlerdeki tüm genomik dengesizlikleri saptamaktır. MLPA farklı NB serilerinde günümüze kadar anomalileri saptanan lokusların tümünün analizine fırsat tanınması ve kantitatif analiz yapması bakımından avantajlı alternatif bir yöntemdir. MLPA uygulamaları NB hasta tedavi protokollerinin etkin bir biçimde uygulanmasına katkıda bulunma potansiyeli vardır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi**

Bu çalışmanın evreni Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG), Nöroblastom 1999, 2003 ve 2009 Protokolü kapsamında oluşturulan tümör koleksiyonudur. Projemiz, oluşturulan tümör koleksiyonunda ve hücre hatlarında edinsel genetik değişiklikleri saptamaya yönelik tanımlayıcı bir çalışmadır.

#### **3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında Ağustos 2007-Mayıs 2012 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

#### **3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi**

Araştırma evrenini oluşturan örneklem, TPOG, NB 1999, 2003 ve 2009 Protokolü çerçevesinde 43 merkezden birimize gönderilen 500'den fazla tümör dokusu örnekleri içerisinde Nöroblastom (NB), Ganglionöroblastom (GNB) ve Ganglionörom (GNR) tanısı alan toplam 249 adet olgudan oluşmaktadır. Deneysel çalışmalar için Kelly (DSMZ no: ACC355) ve Sima (DSMZ no: ACC164) hücre hatları kullanıldı. Seçme ölçütü olarak; "Homogeneous Staining Region" (HSR) şeklinde (Kelly) ve "Double Minutes" (DM) tipinde (Sima) *MYCN* amplifikasyonu gözlenen hücre hatları seçildi.

#### **3.4. Çalışma Materyali**

Araştırmada tümör dokusu örnekleri ve hücre hatları kullanıldı. Tümör örnekleri Nöroblastom protokolleri çerçevesinde birimize gönderilen ve NB, GNB veya GNR tanısı alan örneklerden, arşivimizde dokusu olan ve DNA izolasyonları gerçekleştirilebilen tümör örneklerinden seçildi. Deneysel çalışmalar için Kelly ve Sima hücre hatları kullanıldı.

#### **3.5. Araştırmanın Değişkenleri**

Çalışmamızda genetik ve klinik parametreler arasındaki ilişki lojistik regresyonla analiz edildi. Buna göre genetik parametreler; MLPA sonuçlarına göre tümör DNA'larında saptanan 1p, 3p, 11q delesyonu, *MYCN* amplifikasyonu ve 17 q kazanımı birinci değişkenler grubunu oluşturmaktadır. Klinik parametrelerden tanı yaşı, tümör evresi ve tümörün histolojik

durumu ise ikinci değişkenler grubunu tanımlamaktadır. Genetik değişkenlerde 1p, 3p ve 11q delesyonlarının varlığı, *MYCN* amplifikasyonunun bulunması ve 17q kazanımı gözlenmesi kendi aralarında bir parametre sabit tutularak diğer genetik parametreler ile ilişkileri de analiz edildi.

Dizin CGH çalışmalarında daha önce MLPA ile saptanan genetik iki değişken; 3p ve 11q delesyonu seçildi. Bu olgularda kırılma noktaları, delesyon genişlikleri ve en küçük ortak delesyon bölgeleri analiz edildi.

2p lokusunda yer alan ve NB tümörlerinde amplifiye olabildiği bilinen *MYCN*, *NAG*, *DDX1* ve *ALK* genlerinin birbirleri arasındaki ilişkiler istatistiksel olarak bu dört değişken ile analiz edildi.

### **3.6. Veri Toplama Araçları**

Verilerin elde edilmesinde tümör dokularında ve/veya hücrelerinde FISH, MLPA, dizin CGH, BrdU girişim analiz yöntemleri kullanıldı.

#### **3.6.1. Floresans *in situ* Hibridizasyonu (FISH) Protokolü**

##### *a. Lamaların Hazırlanması*

1. Hastaların tümör dokusu örnekleri lam üzerinde imprint edildi.
2. 20 dakika -20°C'deki metanolde (Carlo Erba, 412383) lamlar bekletildi.
3. Metanol ve Glasiyal Asetik asit (Merck, K30802856-224) 3:1 carnoy fiksatif karışımında 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Preparatlar -20°C'de saklandı.
4. FISH analizi için önce preparatlar incelenerek hibridize edilebilecek alanlar tarandı. Lamın en iyi alanı olduğuna karar verilen bölgesinin sınırları cam çizir ile belirlendi.

##### *b. Ön Yıkama*

1. 2X SSC (Applichem, 4506,1000,)/% 0.5 NP40 (Applichem, A1694,0250) çözeltisi pH'sı 7.0'a ayarlandı. Su banyosunun sıcaklığı 37°C'ye getirildi.
2. İşaretlenmiş preparatlar hazırlanan şale içinde, ön yıkama için 20 dakika bekletildi.
3. Preparatlar %70, %85 ve absölü (Applichem, A3678,2500) olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış oda ısısındaki etanol çözeltilerinde sırasıyla 2'şer dakika bekletildi.

### *c. Denatürasyon*

1. %70 Formamid (Applichem, A2156,0100) / 2X SSC çözeltisi pH'sı 7-8'e 25 µl derişik HCl (Merck, K37910317-739) ile ayarlandı.
2. Denatürasyon çözeltisinin su banyosunda sıcaklığının 73°C'ye gelmesi sağlandı.
3. Preparatlar 2 dakika denatürasyon solüsyonunda bekletildi.
4. Denatüre edilen preparat, -20°C'de soğutulmuş alkol serilerinde (%70, %85 ve absölü) 2'şer dakika bekletildi.

### *d. Probu Hazırlanması*

1. Steril edilmiş 0.2 ml'lik mikro tüpe her bir hasta preparatı için 5-10 µl MYCN (Kreatech Biotechnology, KI-10706; Q-Biogene, PONCO224; Cytocell, LPS009) probu eklendi.
2. Mikrotüp içindeki prob karışımı, 75°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek denatüre edildi ve prob buz üzerine alındı.

### *e. Hibridizasyon*

1. Lamel (22x22mm) üzerine 10 µl hazırlanan prob eklendi. Bu lamel, soğuk absölü etanolde bekletildikten sonra çıkartılıp kurutulan preparatların işaretlenen bölgesine kapatıldı.
2. Lamel kapatıldıktan sonra kenarları için yapıştırıcı (Fixogum, Marabu 2901 10000) ile kapatıldı.
3. Bir beherin etrafı alüminyum folyoyla kapatılarak içerisine 30-40 ml distile su konuldu. Preparatlar bir taşıyıcı vasıtasıyla içine yerleştirildi.
4. Beher bir gece 37°C'de inkübe edildi.

### *f. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar*

- 1. yıkama

<i>Çözelti İçeriği</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Süre</i>
-1.25 ml 20X SSC (2X SSC)	65°C	5 dakika
-10 µl % 10 SDS		
-48.65 ml dH <sub>2</sub> O		

- 2.yıkama

<i>Çözelti İçeriği</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Süre</i>
-5 ml 10X PBS (1X PBS)	Oda sıcaklığı	5 dakika
-50 µl NP40 (% 0.1 NP40)		
-100 µl Tween 20 (% 0.2)		
-44.85 ml dH <sub>2</sub> O		

- %70 oda sıcaklığındaki etanolde 1 dakika yıkama

#### *g. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Boyama ve Antifade Uygulaması*

1. Hibridizasyon sonrasında preparatlar kurutulup ilgili alana DAPI/ Antifade (Kreatech, LK-096A) solüsyonu konularak lamel ile kapatılarak tüm DNA işaretlendi.
2. 10 µl DAPI lamel üzerine alındı. Lam üzerine kapatıldı. 15 dakika beklemeden sonra preparatlar analiz edildi.

#### *h.Floresans Mikroskopunda Analiz*

1. Preparatlar, floresans mikroskopta (Nikon E600) MacProbe v4.0 (PSI Scientific Systems) programında 100X büyütmede analiz edildi.
2. Analiz 2 ayrı kişinin değerlendirmesiyle en az 200 hücre analizi yapılarak gerçekleştirildi.
3. Nükleusları net olarak ayırt edilebilen hücreler değerlendirmeye alındı. Bir nükleusta 2 *MYCN* (kırmızı) ve 2 Alfasatellit 2 (yeşil) sinyalleri normal olarak değerlendirildi.
4. Hücrelerde haploid genom başına 3-10 kopya sayılı *MYCN* artışı düşük düzeyde gen kopya sayısı artışı, 10-100 kopya sayılı *MYCN* artışı yüksek düzeyde gen amplifikasyonunu, 100'den büyük kopya sayılı *MYCN* artışı çok yüksek düzeyde gen amplifikasyonunu göstermektedir. Sentromerik sinyal ile *MYCN* gen sinyalleri oranlanarak ploidi değişiklikleri ve / veya anöplidiler gösterildi.

### 3.6.2. Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu

Hastaya ait tümör dokusundan ve referans DNA izolasyonları, “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche, 11796828001) kullanılarak yapıldı. “High Pure PCR Template Preparation Kit” ile DNA izolasyonunda kullanılan protokol firmanın önerdiği protokole bazı değişiklikler ile uygulandı.

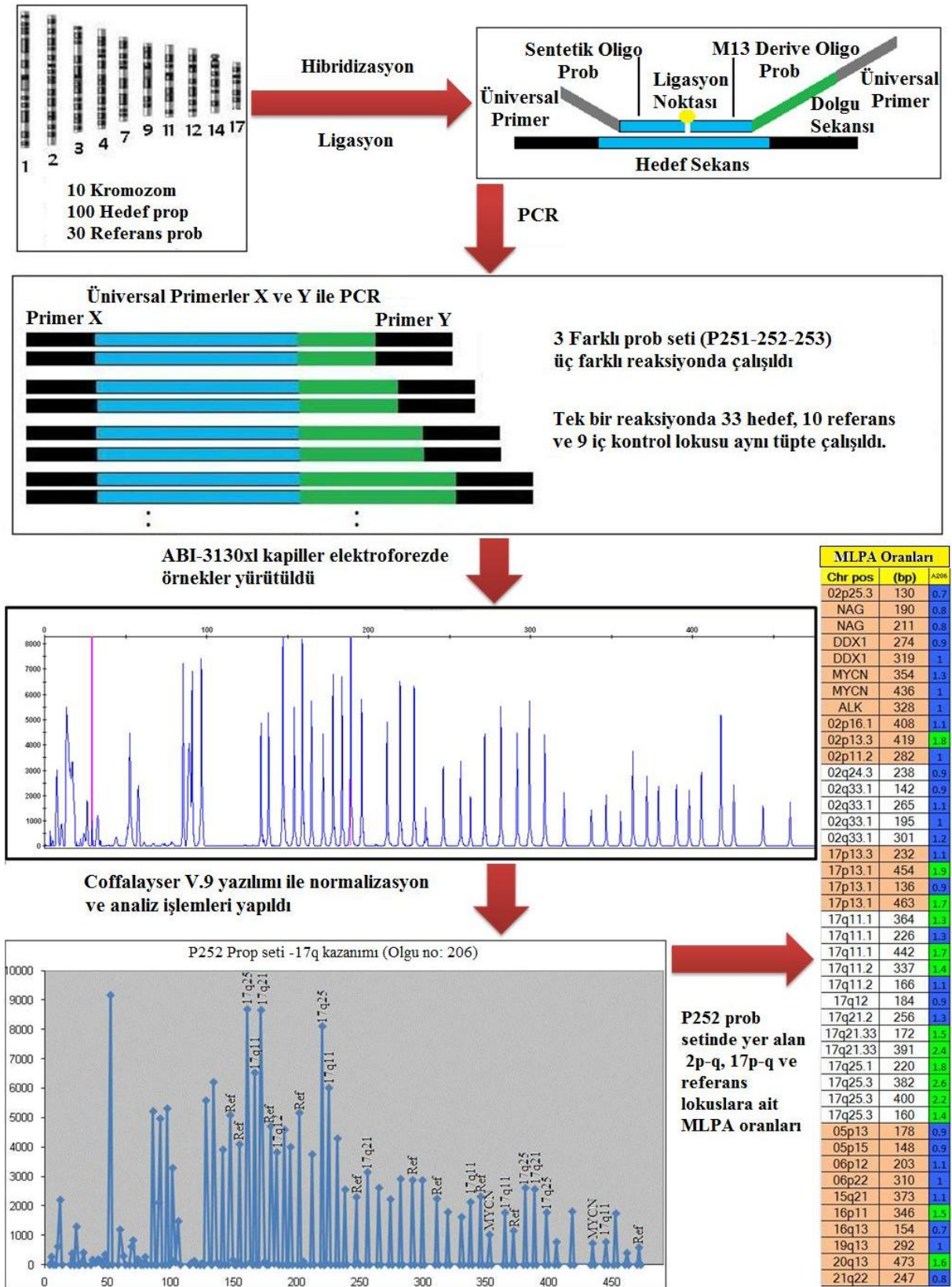
1. Doku miktarı 25-50 mg olacak şekilde tümörden örnek alındı, 1X PBS içerisinde kan ve diğer sıvılar temizlendi. Doku, iki adet bisturi yardımıyla petri kabı içerisinde olabildiğince çok küçük parçalara ayrıldı.
2. Steril mikro tüpe alınan küçük parçalara ayrılmış tümör dokusu üzerine 200 µl doku parçalama tamponu ve 40 µl Proteinaz-K eklenip karıştırıcıda iyice karıştırıldı.
3. Ağzı sıkıca parafilm ile kaplanan tüpler 55°C’de su banyosunda bir saat inkübe edildi.
4. Süre sonunda hala parçalanmayan dokular gözlenirse 20-40 µl yeniden Proteinaz-K eklenip karıştırıcıda iyice karıştırıldı ve 1-2 saat daha 55°C’de inkübe edildi.
5. Mikrotüp içerisine 200 µl “Binding Buffer” eklendi ve 70°C’de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Aynı zamanda elüsyon tamponu 70°C’deki su banyosuna kondu.
6. Oda sıcaklığında bulunan 2-propanol’den (Merck, K36103495-623) 100 µl tüp içerisine eklendi ve iyice karıştırıcıda karıştırıldı.
7. Toplama tüpünün içine filtreli tüp (“collection tube”) yerleştirildi. Örnek filtreli tüpün üst rezervuarına boşaltılarak 1 dakika 8000g’de santrifüj yapıldı.
8. Santrifüj sonrası toplama tüpünden filtreli tüp çıkartıldı ve toplama tüpü atıldı.
9. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne kondu. Filtreli tüpün üst rezervuarına 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklendi ve bir dakika 8000g’de santrifüj yapıldı.
10. Santrifüj sonrası toplama tüpünden filtreli tüp çıkartıldı ve toplama tüpü atıldı.
11. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne kondu. Filtreli tüpün üst rezervuarına 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve bir dakika 8000g’de santrifüj yapıldı.
12. Santrifüj sonrası toplama tüpünden filtreli tüp çıkartıldı ve toplama tüpü atıldı. İkinci kez 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve bir dakika 8000g’de santrifüj yapıldı.
13. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak filtreli tüp 10 saniye maksimum hızda santrifüj yapıldı.
14. Filtreli tüp, steril 1.5 ml’lik mikro tüpe tüpüne yerleştirildi. Tüpün üst rezervuarına 70°C’deki su banyosunda ısıtılmış elüsyon tamponundan 200 µl tüpün ortasından yavaşça eklendi ve 1 dakika 8000g’de santrifüj yapıldı.

15. Mikro-tüpte toplanan DNA spektrofotometrik olarak üçer kez ölçüldü (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Ölçüm sonuçlarında 260/280 oranının 1.75-1.90 değerleri arasında olmasına dikkat edildi. Örnekler -20°C’de saklandı.

### **3.6.3.Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)**

Kullanım alanları yeni yaygınlaşmaya başlayan MLPA metodu özgül olarak tümör genomundaki hedeflere bağlanan problemlerin evrensel primer çiftleri kullanarak PCR’la çoğaltılıp kapiller elektroforezinde nicel olarak ölçülmesine dayalı bir yöntemdir [118,120]. SALSA MLPA P251, 252 ve 253 prob karışımları NB’de tutulum gösterdiği daha önce yapılan çok sayıda araştırmadan bilinen gen ve kromozom bölgesini kapsayan bir delesyon, duplikasyon, amplifikasyon saptama sistemidir. NB’de çeşitli kromozom bölgelerinin dengesizlikleri saptanmakla birlikte, bu bölgelerde yerleşim gösteren çok sayıda genden hangilerinin tümör oluşumunda ve davranışında rol oynadığı bilinmemektedir. MLPA analizinde kullanılacak prob sistemi ilgili bölgelerde yerleşim gösteren çok sayıda aday geni içeren yeni bir metodolojik yaklaşımdır (Tablo 3, Şekil 1).





Şekil 1. MLPA metodolojisinin grafiksel gösterimi.

**Tablo 3.** MLPA çalışmalarında kullanılan prob setlerin içeriğinde yer alan genler, buldukları lokuslar ve PCR sonrası baz çifti uzunlukları.

Prop Setleri								
P251-B1			P252-B1			P253-B1		
Gen	Lokus	bp	Gen	Lokus	bp	Gen	Lokus	bp
<i>GABRD</i>	1p36.33	166	<i>TMEM18</i>	2p25.3	130	<i>SPON2</i>	4p16.3	130
<i>TP73</i>	1p36.32	328	<i>NAG</i>	2p24.3	190	<i>WFS1</i>	4p16.1	229
<i>CHD5</i>	1p36.31	490	<i>NAG</i>	2p24.3	211	<i>KCNIP4</i>	4p15.31	257
<i>PARK7</i>	1p36.23	436	<i>DDX1</i>	2p24.3	274	<i>OCIAD1</i>	4p11	363
<i>KIF1B</i>	1p36.22	219	<i>DDX1</i>	2p24.3	319	<i>GNRHR</i>	4q13.2	196
<i>PTAFR</i>	1p35.3	355	<i>MYCN</i>	2p24.3	354	<i>IL2</i>	4q27	445
<i>PPAP2B</i>	1p32.2	160	<i>MYCN</i>	2p24.3	436	<i>GLRB</i>	4q32.1	329
<i>NTNG1</i>	1p13.3	463	<i>ALK</i>	2p23.2	328	<i>KLKB1</i>	4q35.2	382
<i>PDE4DIP</i>	1q21.1	130	<i>RTN4</i>	2p16.1	408	<i>GHRHR</i>	7p15.1	419
<i>LHX4</i>	1q25.2	274	<i>DYSF</i>	2p13.3	419	<i>EGFR</i>	7p11.2	301
<i>LIN9</i>	1q42.12	319	<i>RPIA</i>	2p11.2	282	<i>ELN</i>	7q11.23	355
<i>AKT3</i>	1q44	382	<i>SCN1A</i>	2q24.3	238	<i>KRIT1</i>	7q21.2	400
<i>VHL</i>	3p25.3	418	<i>CFLAR</i>	2q33.1	142	<i>IMPDH1</i>	7q32.1	190
<i>TGFBR2</i>	3p24.1	196	<i>CASP8</i>	2q33.1	265	<i>SHH</i>	7q36.3	136
<i>CTNNA1</i>	3p22.1	454	<i>BMPR2</i>	2q33.1	195	<i>PTPRD</i>	9p24.1	172
<i>SEMA3B</i>	3p21.31	364	<i>BMPR2</i>	2q33.1	301	<i>PTPRD</i>	9p24.1	463
<i>RASSF1</i>	3p21.3	400	<i>PAFAH1B1</i>	17p13.3	232	<i>CDKN2A</i>	9p21.3	274
<i>ZMYND10</i>	3p21.3	445	<i>TP53</i>	17p13.1	454	<i>CDKN2A</i>	9p21.3	266
<i>ROBO2</i>	3p12.3	283	<i>TP53</i>	17p13.1	136	<i>DNAI1</i>	9p13.3	454
<i>CASR</i>	3q21.1	481	<i>TP53</i>	17p13.1	463	<i>TJP2</i>	9q21.11	211
<i>ZIC1</i>	3q24	392	<i>WSB1</i>	17q11.1	364	<i>TGFBR1</i>	9q22.33	409
<i>PIK3CA</i>	3q26.3	211	<i>WSB1</i>	17q11.1	226	<i>POMT1</i>	9q34.13	436
<i>ST5</i>	11p15.4	142	<i>WSB1</i>	17q11.1	442	<i>TSC1</i>	9q34.2	427
<i>ABCC8</i>	11p15.1	256	<i>NF1</i>	17q11.2	337	<i>ERC1</i>	12p13.33	283
<i>CD44</i>	11p13	265	<i>NF1</i>	17q11.2	166	<i>CDKN1B</i>	12p13.1	320
<i>PTPRJ</i>	11p11.2	190	<i>ERBB2</i>	17q12	184	<i>PKP2</i>	12p11.1	142
<i>GSTP1</i>	11q13	172	<i>TOP2A</i>	17q21.2	256	<i>COL2A1</i>	12q13.11	220
<i>CNTN5</i>	11q22.1	301	<i>SGCA</i>	17q21.33	172	<i>MDM2</i>	12q15	337
<i>CASP1</i>	11q22.3	184	<i>TOB1</i>	17q21.33	391	<i>TBX5</i>	12q24.21	184
<i>ATM</i>	11q22.3	337	<i>RECQL5</i>	17q25.1	220	<i>NFKBIA</i>	14q13.2	240
<i>CADM1</i>	11q23.2	238	<i>BIRC5</i>	17q25.3	382	<i>SPG3A</i>	14q22.1	166
<i>MLL</i>	11q23.3	427	<i>SECTM1</i>	17q25.3	400	<i>TGFB3</i>	14q24.3	160
<i>HMBS</i>	11q23.3	136	<i>TBCD</i>	17q25.3	160	<i>MOAPI</i>	14q32.12	391
<i>THY1</i>	11q23.3	409						

## MLPA Protokolü

### *Birinci Gün*

1. Stok DNA, son konsantrasyonu 40 ng/µl olacak şekilde steril su ile seyreltildi.
2. 0.2 ml'lik tüplere örnek ve prop karışımı (251, 252, 253) numaralarını yazıldı.
3. Toplam DNA miktarı 5 µl (200 ng son konsantrasyon) seyreltilmiş şekilde 0.2 µl'lik PCR tüpüne eklendi.
4. DNA'nın tüp dibine inmesi için santrifüjde kısa süreli çevirme işlemi yapıldı.
5. Tüpler Termal Döngü cihazına yüklendi ve 15 dakika 98°C'de inkübe edildi.
6. Prop karışımı ve MLPA tamponunu -20°C'den çıkartıldı. Çözüldükten sonra vorteks karıştırıcıda karıştırıldı.
7. Her bir reaksiyon için aşağıdaki bileşenler kullanılarak karışım hazırlandı. Her bir 20 örneklik çalışma için bir adet fazladan karışım hazırlandı.
  - a. 1.5 µl MLPA tamponu
  - b. 1.5 µl Prop karışımı
8. Termal döngü cihazı 25°C'ye geldiğinde, yedinci basamakta hazırlanan karışımı 3 µl olacak şekilde tüm tüplere dağıtıldı. Tüp içeriği birkaç kez pipetle çekilip bırakılarak homojen bir şekilde karışması sağlandı.
9. Termal döngü cihazında hibridizasyon programına devam edildi. Örnekler, 1 dakika 95°C'de, sonrasında 60°C'de 16 saat inkübe edildi.

### *İkinci Gün*

10. Ligase-65 Buffer A ve Ligase-65 Buffer B çözeltileri -20°C'den çıkartıldı. Çözüldükten sonra kısaca karıştırıcıda karıştırıldı ve buz üzerine alındı.
11. Her bir reaksiyon için ligaz tamponu aşağıda verilen miktarlarda hazırlandı;
  - a. 3.0 µl Ligase-65 Buffer A
  - b. 3.0 µl Ligase-65 Buffer B
  - c. 25.0 µl dH<sub>2</sub>O
  - d. 1.0 µl Ligase-65İyice karıştırıcıda karıştırıldı ve buza gömüldü.

**\*Not1:** Bu aşamada 16. basamağa atlayarak 19. basamağa kadar olan işlemleri yapıp PCR tüplerini +4°C' ye kaldırıldı.

**\*Not2:** İkinci olarak 23. basamaktaki PCR karışım içeriğini hazırlanıp buz üzerinde bekletildi. Taq polimerazı ilgili basamağa gelince karışıma ilave edildi ve iyice pipetaj yapıldı.

12. Termal döngü cihazında Ligasyon programı seçildi, 54°C'de bekleme pozisyonunda beklemeye bırakıldı.
13. Örnekler 54°C'deyken termal döngü cihazından çıkarılmadan 32.0 µl ligaz tampon karışımını her reaksiyon tüpüne ilave edildi ve tüp içeriği birkaç kez çekilip bırakılarak karışması sağlandı.
14. Termal döngü cihazında programa kaldığı yerden devam edildi. On beş dakika 54°C'de; 5 dakika 98°C'de bekletip, süre sonunda 4°C'de beklemeye alındı.
15. Ligasyon ürünleri 4°C'de bir-iki hafta saklanabilmektedir. Eğer uzun süre bekletilecekse, -20°C'de dondurarak saklanmalıdır.

*PCR Reaksiyonunun Kurulması*

16. PCR işlemleri için, PCR tamponu, SALSA PCR-primerleri ve SALSA enzim seyreltme tamponunu -20°C'den çıkartıldı. Çözüldükten sonra kısaca karıştırıcıda karıştırıldı ve buza gömüldü.
17. Yeni bir PCR tüpüne ligasyon tüpündeki kodları ve prob karışım numarasını yazıldı.
18. Her bir reaksiyon için PCR tampon karışımını hazırlandı ve pipetle iyice karıştırıldı. Yirmi örneklilik bir çalışma için bir adet ilave karışım hazırlandı.
  - a. 4.0 µl SALSA PCR Buffer
  - b. 26.0 µl dH<sub>2</sub>O
19. 30 µl PCR tampon karışımını her yeni tüpe dağıtıldı ve pipetle iyice karıştırıldı.
20. 10 µl ligasyon ürününden PCR tampon karışımı konan tüplere aktarıldı.
21. Ligasyon karışımının tüp dibine çökmesi için santrifüj ile kısa bir tur yapıldı.
22. Tüpler Termal Döngü cihazına yerleştirildi.
23. Buz içinde her bir reaksiyon için PCR karışımı hazırlandı ve iyice pipetle karıştırıldı. Yirmi örneklilik çalışma için bir adet ilave karışım hazırlandı.
  - a. 2.0 µl SALSA primerleri
  - b. 2.0 µl SALSA enzim dilüsyon tamponu
  - c. 5.5 µl dH<sub>2</sub>O
  - d. 0.5 µl SALSA Polimeraz
24. Termal döngü cihazında uygun PCR döngü programı seçildi.

25. Her bir reaksiyona 10 µl PCR karışımı tüpler termal döngü cihazında ve döngü cihazının ısı tablası 60°C'deyken eklendi (Bu aşamada termal döngü cihazının programı "Pause" modu ile durdurulabilir). Pipetle içerik en az 5 kez karıştırıldı.
26. Termal döngü cihazında programa devam edildi. (35 döngü olacak şekilde; 1 döngü [95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 60 saniye], son uzama 72°C'de 20 dakika, sonlandırma 4°C'de bekleme).
27. Süre sonunda ürünler karanlıkta ve -20°C'de saklandı.

#### *Termal profiller*

##### *A) Hibridizasyon Reaksiyonu*

- 98°C'de 5 dakika,
- 25°C'de bekletilir (Prop karışımını eklemek için),
- 95°C'de 1 dakika,
- 60°C'de 16 saat hibridizasyon.

##### *B) Ligasyon Reaksiyonu*

- 54°C'de bekletilir (Ligasyon tamponu bu sıcaklıkta eklenir),
- 54°C'de 15 dakika,
- 98°C'de 5 dakika,
- 4°C'de bekletilir (Saklama sıcaklığı).

##### *C) PCR Reaksiyonu*

- 60°C'de bekletilir (Reaksiyona PCR karışımını ekleme işlemi için),
  - 95°C'de 30 saniye (Denatürasyon)
  - 60°C'de 30 saniye (Primer Bağlanma)
  - 72°C'de 60 saniye (Uzama)
  - 72°C'de 20 dakika (Son uzama)
  - 4°C'de bekletilir (Saklama sıcaklığı).
- } 35 Döngü

#### *Örneklerin Elektroforezde Yürütülmesi ve Analizi*

Örnekler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, BİYOMER'de bulunan "ABI-Prism 3130XL 16 capillaries Genetic Analyzer" (Applied Biosystems) cihazında yürütüldü. Cihazda yürütülürken 36 cm kapiller ve POP-7 (Applied Biosystems, 4352759) polimeri kullanıldı. Örnekler referans boyut standardı olarak ROX500 (Applied Biosystems, 401734) ile birlikte yürütüldü. ROX500 standarttan her bir örnek için 0.3 µl, 9.0 µl deiyonize Formamid (Applied

Biosystems, 4311320) içerisine MLPA-PCR ürününden 1.0 µl mikro tüplere eklendi. Karışım termal döngü cihazında 2 dakika 80°C’de, 5 dakika 4°C’de bekletildi. Örnekler süre sonunda cihaza yüklenerek elektroforez yapıldı. MLPA-PCR reaksiyonunda FAM işaretli primer ve standart için ROX500 kullanıldığından elektroforez sırasında iki farklı eğri rengi (flourokrom işaretine göre FAM; mavi ve ROX500 kırmızı) oluştu. GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) yazılımı kullanılarak verilerin ön değerlendirmeleri yapıldı. Sonuçlar “txt” formatında sistemden alındı. Referans olarak çalışılan örnekler ayrı bir dosya olarak sistemden alındı.

Yürütülen örneklerin analizi “Coffalyzer MLPA-DAT software v.9” (MRC Holland) ile yapıldı. GeneMapper programından “txt” formatında alınan dosyalar Coffalyzer yazılımında “Import GENEMAPPER TXT FILE (multiple runs)” kısmından yazılıma yüklendi. Yazılımın “Data Filtering” kısmından referans reaksiyonları dosyaları referans kısmına, tümör örnekleri ise olgular kısmına yüklendi ve “Filter with default binset (P)” sekmesi seçilerek eğri değerlerinin prob karışımı içerisinde yer alan beklenen eğri değerlerine göre analizi yapıldı. Çıkan sayfada kontrol ve çalışılan prob setlerinin sayılarının tam olması, ligasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, olguların cinsiyetleri ve DNA Denatürasyon (DD) eğrilerinin varlığı kontrol edildi. Çalışılan olguların iç kontrollerinde herhangi bir sorun yoksa, yazılımın “Data analysis” sekmesinden “Control Probe Analysis (LMS)” seçilerek verilerin analizi yapıldı. Bu tip analizlerde (Control Probe Analysis, LMS) Coffalyzer programı, referans örneği içerisindeki hedef gen probu ile kontrol lokus probun oranını 3 ayrı referans DNA için hesaplar ve ortalamasını alır. Aynı şekilde her bir hasta örneğinin kendi içindeki hedef gen probu ile kontrol probunu oranlamaktadır.

MLPA oranı hastanın değerinin referans değerine bölümü ile hesaplanmaktadır. Ambros ve grubunun çalışmasına göre kıstaslar belirlenmiştir [121]. Buna göre;

- I. Aynı kromozom kolunda ardışık iki probda aberasyon varsa bu bölgedeki aberasyon tutarlı olarak kabul edilerek değerlendirmeye alınır.
- II. MLPA oranı değer aralıkları;
  - a. Normal; 0.75-1.25
  - b. Delesyon; 0.00-0.74 (0.70-0.74 arası borderline).
  - c. Kazanım; 1.26-3.00 (1.26-1.30 arası borderline).
  - d. Amplifikasyon; 3.01 ve üzeri (sadece *MYCN* geni için).
- III. Segmental kromozom kolu artışları (SCA) için 1. kural geçerlidir.

### **3.6.4. Double Minutes (DM) İçeren Hücre Dizisinde DM'lerin Replikasyon Zamanının Saptanması.**

#### **3.6.4.1. Hücrelerin Hazırlanması**

Deneylerde Kelly (HSR tip *MYCN* amplifikasyonu gözlenmektedir) ve SiMa (DM tip *MYCN* amplifikasyonu gözlenmektedir) nöroblastom hücre hatları kullanıldı. Hücreler % 20 FBS (Biochrom, S0613), % 1 L-glutamin (Biochrom, K0282) ve % 1 Penisillin-streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B) içecek şekilde RPMI 1640 (Biochrom, FG1235) ortamında kültür edildi. Deneyin uygulanabilmesi için ekilen hücrelerin flaskın % 60'ını kaplaması beklendi.

#### **3.6.4.2. zeltilerin Hazırlanması**

##### *BrdU hazırlanması ve Konsantrasyon Hesabı*

Hassas terazide 100 mg BrdU (Applichem, A2139,0001) tartıldı. zerine 10 mL PBS (Biochrom, L1825) eklenerek 37°C' de 20 dakika znmeye bırakıldı. zelti 10 mg/mL ve 500 mL olacak şekilde ayrılıp -20°C' de saklandı. Hücre ortamı içerisine mililitre başına 30 µM BrdU eklendi. Hazırladığımız zelti 33 µM olup, 4.5 mL hücre ortamı için 4.1 µL BrdU 10 mg/mL olan stok BrdU zeltisinden alınarak flaska eklendi.

##### *PBS-T % 0.05 Tween 20*

500 mL PBS içerisine 2.5 mL Tween 20 (Applichem, A4974,0500) eklenerek manyetik karıştırıcıda 1 saat düşük devirde karıştırıldı. Tween 20 tamamen zndkten sonra zelti +4°C' de saklandı.

##### *PBS-T % 0.05 Tween 20 + % 1 BSA hazırlanması*

100 mL PBS içerisine 1 g BSA (Applichem, A1391,0050) tartılıp ilave edildi. zerine 0.5 mL Tween 20 eklenerek manyetik karıştırıcıda 1 saat düşük devirde karıştırıldı. BSA tamamen zndkten sonra zelti +4°C' de saklandı.

#### *2N HCl Hazırlanması*

% 37'lik Derişik 11.13 N HCl (Merck, K37910317-739)'den HCl'den 17.4 mL alındı. 100 mL için 82.6 mL dH<sub>2</sub>O üzerine yavaş yavaş HCl ilave edilerek 2N HCl hazırlandı.

#### *Carnoy's Fiksatifinin Hazırlanması*

Fiksatif her deneyin ilgili aşamasında taze olarak hazırlandı. Metanol (Carlo Erba, 412383) ve Glasiyel Asetik asit (Merck, K30802856-224) 3:1 oranında olacak şekilde hazırlandı.

#### *Primer ve Sekonder Antikor Hazırlığı*

Monoklonal Fare Anti-BrdU primer antikor (Dako M0744, Lot no: 36508) kullanıldı. Antikor miktarı % 1 BSA içeren PBS-T çözeltisinde 1:250-500 aralığında hazırlandı. Sekonder antikor olarak Poliklonal Tavşan Anti Fare Ig/FITC (yeşil) floresans işareti antikor (Dako, F0261, Lot no: 38149) kullanıldı. Antikor miktarı % 1 BSA içeren PBS-T çözeltisinde 1:500-1000 aralığında hazırlandı.

### **3.6.4.3. Deney Aşamaları**

#### *Hücrelerin Ekilmesi:*

Flaskın % 60'mı kaplayacak şekilde ekim yapılmalıdır. Ortama  $5 \times 10^5$  hücre sabahtan ekildi.

#### *BrdU Eklenmesi:*

24 saat sonra flasklardaki ortam miktarına göre stok BrdU'dan 4.5 mL ortam için mL'de 30  $\mu$ M olacak şekilde 4.1  $\mu$ L eklendi. Deney koşullarındaki süreye göre 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

#### *BrdU Uzaklaştırılması:*

Flaskın içerisindeki ortam steril bir tüpe alındı. Flask önceden 37°C'ye getirilmiş 4 mL ortam ile yıkandı ve sıvı aynı tüpe alındı. Tüp 600 g' de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz çekilip atıldı. Pelletin üzerine önceden 37°C'de ısıtılmış 8 mL Hank's tuz çözeltisi (Biochrom,



L2055) ile tekrar yıkama yapıp aynı değerlerde santrifüjde çöktürölüp üst faz atıldı. Dipte kalan pellet üzerine 4.5 mL ortam ilave edilerek etüve kaldırıldı.

#### *Metefaz Elde Edilmesi:*

Hücrelere aynı günün akşamı mL'de 1 µL olacak şekilde kolsemid (Biological Industries, 12-003-1C) ilavesi yapılarak bir gece (ortalama 16 saat) inkübe edildi. Ertesi gün flastaki ortam çekilerek bir tüpe alındı. 600 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Önceden 37°C'de ısıtılmış hipotonik çözeltiden (0.075 M KCl; Biological Industries, 12-005-1B) 8 mL alınarak pellet üzerine konuldu. Tüp içeriği flaska boşaltılarak 30 dakika etüvde inkübe edildi. Süre sonunda kazıyıcı ile hücreler kaldırılarak tüpe alındı ve üzerine bir damla Carnoy's fiksatif damlatıldı. 600 g'de 7 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Dipte kalan hücreler ilk seferde vorteks üzerinde damla damla olacak şekilde konulmak şartıyla 4-5 kez Carnoy's fiksatif ile yıkandı. Santrifüj işlemi 1200 rpm'de 10 dakika olarak yapıldı. Hücreler son fiksatifte bırakıldı ve alüminyum folyoya sarılarak -20°C'de saklandı.

#### *Hücrelerin Lama Damlatılması:*

Son fiksatifte bekleyen hücreler temiz bir lama birbirlerinin üzerine gelmeyecek ve Metefaz plakları açılacak şekilde damlatıldı ve karanlık ortamda kurumaya bırakıldı.

#### *2N HCl İnkübasyonu:*

Lamlar üzerine tüm lam yüzeyini kaplayacak şekilde 2N HCl konularak 30°C'de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda HCl dökülerek PBS-T ile kaplanan lam 3 dakika bekletildi.

#### *Bloklama:*

Yıkama çözeltisi döküldükten sonra % 1 BSA/PBS-T tüm lamı kaplayacak şekilde preparata eklendi 30°C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda dökülerek direkt antikor işlemine geçildi.

#### *Primer Antikor:*

Preparat üzerini kaplayacak şekilde 125-150 µL olarak hazırlanan primer antikor eklendi. Preparat 24x50 lamel ile kapatılarak 30°C'de 1 saat karanlıkta inkübe edildi. Süre

sonunda antikor dökülerek PBS-T ile kaplanan lam 3 dakika bekletildi. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.

#### *Sekonder Antikor:*

Preparat üzerini kaplayacak şekilde 125-150 µL olarak hazırlanan sekonder antikor eklendi. Preparat 24x50 lamel ile kapatılarak 30°C’de 1 saat karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda antikor dökülerek PBS-T ile kaplanan lam 3 dakika bekletildi. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.

#### *DAPI/Antifade Boyama:*

DM’lerin görünür hale getirilebilmesi için DNA’yı boyayan ve floresans veren DAPI/Antifade (Kreatech, LK-096A) kullanıldı. Lamel üzerine 10 µL DAPI eklenerek preparat kapatıldı ve karanlık ortamda +4°C ‘de saklandı.

#### *Analiz:*

Nikon Eclipse E600 floresans mikroskopta, DAPI, FITC, triple-band (DAPI/FITC/Rhodamine) filtre setleri kullanılarak gerçekleştirildi. Monokrom CDD kamera ile çekilen görüntüler bilgisayara aktarıldı. Görüntülerin dijital olarak işlenmesi MacProbe yazılımı (PSI Scientific Systems) ile gerçekleştirildi.

### **3.6.5. Dizin CGH (Array CGH; aCGH)**

Dizin CGH çalışmaları “Roche Nimblegen Human CGH 3x720 K Whole-Genome Exon-Focused Array” çipi kullanılarak yapıldı\*. Çalışmada aCGH yapılacak örnekler MLPA sonuçlarına göre 11q ve 3p delesyonu bilinen ve MYCN amplifikasyonu olmayan olgular arasından en ortak küçük delesyon noktalarının tanımlanması ve diğer ilave tutarlı anomalilerin saptanması amacıyla seçildi (Tablo 4).

---

\*aCGH deneyleri “Genmar” laboratuvarında servis sağlayıcı firma elemanlarının refakatinde yapıldı.

### 3.6.5.1. DNA Ölçümleri ve DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi

Seçilen hasta grubuna ait DNA'lar 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra spektrofotometrik olarak üç kez ölçülerek konsantrasyonların ortalamaları alındı (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Seçilen olguların DNA kalitelerinin iyi olmasına dikkat edildi. Buna göre 100 ng/μl ve üstü DNA konsantrasyonu olan, saflığı  $\geq 1.80-1.90$  aralığında ve 260/230 oranı  $\geq 1.90$  olan olgular seçildi.

**Tablo 4.** Dizin CGH yapılan olguların MLPA sonuçları (3p,11q ve 2p için) ve klinik verileri.

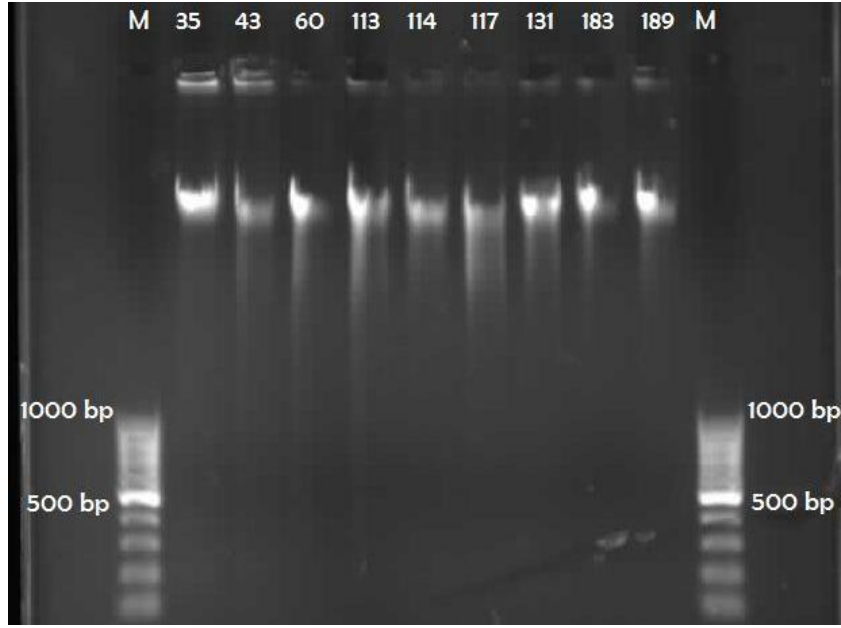
<b>Olgu kodu</b>	<b>3p</b>	<b>11q</b>	<b>MYCN</b>	<b>Yaş ay</b>	<b>Evre</b>	<b>Tanı</b>	<b>Histoloji</b>	<b>Son durum</b>
<b>35</b>	Del	Del	Amp yok	61,5	4	NB	Kötü	Hastalıksız
<b>43</b>	Del	Del	Amp yok	11	4	NB	Yok	Hasta
<b>60</b>	Del	Del	Amp yok	2,5	1	NB	İyi	Hastalıksız
<b>113</b>	Del	Del	Amp yok	99	4	NB	Kötü	Hastalıksız
<b>114</b>	Del	Del	Amp yok	86	4	NB	Kötü	Hasta
<b>117</b>	Del	Del	Amp yok	13	4	NB	Yok	Öldü
<b>131</b>	Del	Del	Amp yok	24	1	NB	Kötü	Hastalıksız
<b>183</b>	Del	Del	Amp yok	42	3	NB	Kötü	Hasta
<b>189</b>	Del	Del	Amp yok	33	4	NB	?	?

**Tablo 5.** Dizin CGH yapılan olguların ana ve ara stok DNA ölçümleri ve saflıkları.

<b>Olgu kodu</b>	<b>Stok DNA (ng/ul)</b>	<b>Ara stok (ng/ul)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>35</b>	472,1	135	1,91	1,94
<b>43</b>	203,8	108	1,92	1,64
<b>60</b>	86,27	86,27	1,91	2,09
<b>113</b>	416,13	165	1,90	2,16
<b>114</b>	383,51	101	1,83	2,06
<b>117</b>	295,7	103	1,90	2,19
<b>131</b>	407,13	147	1,90	2,28
<b>183</b>	105,4	105	1,88	2,12
<b>189</b>	112,55	112	1,83	2,02

Örneklerdeki ana stok DNA konsantrasyonları 100 ng/μl olacak şekilde ara stok hazırlandı. Hazırlanan ara stoklar 1 gece +4°C’de bekletilip 3 saat 37°C’de inkübasyondan sonra ölçüm yapıldı (Tablo 5).

Ara stok olarak hazırlanan DNA örnekleri % 0.8 agaroz jelde 1 saat 30A-80V akımla 0.5X TBE içerisinde yürütüldü. Tüm DNA örneklerinin intakt olduğu gözlemlendi (Şekil 2).



**Şekil 2.** Dizin CGH yapılan olguların % 0.8’lik agaroz jel görüntüsü.

### 3.6.5.2. Örneklerin işaretlenmesi

Referans olarak hazır referans DNA kullanıldı. Erkek bireyler için erkek referans, dişi bireyler için dişi referans kullanıldı. Deney basamakları “NimbleGen Arrays User’s Guide: CGH and CNV Arrays 8.0v” takip edilerek yapıldı. İlk aşamada kullanılacak olan dNTP, Cy işaretli primerler ve durdurma tamponu çözüldü. Test örnekleri Cy3, referans örnekleri Cy5 ile işaretlendi. İşlem basamakları;

1. Random Primerden 2.2 μl alınarak 4.0 μl betamerkaptoetanol ile karıştırıldı.
2. Cy3 ve Cy5 random nanomerler çözülerek karıştırıldı. Primerler 1050 μl random primer tamponu ile seyreltildi. 40 μl olacak şekilde alikotlandı.
3. Test ve referans örnekler için 0.2 μl PCR tüpleri hazırlandı. PCR içerikleri;

<b>Komponent</b>	<b>Test örneği</b>	<b>Referans örneği</b>
<i>gDNA</i>	0.5 µg	0.5 µg
<i>Cy3 Random Nanomer</i>	40.0 µl	-
<i>Cy5 Random Nanomer</i>	-	40.0 µl
<i>LHC-1*</i>	2.0 µl	-
<i>LHC-2*</i>	-	2.0 µl
<i>PCR için su</i>	80.0 µl'ye tamamlanacak	

(\* LHC=Labeling and Hybridization Control)

4. Örnekler 98°C'de 10 dakika denatüre edildi. Süre sonunda hemen sulu buz çözeltisine alındı.
5. 10 mM'lik dNTP karışımından 10.0 µl, Klenow fragmentinden 2.0 µl ve 20.0 µl son hacim olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ilave edilerek master mix hazırlandı.
6. dNTP/Klenow karışımından 20.0 µl örneklere ilave edildi.
7. İyice en az on kez olacak şekilde pipetle karıştırıldı.
8. Tüp içeriği kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü.
9. 2 saat 37°C'de termal blokta ışıktan korunarak ve termal döngü cihazının kapağı kapalı olarak inkübe edildi.
10. Süre sonunda 21.5 µl durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
11. İçerik vortekslenip kısa süre santrifüj edildikten sonra içerisinde 110.0 µl isopropanol bulunan 1.5 ml'lik mikro tüplere alındı.
12. İyice vortekslenen içerik 10 dakika 15-25°C'de ışıktan korunarak inkübe edildi.
13. 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet Cy3 için pembe, Cy5 için mavi renk gözlendi.
14. Üst faz atılıp, pellet üzerine 500 µl% 80'lik soğuk etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
15. 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve üst faz döküldü.
16. Pellet vakumlu kurutucuda 5-10 dakika kurutuldu.
17. Örnekler bu aşamada -20°C'de bir ay saklanabilmektedir.
18. Örneklere 35.0 µl dH<sub>2</sub>O ilave edilerek çözüldü.
19. İçerik 30 saniye vortekslenerek kısa süreli santrifüj yapıldı. Beş dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklere ikinci kez aynı işlem tekrarlandı.

20. DNA miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).
21. Her bir örnekten 31.0 µg test ve 31.0 µg referans DNA alındı.
22. Örnekler vakumlu kurutucuda karanlıkta kurutuldu.
23. Örnekler bu aşamada -20°C’de bir aydan fazla saklanabilmektedir.

### **3.6.5.3. Hibridizasyon ve Yıkamalar**

#### *Örnek Hazırlığı ve Yükleme*

1. Hibridizasyon fırını en az üç saat önceden 42°C’ye getirilmelidir.
2. Kurutulan örnekler çözme tamponunda çözüldü. Her bir örnek için 5.6 µl çözme tamponu kullanıldı.
3. İyice vortekslenerek kısa süreli santrifüj yapıldı.
4. Hibridizasyon tamponu için;
  - a. 35.0 µl 2X hibridizasyon tamponu
  - b. 14.0 µl Hibridizasyon reaktifi A
  - c. 1.0 µl Aligment oligo kullanıldı.
5. 14.4 µl hibridizasyon tamponu ile çözme tamponu ile çözülen 5.6 µl örnekler karıştırıldı.
6. 15 saniye iyice vortekslenen içerik kısa süreli santrifüj işleminden sonra 95°C’de 5 dakika ışıktan korunarak inkübe edildi.
7. Süre sonunda 42°C’de 5 dakika bekletilen örnekler kısa bir santrifüj işleminden sonra array platformuna yüklendi.

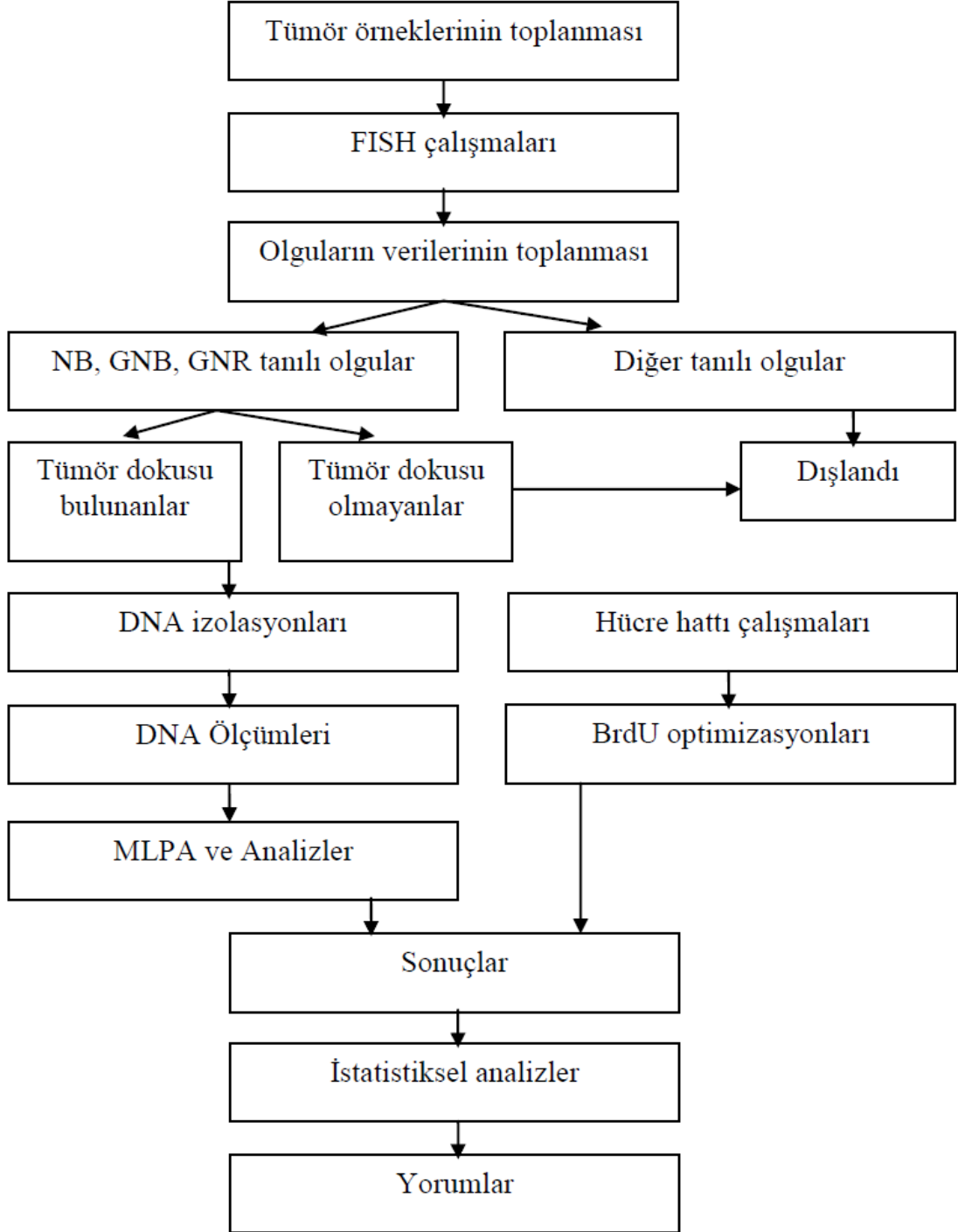
#### *Yıkama İşlemleri*

Kit içeriğinde yer alan yıkama tamponu DTT ile çözüldü. 1M DTT çözeltisine 1.2 ml su ilave edilerek çözüldü. Yıkama 3 kısımda tamamlandı.

### **3.6.5.4. Tarama ve Analiz**

Slaytlar “MS 200 Microarray Scanner” ile taranarak, görüntüler “MS 200 Data Collection Software” yazılımı tarafından işlendi. Elde edilen verilerden “.gff” dosyaları kullanılarak “NimbleGen SignalMap” ve “Nexus v.6” programları ile analiz yapıldı.

### 3.7. Araştırma Planı



### **3.8. Verilerin Değerlendirilmesi**

Tümör örneklerinde çalışılan genetik parametrelerin kendi aralarında ve klinik parametreler arasındaki birliktelikler çok değişkenli lojistik regresyon testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık için *P* değeri 0.05'den eşit veya küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

### **3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Araştırmamızda kullanılan yöntemsel yaklaşımların sınırlılıkları;

- Tümör örneğinin içeriğinde yer alan tümör destek hücrelerinin (NB için Schwannian stroma) miktarının fazla olması.
- Tümör parankiminden elde edilen DNA'nın içerisinde bulunan anomalilerin ve heterojen durumların normal DNA ile seyrelmesine bağlı olarak saptanamaması.
- Tümör dokusunun eksizyonel sınırı ile ilgili sorunlar.
- MLPA yönteminin plooidileri gösterememesi.

MLPA yöntemsel olarak DNA havuzunda seyrelen bu anomalileri ve heterojen genetik durumları saptamada düşük oranda da olsa sıkıntılar çıkartabilmektedir.

### **3.10. Etik Kurul Onayı**

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 23.07.2007 tarih ve 274 sayılı onayıyla hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alınarak gerçekleştirildi (Ek1 ve Ek2).



## **4. BULGULAR**

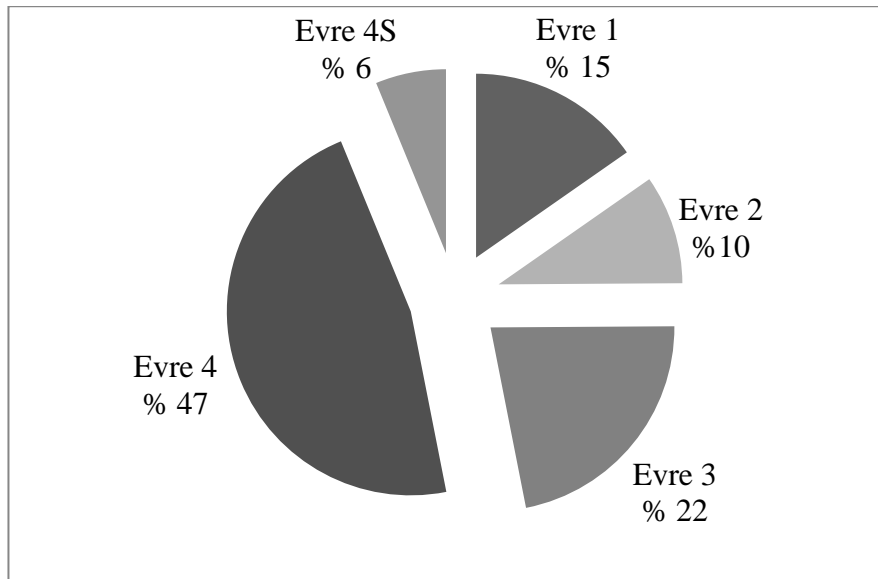
### **4.1. Olguların Seçimi ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi**

2000-2012 yılları arasında TPOG-NB 1999, 2003 ve 2009 protokolü çerçevesinde 43 merkezden gelen 249 olgu çalışmaya dahil edildi. Tümör doku örneklerindeki tümör hücre yüzdesi bilinmediği için FISH ve MLPA sonuçlarına göre seçim yapıldı. Bu seçim kriterleri;

1. FISH sonuçlarına göre % 50'den fazla diploid *MYCN* kopya sayısı olanlar ve MLPA sonuçlarına göre kromozom kollarında değişim saptanmayan olgular çalışmadan dışlandı.
2. Tümör hücre oranı % 50'den fazla olan diploid dışı *MYCN* kopya sayısı olan olguların MLPA sonuçları tamamen normal olsa da çalışmaya dahil edildi.
3. *MYCN* FISH sonuçları normal ancak MLPA sonuçlarına göre en az bir kromozom kolunda aberasyon gözlenen tümör örnekleri çalışmaya dahil edildi.

Bu kriterlere göre 12 hasta çalışmadan dışlandı. Kalan 237 tümörün histopatolojik sınıflandırılmalarına göre dağılımları; 202 NB (% 85.2), 22 GNB (% 9.3), 13 GNR (% 5.5) şeklinde oluştu. GNB ve GNR tanılı olgular NB tanılı olgulardan ayrılarak değerlendirmeler sadece NB olguları üzerinden yapıldı.

NB tanısı alan 202 olgunun 177'sinde INSS göre yapılan evre gruplarına göre dağılımları; 27 olgu evre 1 (% 15.3), 17 olgu evre 2 (% 9.6), 39 olgu evre 3 (% 22.0), 83 olgu evre 4 (% 46.9), 11 olgu evre 4S (% 6.2) (Şekil 3).



**Şekil 3.** NB tanısı alan olguların evre dağılımları.

NB tanısı alan olguların % 54.5'i erkek (n=110), % 45.5'i dişi (n=92) olup yaş aralığı 1-210 ay ve ortanca 21 aydır. Olguların 78'inin (% 38.6) tanı yaşı 12 ay ve 12 aydan küçük, 124'ünün (% 61.4) 12 aydan büyüktür (Tablo 6). Olgulara ait diğer klinik bilgilerden Shimada histolojisi Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6.** NB tanısı alan hastalara ait klinik özellikler.

<b>Değişkenler</b>	<b>Olgu sayısı</b>	<b>%</b>
<b>Yaş</b>	202	100.0
<12 ay	78	38.6
≥12 ay	124	61.4
<b>INSS</b>	177	100.0
1	27	15.3
2	17	9.6
3	39	22.0
4	83	46.9
4S	11	6.2
Bilinmeyen	25	-
<b>Shimada Histoloji</b>	136	100.0
İyi	51	37.5
Kötü	85	62.5
Bilinmeyen	66	-

GNB ve GNR tanılı 35 olgunun % 48.6'sı dişi (n=17), % 51.4'ü (n=18) erkek olup ortalama yaş 57.5 ay, ortanca 48 aydır (6.5-144 ay aralığında).

## 4.2. FISH Sonuçları

*MYCN* geni kopya sayıları MLPA çalışmalarının yanı sıra FISH deneyleriyle de saptandı. NB tanısı alan 202 olgunun 11'inde hibridizasyon elde edilemedi. Geriye kalan toplam 191 NB tanısı almış olgunun; 47'sinde amplifikasyon, 54'ünde kazanım, 50'sinde gen/sentromer oranı analiz edilen hücrelerin % 50'sinden fazlasında bir (ploidi kayması oranı >% 50 ve anöploidi) ve 40'ı normal olarak değerlendirildi. MLPA sonuçlarıyla değerlendirilebilmesi açısından 202 olgu üzerinden yapılan FISH sonuçlarının oranları % 23.3 amplifikasyon, % 51.5 kazanım ve % 19.8 iki kopya olarak hesaplandı (Tablo 7, Şekil 4).

**Tablo 7.** *MYCN* geni FISH sonuçları (\*202 olgu üzerinden hesaplama yapılmıştır).

Tümör tipi	<i>MYCN</i> Durumu	Olgu sayısı	%*
NB	Amplifikasyon	47	23.3
	Kazanım	54	51.5
	Gen/Sentromer=1*	50	
	Normal	40	19.8
	Hibridizasyon yok	11	-

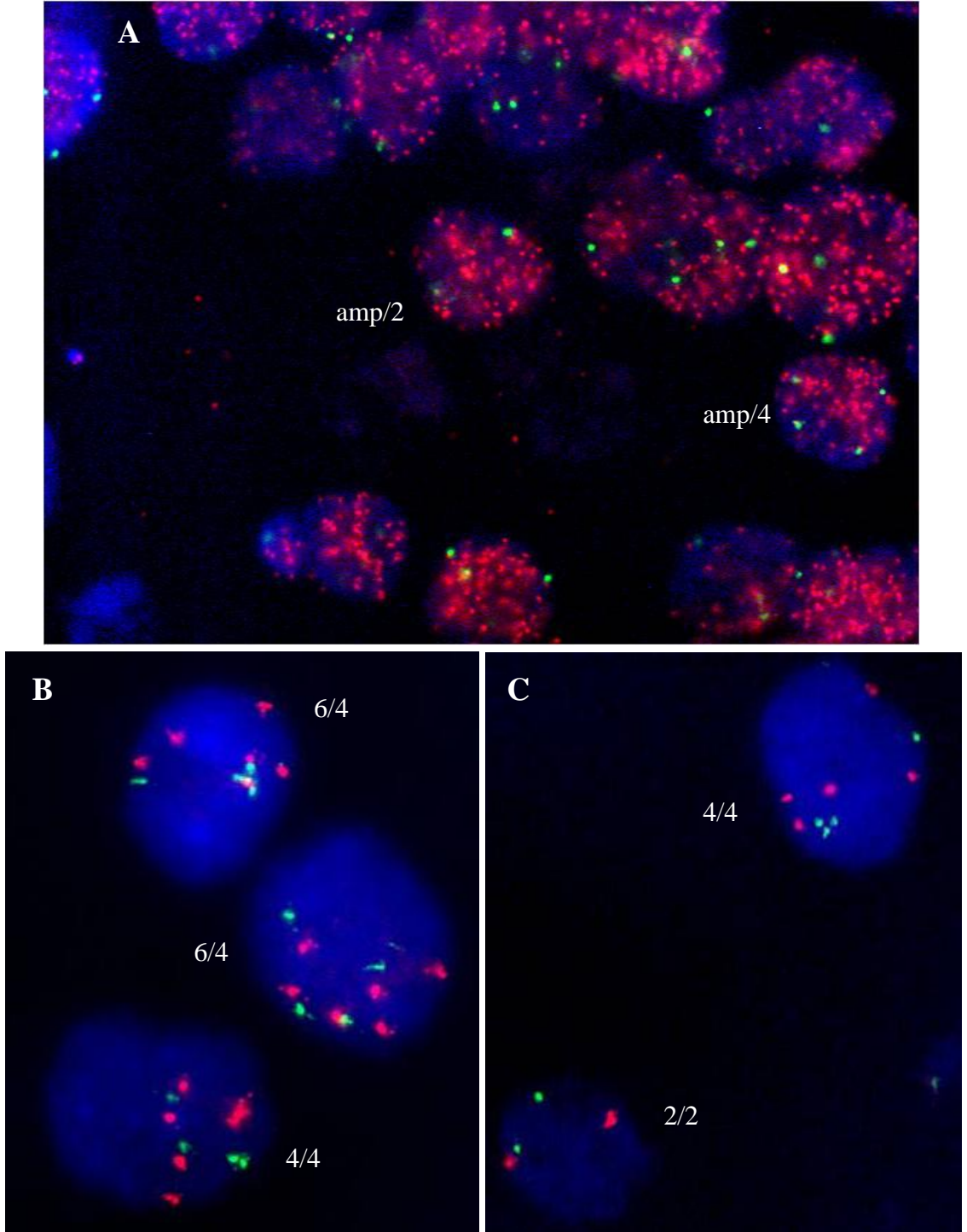
\*Analiz edilen hücrelerin en az % 50'sinde gözlemlendi.

GNB ve GNR tanılı 35 olgudan üçünde hibridizasyon elde edilemedi. Geriye kalan toplam 32 olgunun üçünde kazanım, sekizinde gen/sentromer oranı hücrelerin % 50'sinden fazlasında bir (ploidi kayması oranı >% 50 ve anöploidi) ve 21 olguda ise iki kopya *MYCN* sinyalleri saptandı.

## 4.3.MLPA Sonuçları

### 4.3.1. Hastalarda Saptanan Genetik Değişikler

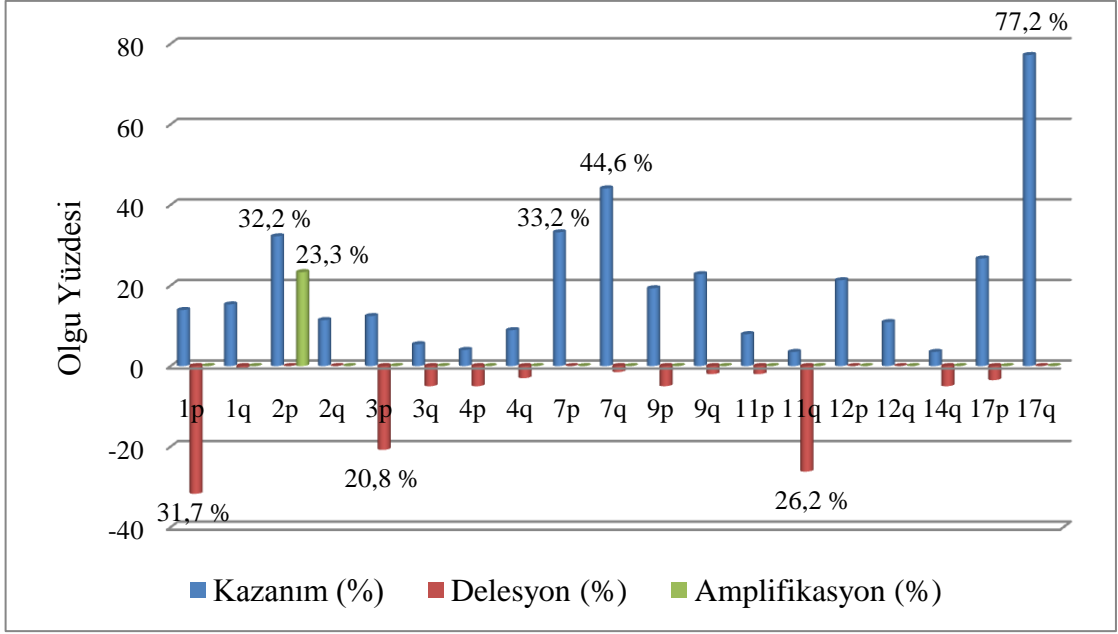
NB tanılı olguların (n=202); 47'sinde (% 23.3) *MYCN* amplifikasyonu, 64'ünde (% 31.7) 1p delesyonu, 42'sinde (% 20.8) 3p delesyonu, 53'ünde (% 26.2) 11q delesyonu ve 156'sında (% 77.2) 17q kazanımı gözlemlendi. Diğer lokuslar ile ilgili veriler Tablo 8 ve Şekil 5'te verilmiştir.



**Şekil 4.** NB tümörlerinde *MYCN* lokus spesifik FISH sonuçları. **A;** *MYCN* amplifikasyonu, **B;** tetraploid ve anöplid hücreler bir arada, **C;** Tetraploid ve normal hücre bir arada (gen kopya sayısı/sentromer sayısı, *MYCN*; kırmızı, *LAF4*; yeşil).

**Tablo 8.** NB olgularında kromozom kollarındaki aberasyonların dağılım sayıları ve yüzdeleri.

Lokus	Normal		Kazanım		Delesyon		Amplifikasyon	
	Olgu	(%)	Olgu	(%)	Olgu	(%)	Olgu	(%)
<b>1p</b>	110	<b>54.5</b>	28	<b>13.9</b>	64	<b>31.7</b>	-	-
<b>1q</b>	170	<b>84.2</b>	31	<b>15.3</b>	1	<b>0.5</b>	-	-
<b>2p</b>	90	<b>44.6</b>	65	<b>32.2</b>	-	-	47	<b>23.3</b>
<b>2q</b>	179	<b>88.6</b>	23	<b>11.4</b>	-	-	-	-
<b>3p</b>	135	<b>66.8</b>	25	<b>12.4</b>	42	<b>20.8</b>	-	-
<b>3q</b>	181	<b>89.6</b>	11	<b>5.4</b>	10	<b>5.0</b>	-	-
<b>4p</b>	184	<b>91.1</b>	8	<b>4.0</b>	10	<b>5.0</b>	-	-
<b>4q</b>	178	<b>88.1</b>	18	<b>8.9</b>	6	<b>3.0</b>	-	-
<b>7p</b>	135	<b>66.8</b>	67	<b>33.2</b>	-	-	-	-
<b>7q</b>	110	<b>54.5</b>	89	<b>44.1</b>	3	<b>1.5</b>	-	-
<b>9p</b>	153	<b>75.7</b>	39	<b>19.3</b>	10	<b>5.0</b>	-	-
<b>9q</b>	152	<b>75.2</b>	46	<b>22.8</b>	4	<b>2.0</b>	-	-
<b>11p</b>	182	<b>90.1</b>	16	<b>7.9</b>	4	<b>2.0</b>	-	-
<b>11q</b>	142	<b>70.3</b>	7	<b>3.5</b>	53	<b>26.2</b>	-	-
<b>12p</b>	159	<b>78.7</b>	43	<b>21.3</b>	-	-	-	-
<b>12q</b>	180	<b>89.1</b>	22	<b>10.9</b>	-	-	-	-
<b>14q</b>	185	<b>91.6</b>	7	<b>3.5</b>	10	<b>5.0</b>	-	-
<b>17p</b>	141	<b>69.8</b>	54	<b>26.7</b>	7	<b>3.5</b>	-	-
<b>17q</b>	46	<b>22.8</b>	156	<b>77.2</b>	-	-	-	-



**Şekil 5.** NB olgularında kromozom kollarındaki kazanım ve delesyonların tüm olgular içerisindeki dağılım yüzdeleri. Y ekseninde MLPA ile analiz edilen tüm lokuslar yer almaktadır.

#### 4.3.2. Olguların MLPA Sonuçlarına Göre Gruplandırılması

NB tümörlerinde heterojen dağılım gösteren DNA düzeyindeki değişikliklerin sınıflandırılması için farklı gruplandırmalar yapılmıştır. Bu gruplamanın yapılması hastaların risk katmanlandırmasının tanımlanması bakımından önemlidir. Çalışmamızda, olgular NB tümör hücrelerinde MLPA ile saptanan genetik değişikliklere göre dört gruba ayrılmıştır ve gruplar Tablo 9’da tanımlanmıştır.

**Tablo 9.** MLPA sonuçlarına göre olguların gruplandırılması.

Grup		Olgu	
No	Tanımı	sayısı	%
1	<i>MYCN</i> amplifikasyonu ve 1p delesyonunu bir arada bulunduranlar ya da en az birini taşıyanlar	48	23.8
2	11q delesyonu ve 3p delesyonunu bir arada bulunduranlar ya da en az birini taşıyanlar	46	22.8
3	<i>MYCN</i> amplifikasyonu veya 1p ve 11q veya 3p delesyonlarından en az ikisini taşıyanlar	25	12.3
4	<i>MYCN</i> amplifikasyonu, 1p, 11q ve 3p delesyonu taşımayan tümörler	83	41.1

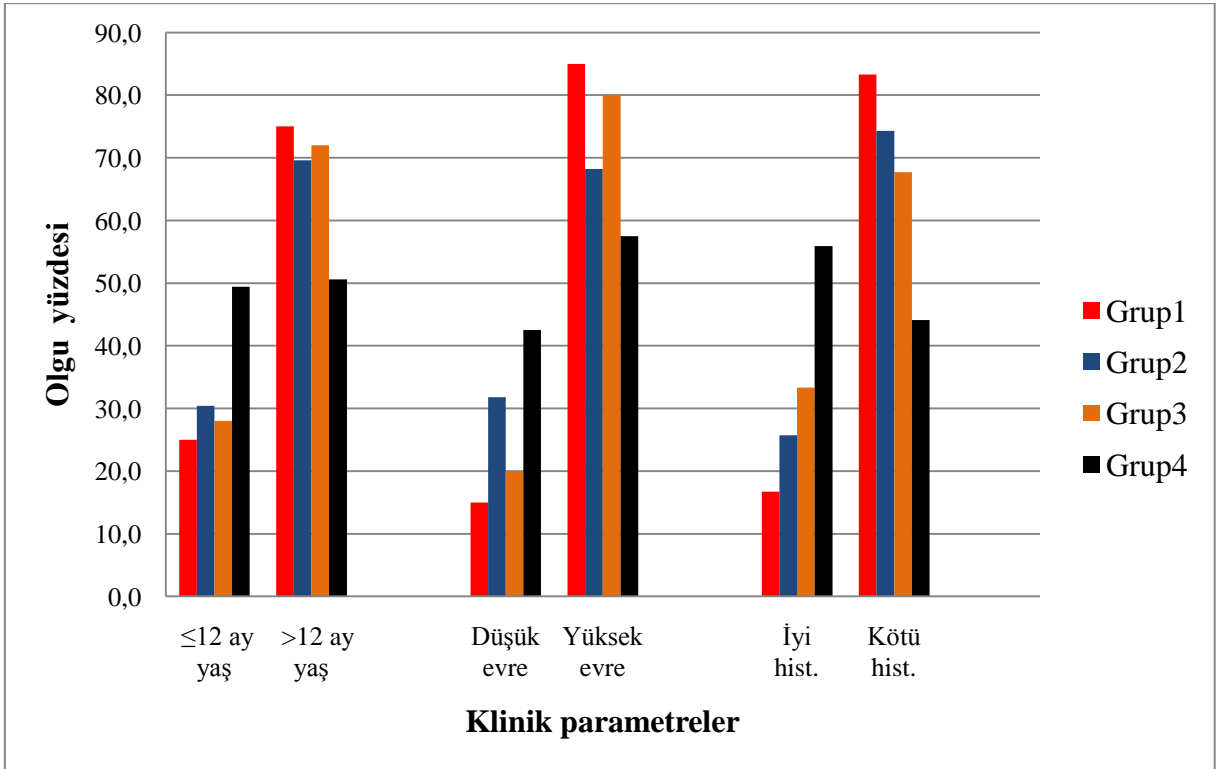
Olguların sınıflandırılmasında kullanılan kıstaslar aşağıdaki gibidir;

- *MYCN* amplifikasyonu taşıyan olgular literatürün çoğunluğunda önerilen 1p delesyonu ile birlikte değerlendirildi (Grup1).
- *MYCN* amplifikasyonu ve 1p delesyonuna ilave olarak 11q ve/veya 3p delesyonları içerenler bir grupta toplandı (Grup3).
- *MYCN* amplifikasyonu taşımayan olgularda literatürde prognostik faktör olarak gösterilen 11q delesyonu ve çalışmamızda 11q ile birlikte gözlenen 3p delesyonu birlikte değerlendirildi (Grup2).
- 11q ve 3p delesyonuna ilave olarak *MYCN* amplifikasyonu ve/veya 1p delesyonu içerenler bir grupta toplandı (Grup3).
- Bu dört anomaliyi de taşımayan olgular da ayrı bir başlıkta değerlendirildi (Grup4).
- 17q kazanımı olguların % 77.2’sinde gözleendiği için bir seçim kriteri olarak kullanılmadı.

Özellikle Grup3'de yer alan olgular her dört anomaliden en az ikisini (Grup1 ve Grup2 anomalilerinden birer adet olmak kaydıyla) içermektedir (Tablo 10).

Tüm olguların % 77.2'sinde gözlenen 17q kazanımı grupların tamamında % 70'in üzerinde olmak kaydı ile en yüksek % 93.5 oranında Grup 2'de saptandı. Diğer gruplara ait oranlar; Grup1; % 70.8, Grup 3; %76.0 ve Grup4; % 72.3. Gruplarda gözlenen tüm genetik değişiklikler Şekil 7'de gösterilmiştir.

MLPA sonuçlarına göre gruplama yapılmasının nedeni hastaların klinik özellikleri ile birlikte değerlendirilerek risk sınıflarının ortaya konmasıdır. 1p, 3p, 11q delesyonu ve MYCN amplifikasyonu taşıyan olguların klinik anlamda kötü prognoz gösterdikleri bilinmektedir. Bu olgular 12 ay üstü yaş, yüksek evre ve kötü histoloji ile karakterizedir. Bu anomalileri içermeyen Grup4 olgularının klinik özellikler bakımından diğer üç gruptan ayrıldığı, belirtilen klinik özellikler açısından dengeli bir dağılım gösterdiği saptandı (Şekil 6). Kötü klinik prognostik faktörler (12 ay altı yaş, yüksek evre ve kötü histoloji) açısından değerlendirildiğinde, yaş hariç Grup1 en riskli grup ve diğer gruplar; Grup3, Grup2 ve Grup4 şeklinde sıralandı.

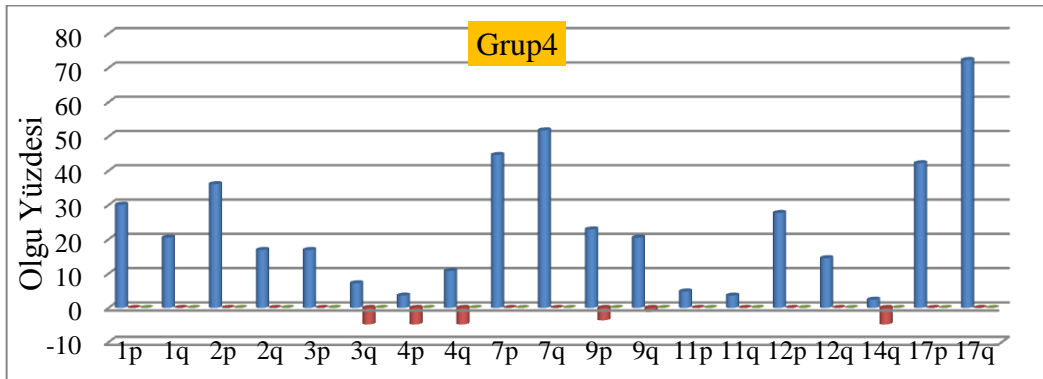
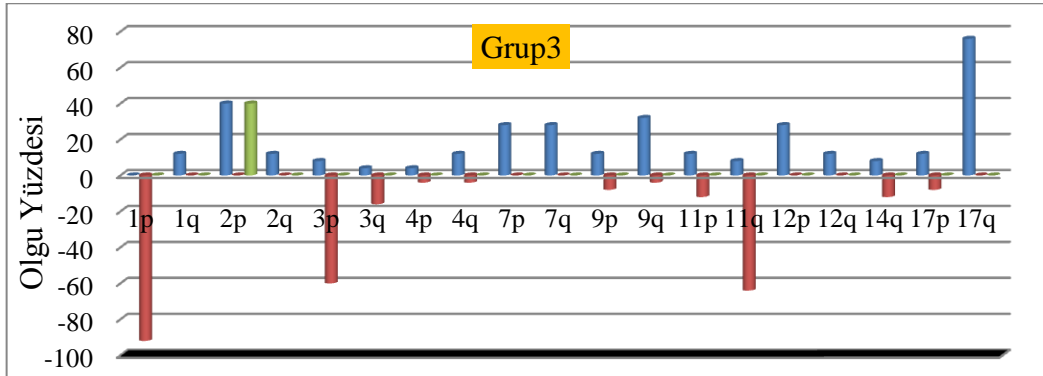
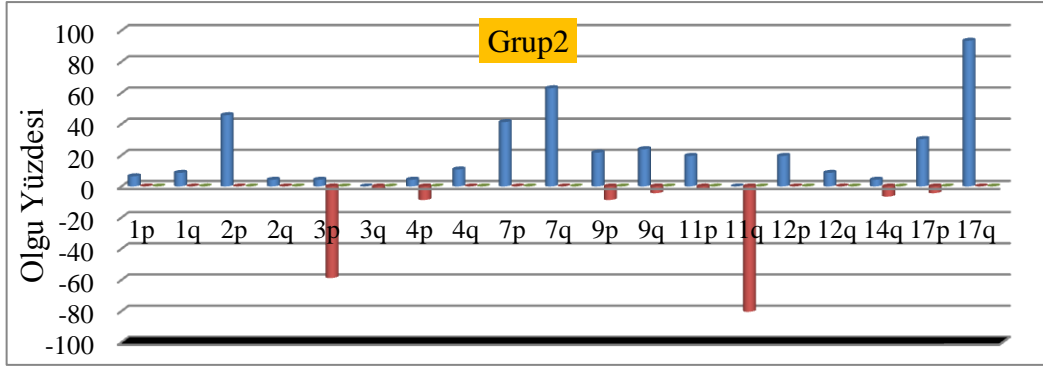
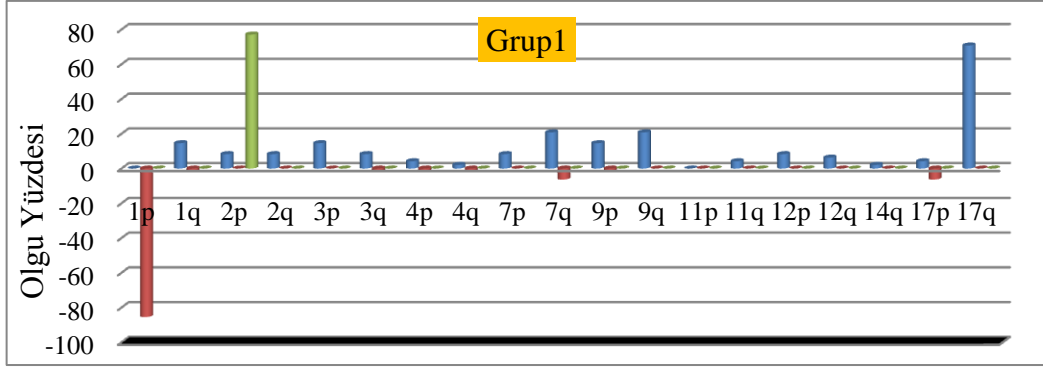


**Şekil 6.** Klinik parametrelerin gözlenme yüzdelерinin gruplara göre dağılımları (Hist; histoloji).



**Tablo 10.** MLPA sonuçlarına göre oluşturulan gruplarda *MYCN* amplifikasyonu 1p, 3p ve 11q delesyonlarının birlikte bulunma durumları ve olgulara göre dağılımları (del; delesyon amp; amplifikasyon).

<b>Anomaliler</b>	<b>Olgu sayısı</b>	<b>Yüzde (grup içi)</b>	<b>Yüzde (Tüm olgular)</b>
<b>Grup1</b>			
Sadece <i>MYCN</i> amp	7	14.6	3.5
Sadece 1p del	11	22.9	5.4
<i>MYCN</i> amp+1p del	30	62.5	14.9
Toplam	48	100	-
<b>Grup2</b>			
Sadece 11q del	19	41.3	9.4
Sadece 3p del	9	19.6	4.5
11q+3p del	18	39.1	8.9
Toplam	46	100	-
<b>Grup3</b>			
1p+11q del	5	20.0	2.5
1p+3p del	5	20.0	2.5
1p+11q del+ <i>MYCN</i> amp	3	12.0	1.5
1p+3p+11q del	5	20.0	2.5
<i>MYCN</i> amp+11q del	2	8.0	1.0
1p+3p del+ <i>MYCN</i> amp	4	16.0	2.0
1p+3p+11q del+ <i>MYCN</i> amp	1	4.0	0.5
Toplam	25	100	-



Şekil 7. MLPA sonuçlarına göre dört gruptaki genetik aberasyonların dağılımları (mavi; kazanım, kırmızı; delesyon, yeşil; amplifikasyon).

#### 4.3.3. Prob Setlerinde Yer Alan Genlerin Kopya Sayılarının Saptanması

Lokuslara ait kopya sayısı verilerin analizinde Coffalaysyer yazılımı kullanıldı. Buna göre delesyon gözlenen lokuslarda (1p, 3p, 4q, 9p, 9q, 11q) MLPA oranı 0.01-0.74 arasında bir kopya (haploid) saptandı. Kazanım gözlenen lokuslarda (1p-q, 2p-q, 3p-q, 11p, 4p-q, 7p-q, 9p-q, 12p-q, 17p-q) MLPA oranı 1.26-5.00 arasında 3-10 kopya şeklinde belirlendi. Amplifikasyon gözlenen 2p lokusunda MLPA oranı 5.01-244.2 arasında 11-488 kopya saptandı. 2p dışında kalan kromozom kollarında amplifikasyon gözlenmedi. Burada yer alan *MYCN* geninin yanı sıra *NAG*, *DDX1* ve *ALK* geninde de amplifikasyon gözlendi. MLPA oranı 0.75-1.25 olan olguların kopya sayıları iki (diploid) olarak alındı [121].

#### 4.3.4. MLPA ve FISH Çalışmalarının Karşılaştırılması

MLPA çalışmalarından elde edilen 2p bulguları ve *MYCN* geni kopya sayılarına göre; amplifikasyon görülen 47 olgu FISH çalışmalarında da amplifiye olarak saptandı. *MYCN* geni amplifikasyonu bakımından MLPA ve FISH sonuçlarında tam bir uyumluluk gözlendi. Özellikle FISH ve MLPA sonuçlarında uyum olmayan 10 olgudan üçünde *MYCN* geni MLPA ile kazanım FISH ile normal, yedisinde MLPA ile normal FISH ile kazanım olduğu gösterildi. FISH tek hücre analizine dayalı yöntemsel üstünlüğü nedeniyle az sayıda diploididen kayan hücreleri bile saptayabilmektedir. Ayrıca tümör hücrelerinde görülen bölgesel çapta ufak heterojen durumlar FISH ile saptanabilirken, MLPA yönteminde bu olguların DNA havuzunda çalışma gerçekleştirildiği için sonuç diploid olarak saptanabilmektedir.

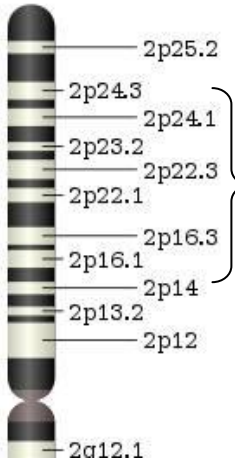
#### 4.3.5. Amplikon Analizleri

MLPA sonuçlarına göre *MYCN* amplifikasyonu gözlenen ve amplikon içerisinde yer alan *NAG*, *DDX1*, *MYCN* ve *ALK* genlerini içeren olgulara ait MLPA ölçüm değerleri Tablo 11'de verilmiştir. Bu olgular içerisinde 20 olguda *NAG*, 27 olguda *DDX1*, 47 olguda *MYCN* ve üç olguda *ALK* amplifikasyonu gözlendi. Dört genin birlikte amplifiye olduğu iki olgu, *MYCN* ve *ALK* genlerinin birlikte amplifiye olduğu üç olgu, *NAG-DDX1-MYCN* genlerinin birlikte amplifiye olduğu 18 olgu, *DDX1* ve *MYCN* genlerinin birlikte amplifiye olduğu yedi olgu ve sadece *MYCN* geninin soliter olarak amplifiye olduğu 19 olgu bulunmaktadır. *NAG*, *DDX1*, *ALK* gen amplifikasyonlarıyla, *MYCN* amplifikasyonu ile birlikte bulunması istatistiksel olarak ayrı ayrı değerlendirildiğinde birlikteliğin anlamlı olduğu saptandı ( $\chi$ -kare sırasıyla;  $P=0.001$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.01$ ). *NAG*, *DDX1* ve *ALK* gen amplifikasyonu güçlü bir

şekilde *MYCN* bağımlı amplifikasyonlar olup, bu genler olgu grubumuzun tamamında *MYCN* olmadan amplifiye olmamaktadır. *MYCN* geni amplifikasyonu aynı zamanda komşu genlerinde amplifikasyonuna neden olabilmektedir. Komşu genlerinde amplifiye olması amplikonun uzunluğuna bağlıdır.

Kopya sayılarını belirten MLPA oranları *MYCN* geninde diğer genlere göre en yüksek değerine ulaşmaktadır. *MYCN* geni merkez olmak kaydıyla özellikle genin yukarı ucunda bulunan *NAG* ve *DDXI* genlerinin kopya sayılarının azaldığı gözlemlendi. *ALK* geni *NAG* ve *DDXI* genlerine göre *MYCN* geninden daha uzakta yerleşmiştir. Bu nedenle *ALK* geni amplifikasyonu *NAG* ve *DDXI* genlerine göre daha azdır (üç olgu). Dört genin de amplifiye olduğu iki olguda kopya sayıları değerlendirildiğinde *MYCN-ALK* arasında farklı genlerinde amplikona dahil olabileceğini düşündürmektedir.

**Tablo 11.** *MYCN* amplifikasyonu gözlenen olgularda amplikonların genlere göre dağılım durumları (Siyah: amplifikasyon, koyu gri: kazanım ve açık gri: normal gen kopya sayısı).



Hasta ID	NAG	DDX1	MYCN	ALK
306	52,89	54,90	54,17	17,44
41	47,38	61,69	70,25	15,69
313	1,81	1,45	38,05	11,70
129	85,33	82,92	128,40	2,91
44	41,50	71,45	244,20	3,75
180	37,95	49,68	69,86	3,30
154	31,56	61,73	78,71	2,00
2	26,42	29,10	30,02	1,73
80	22,31	28,67	33,67	2,13
1	17,14	20,02	28,51	1,48
26	14,80	29,56	70,05	2,44
98	11,55	24,47	33,83	1,72
75	6,76	6,67	35,93	1,35
248	5,39	13,15	25,21	1,32
252	5,09	5,15	14,53	2,80
192	28,77	34,06	43,82	1,10
197	10,54	20,16	47,58	1,11
262	10,30	23,32	33,74	1,17
207	9,77	14,52	27,76	0,97
46	6,65	14,04	15,95	1,13
144	43,86	50,55	41,60	1,17
217	4,44	12,69	21,67	1,43
32	1,52	51,40	89,33	2,81
30	1,40	35,19	43,25	4,03
303	1,09	35,83	48,93	4,17
244	0,99	12,82	25,33	3,47
273	4,92	10,18	14,64	1,11
243	2,80	6,18	8,17	1,05
275	1,52	1,38	18,38	1,15
143	1,27	2,10	50,88	1,34
134	1,26	1,35	32,70	1,18
28	1,59	1,09	98,01	1,52
247	1,15	4,13	7,02	1,23
274	1,04	2,53	11,97	0,96
300	1,17	1,04	37,24	2,50
267	1,14	1,14	18,38	1,26
230	1,07	0,97	20,97	1,77
290	1,06	1,19	43,58	4,56
245	1,05	1,09	13,23	1,67
239	1,00	0,87	12,24	1,79
288	0,93	0,93	21,25	3,02
204	0,85	0,92	17,19	1,59
307	0,78	0,75	30,32	3,58
259	1,08	1,00	12,95	0,81
271	1,00	1,05	14,82	0,83
200	0,97	1,14	6,67	1,07
235	0,95	0,90	5,44	0,95

#### 4.3.6. Sonuçların İstatistiksel Anlamda Değerlendirilmesi

Çalışma sonuçları çok değişkenli lojistik regresyon analizi ile değerlendirildi. Genetik ve klinik parametreler arasındaki ilişki bağımlı değişkenler; tanı yaşı, tümör evresi ve histolojisiyle, bağımsız değişkenlerin (*MYCN* amplifikasyonu 1p, 3p, 11q delesyonu, 17q kazanımı) her biri ile analiz edildi. Bunun yanı sıra Genetik parametreler de kendi aralarında her biri bağımlı değişken olarak seçilerek analiz edildi.

##### 4.3.6.1. Klinik ve Genetik Parametreler Arasındaki İlişki

Klinik verilerin bağımlı değişken olarak seçildiği analiz sonuçlarına göre (Tablo 12);

- **Tanı yaşı:** Genetik parametreler arasında, 11q delesyonu gözlenen olguların bir yaş ve üstü olma olasılığı 11q delesyonu olmayanlara göre 2.6 kat daha fazladır.
- **Tümör evresi:** Genetik parametreler arasında, *MYCN* amplifikasyonu gözlenen olguların yüksek evre (Evre 3/4) olma olasılığı *MYCN* amplifikasyonu olmayanlara göre 6.7 kat daha fazladır.
- **Histolojik durum:** Genetik parametreler arasında, *MYCN* amplifikasyonu gözlenen olguların kötü histoloji olma olasılığı *MYCN* amplifikasyonu olmayanlara göre 4.1 kat daha fazladır ve 17q kazanımı gözlenen olguların kötü histoloji olma olasılığı 17q kazanımı olmayanlara göre 3.1 kat daha fazladır.

##### 4.3.6.2. Genetik Parametrelerin Kendi Aralarındaki İlişkileri

Genetik verilerin bağımlı değişken olarak seçildiği analiz sonuçlarına göre (Tablo 12);

- Genetik parametreler arasında 1p delesyonu gözlenen olgularda, *MYCN* amplifikasyonu olma olasılığı 1p delesyonu olmayanlara göre 27.0 kat daha fazladır.
- Genetik parametreler arasında 3p delesyonu gözlenen olgularda, 1p delesyonu gözlenme olasılığı 3p delesyonu olmayanlara göre 2.7 kat daha fazladır.
- Genetik parametreler arasında 11q delesyonu gözlenen olgularda, 3p delesyonu olma olasılığı 11q delesyonu olmayanlara göre 5.6 kat daha fazladır.
- Genetik parametreler arasında 11q delesyonu gözlenen olgularda, 17q kazanımı olma olasılığı 11q delesyonu olmayanlara göre 3.4 kat daha fazladır.

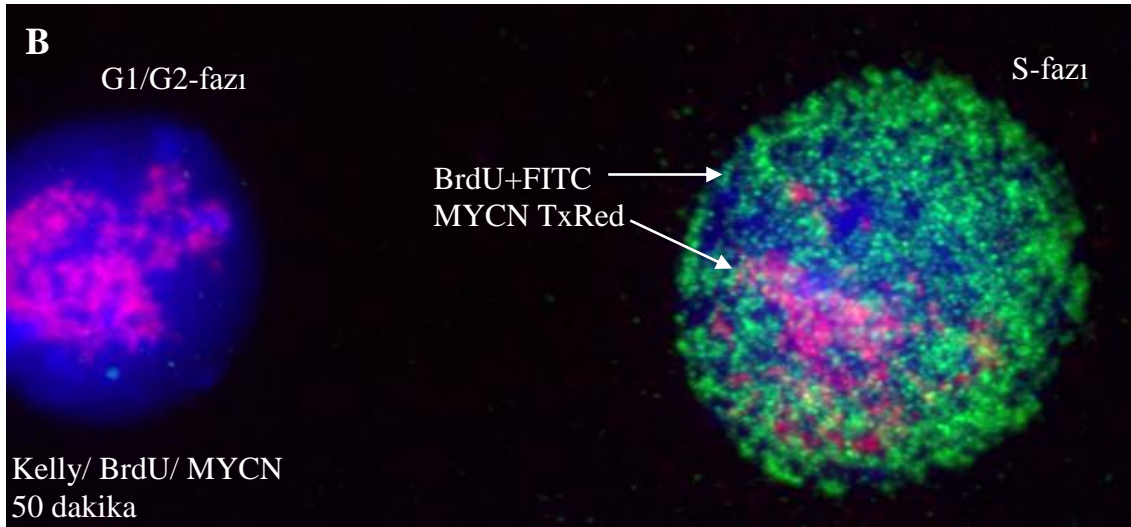
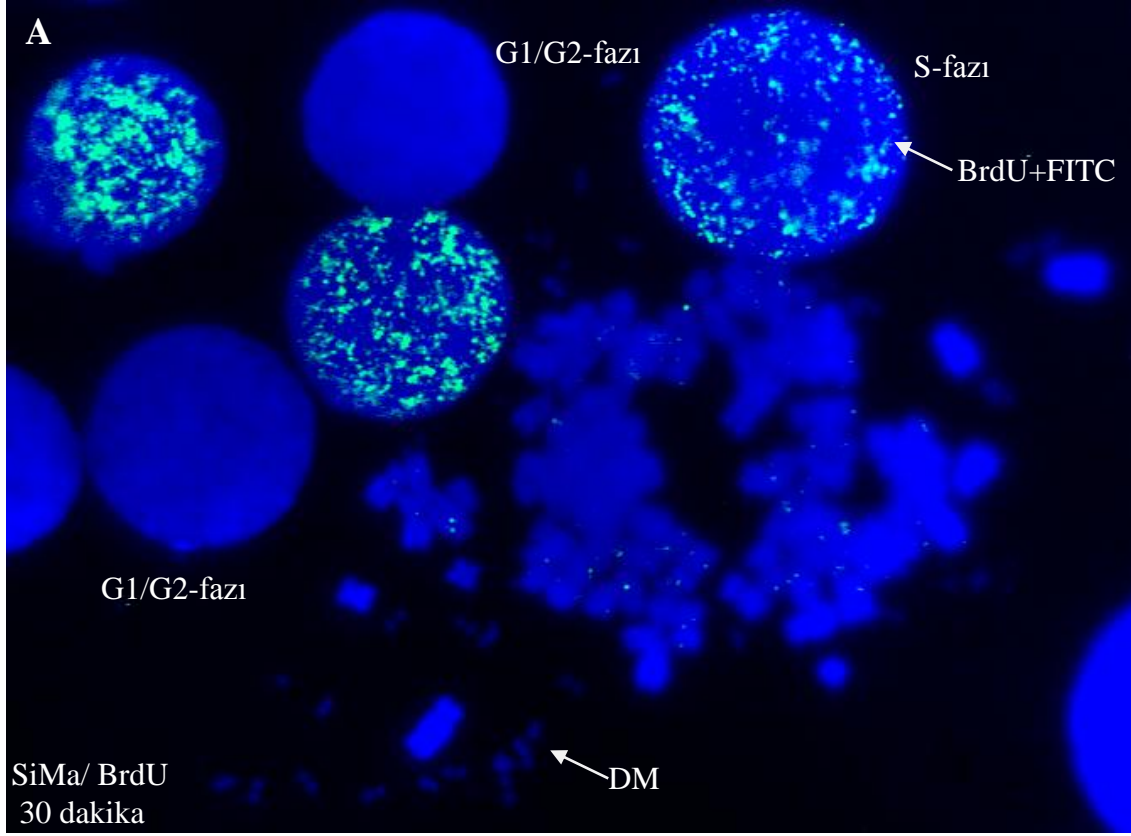
**Tablo 12.** Çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçlarına göre genetik ve klinik özellikler bakımından anlamlı bulunan değişkenler.

Parametreler	Bağımlı Değişkenler	Bağımsız Değişkenler	P Değeri	Odds Oranı	% 95 Güven Aralığı
<b>Klinik</b>	<i>Yaş (≥12 ay)</i>	11q del	0.014	2.608	1.213–5.608
	<i>Evre (3/4)</i>	<i>MYCN amp</i>	0.005	6.726	1.795–25.200
	<i>Kötü Histoloji</i>	<i>MYCN amp</i>	0.043	4.074	1.044–15.896
		17q kazanımı	0.021	3.110	1.186–8.151
<b>Genetik</b>	<i>MYCN Amp.</i>	1p del	<0.0001	26.956	10.870–66.851
	<i>1p del</i>	3p del	0.035	2.730	1.072–6.955
	<i>11q del</i>	3p del	<0.0001	5.518	2.549–11.947
		17q kazanımı	0.025	3.265	1.158–9.206

(Amp; amplifikasyon, del; delesyon)

#### 4.4. DM'lerin Replikasyon Zamanı Çalışmalarının Sonuçları

SiMa ve Kelly NB hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda BrdU katılımları için 30, 50 dakika, 1, 2, 3, 4, 5, 8 saat inkübe edilen hücreler immünfloresans yöntemle analiz edildi. Özellikle bir saati aşan inkübasyon sürelerinde BrdU katılımlarının yoğun bir şekilde olduğu saptandı. Çalışmalar 30-50 dakika aralığında üç kez tekrarlandı. Sonuç olarak, SiMa hücre hattına DM'lerin kendini eşlemesinin replikasyon döngüsünden bağımsız olmadığı ve "S" fazının içerisinde replike olduğu gösterildi (Şekil 8).



**Şekil 8.** SiMa ve Kelly hücre hattında 30 ve 50 dakika BrdU katılımı. **A;** Metafaz plağında DM'lerin yanı sıra BrdU girişimi olan S-fazı hücreleri, katılım gözlenmeyen G1/G2 fazı hücreleri görülmektedir. **B;** İnterfaz nükleuslarında *MYCN* TxRed işaretli lokus spesifik prob ve BrdU katılımı S ve G1/G2 fazı hücrelerinde görülmektedir. DM ve G1/G2 faz interfaz hücrelerinde herhangi bir BrdU katılımı gözlenmemektedir (Mavi; DAPI, Kırmızı; *MYCN* TxRed Lokus spesifik DNA probu, Yeşil; BrdU spesifik FITC konjuge antikor).

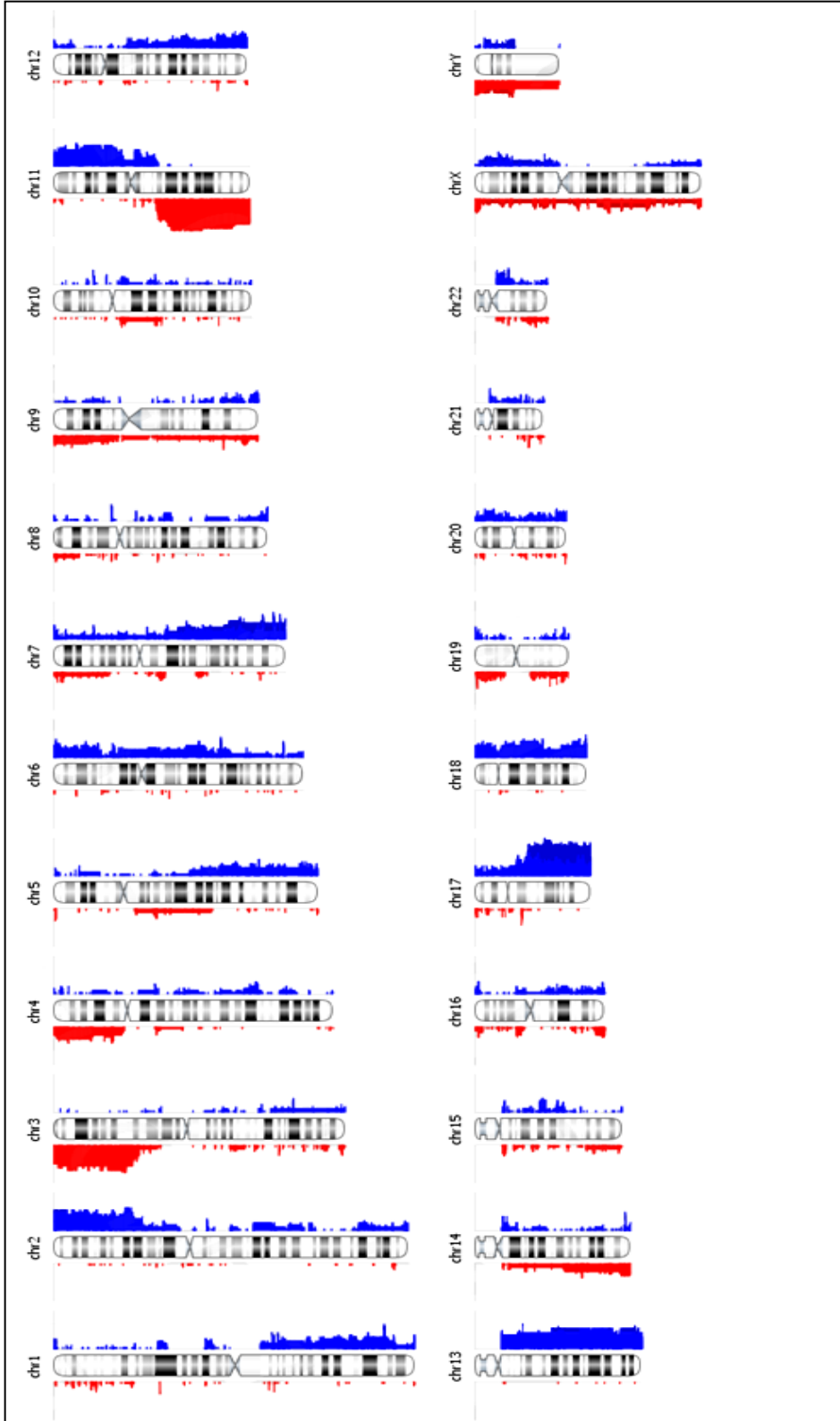


#### 4.5. Dizin CGH (aCGH) sonuçları

MLPA sonuçlarına göre 11q ve 3p delesyonları olan, *MYCN* amplifikasyonu olmayan dokuz olgu “720 K Whole-Genome Exon-Focused Array” platformu kullanılarak aCGH çalışmaları gerçekleştirildi. Sonuçlar “NimbleGen-SignalMap” ve “Nexus v.6” yazılımları kullanılarak analiz edildi. Çalışma sonuçlarına göre bazı olguların çeşitli lokuslarında informatif veriler elde edilemedi (Tablo 13). Analiz edilebilen bölgelerden elde edilen sonuçlara göre, 11q ve 3p delesyonu görülen olguların diğer kromozom kollarındaki aberasyonların heterojen dağıldığı gözlemlendi. Olgu 35’de 11q kolunda kromozom içi delesyon saptandı. Diğer olgularda delesyon telomere kadar devam etmektedir. MLPA sonuçlarına göre 3p delesyonu gözlenen olgulardan 43 ve 60’da kromozomal kol delesyonu saptanmazken olgu 117 ve 131’de sonuç elde edilemedi. Olgu 43 ve 60’da MLPA sonuçlarına göre 3p bölgesinde gözlenen delesyonun gen düzeyinde (*VHL* lokusunda) olduğu, bu olguların aCGH sonuçlarında da gen düzeyinde delesyon olduğu rapor edildi. Aynı şekilde olgu 60’da 11q kolunda aCGH sonuçlarına göre büyük delesyon bölgesi olmamasına karşın MLPA sonuçlarına göre sınırlı bölgede gen düzeyinde delesyon saptandı.

Çalışma sonucunda 3 ve 11 numaralı kromozom için en küçük ortak delesyon bölgesi saptanmadı. Çalışma evreni aynı zamanda MLPA sonuçlarına göre Grup2 tümör grubunda yer almaktadır. MLPA’da çalışılan lokuslardan farklı olarak 18 ve 20 kromozomlarda kol ve kromozomun tamamını kapsayan artışlar ve X kromozomunda delesyonlar saptandı. Ancak belirgin tutarlı bir anomali gözlenmedi (Tablo 13, Şekil 9).

**Şekil 9.** Dizin-CGH çalışmasının Nexus-6 yazılımı ile yapılan analizi. Dokuz olgunun delesyonları kromozomun sol tarafında ve kazanımları sağ tarafında verilmiştir.



Kromozom	Olgu No								
	Olgu 35	Olgu 43	Olgu 60	Olgu 113	Olgu 114	Olgu 117	Olgu 131	Olgu 183	Olgu 189
1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	1q12-qter-gain	Normal
2	2p16.2-pter-gain	Normal	Normal	Normal	NI	Normal	NI	2p15-pter-gain	2p16.2-pter-gain
3	3p14.3-pter-del	Normal	Normal	3p14.3-pter-del	3p14.3-pter-del	NI	NI	3p14.1-pter-del	3p21.31-pter-del
4	4q13.1-pter-del	Normal	Normal	4p12-pter-del	4p15.2-pter/4p14-del	Normal	4p14-del	Normal	Normal
5	Normal	Normal	Normal	NI	Normal	Normal	NI	5q11.1-q21.3-del/ 5q21.3-qter-gain	5q14.3-qter gain
6	Normal	Normal	Normal	Normal	NI	6p21.32-pter-gain	NI	Normal	Normal
7	7q11.21-qter/7p22.1- pter-gain	7p22.1-pter- gain	Normal	7p14.1-pter-del/ 7p21.11-qter-gain	NI	7p22.1-pter-gain	TÜM-Kazanım	7q31.31-qter-gain	Normal
8	8q24.3-qter-gain	Normal	Normal	NI	NI	Normal	NI	8p22-pter-del	NI
9	9p13.3-pter-del	Normal	Normal	NI	9p12-pter-del/ 9q32-qter-gain	Normal	Normal	Normal	9q13-qter-gain
10	Normal	NI	Normal	10q11.21-q22.1-gain	NI	Normal	NI	Normal	Normal
11	11p15.4-p11.2-gain/ 11q14.1-q24.1-del	11q14.1-pter- del	Normal	11q13.3-pter-gain/ 11q13.3-qter-del	11q13.2-qter-del	11q13.4-pter gain/ 11q13.4-qter-del	11q14.1-qter-del	11q13.4-qter-del	11q13.3-pter-gain/ 11q13.3-qter-del
12	Normal	Normal	Normal	Normal	NI	Normal	NI	12q13.13-qter-gain	12q24.13-qter gain
13	Normal	Normal	TÜM-Kazanım	NI	TÜM-Kazanım	TÜM-Kazanım	TÜM-Kazanım	Normal	TÜM-Kazanım
14	14q11.1-q11.2/ 14q32.2-qter-del	Normal	Normal	Normal	NI	Normal	Normal	14q23.1-qter-del	14q11.2-qter-del
15	Normal	Normal	Normal	Normal	15q24.3-qter-del	Normal	NI	Normal	15q22.31-pter-gain
16	16p11.2-p11.1/ 16q23.3-qter-del	Normal	Normal	16q23.3-qter-del	Normal	Normal	NI	Normal	16q11.2-qter-gain
17	17p13.3-pter,13.1- del/11.2-qter-gain	17q12-qter- gain	TÜM-Kazanım	17q21.31-qter-gain	17q12-qter-gain	17q21.2-qter-gain	17q21.33-qter-gain	17q12-qter-gain	17q21.33-qter-gain
18	TÜM-Kazanım	Normal	TÜM-Kazanım	Normal	TÜM-Kazanım	Normal	TÜM-Kazanım	Normal	18q21.2-pter/22.2-qter- gain
19	Normal	19p13.2-qter- gain	Normal	Normal	19p13.33-qter-del	Normal	NI	Normal	Normal
20	20q11.23-qter-gain	Normal	Normal	Normal	NI	20q13.31-qter-gain	20p12.3-p11.1-gain	Normal	TÜM-Kazanım
21	Normal	Normal	21q11.2-qter-del	NI	NI	Normal	21q11.1-q22.11-gain	Normal	Normal
22	Normal	Normal	Normal	Normal	NI	Normal	NI	22q12.3-qter-gain	Normal
x	Xq21.31-q21.32-del	Normal	TÜM-Delesyon	Xp11.22-p22.33-gain	NI	Normal	Normal	Normal	Xp22.31-q21.1,q24- qter-gain/q21.1-q24-del

**Tablo 13.** Dokuz olguya ait “Roche Nimblegen Human CGH 3x720 K Whole-Genome Exon-Focused Array” çipiyle yapılan çalışma sonuçlarına göre kromozom kollarında gözlenen aberasyonlar (NI; Değerlendirme yapılmadı).

## **5. TARTIŞMA**

Nöroblastomda gözlenen genetik değişikliklerin tanımlanması ve bu belirteçlerden yola çıkarak araştırmada ve tedavide stratifikasyonunun yapılması karyotip çalışmaları ile sayısal değişiklikler düzeyinde başlamıştır. Gelişen moleküler teknikler karmaşık genomik değişiklikler içeren NB tümörlerinin genetik karakterizasyonu yeni tekniklerle belirlendikçe tümörlerin gruplanması ve bu gruplar üzerinden hem araştırma hem de tedaviye yönelik çıkarımlar yapılması elverişli hale gelmiştir.

Çalışmamızda, ülkemizin çeşitli bölgelerinde tanı almış Türk sporadik NB olgularında MLPA çoklu genetik analiz metodolojisi ile tümörlerin genetik karakterizasyonu yapıldı. Olguların aynı zamanda *MYCN* gen kopya sayısı durumları FISH yöntemiyle de çalışıldı. En iyi yöntemsel yaklaşım genom ölçeğinde analiz ile tümörlerdeki tüm genomik dengesizlikleri saptamaktır. MLPA çoklu kopya sayısı değişikliklerini aynı anda duyarlı bir şekilde saptayabilmektedir. NB olgularında genom ölçeğinde analizler birçok grup tarafından farklı yöntemler kullanılarak (MLPA, SNP array ve array-CGH), yapılmıştır. Ortak olarak, hedef saptanan genetik aberasyonlardan yola çıkarak tümörlerin gruplanması ve bu grupların klinik özelliklerinin ortaya konularak hastalık prognozu arasında ilişki kurulmaya çalışılmaktadır [46,102,117,122-128].

Tümörlerin gruplanmasında güncel literatürdeki verilere ek olarak çalışmamızdaki genetik-klinik verilerin anlamlılıkları da dikkate alındı. Gruplamalarda prognostik faktör olarak kabul edilen *MYCN* geni amplifikasyonu ve bununla birlikte sıkı bir ilişkisi olan 1p delesyonu ile *MYCN* amplifiye olmayan olgularda tanımlanan 11q delesyonları ve bu anomali ile birlikte gözlenen 3p delesyonları ana eksenini oluşturmuştur. Tümörleri “genome-wide” analizlerin sonucunda, genetik özelliklerine göre gruplama eğilimi farklı çalışmalarda ortak bazı bileşenleri ortaya koymaktadır. Örneğin Caren ve Villamon’un çalışma grupları *MYCN* amplifikasyonu taşıyan grup ve 11q delesyonu taşıyan grup olarak tanımlarken, bir başka çalışma sayısal, segmental aberasyonlar ve *MYCN* amplifikasyonu üzerinden gruplama yapmıştır [102,117,124]. Genomik değişikliklerin temel alındığı bir risk gruplaması oluşturan çalışmalarda kromozomun kısmı yada bütünsel artışı ve *MYCN* kopya sayısı artışı dışında sayısal anomali taşımayan olgular şeklinde de gruplamalar yapılmıştır [129].

Ortaya koyduğumuz bu çıkarımlar eşliğinde çalışmamızın sonuçlarına göre içerdikleri genomik dengesizlikler bakımından tümörler dört farklı gruba ayrılmıştır. Grup1’de *MYCN*

amplifikasyonu ve 1p delesyonu, Grup2’de 11q ve 3p delesyonu, Grup3’de *MYCN* amplifikasyonu veya 1p delesyonundan en az biri, 3p veya 11q delesyonundan en az biri olmak kaydıyla en az iki anomali ve Grup4’de bu dört anomali hariç çeşitli kromozom kolu kazanım ve kayıpları gözlenmiştir.

Gruplardaki olguların klinik özellikleriyle genetik aberasyonlar birliktelik göstermektedir. Grup1, 2 ve 3 kötü prognoz gösteren, 12 ay üstü, yüksek evre ve kötü histolojili tümörlerden oluşmaktadır. Grup4’de hastaların klinik özellikleri ve kromozom kollarındaki aberasyonlar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır. Çalışmamızda, klinik özellikler dikkate alındığında *MYCN* amplifikasyonu ve 11q delesyonlarını herhangi birini taşıyan olguların kötü prognoz ile ilişkili olduğu literatür ile benzer olarak ortaya konmuştur [81,122]. “Genome-wide” yaklaşımı ile çalışma yapan diğer gruplarda da *MYCN* amplifikasyonu ve 11q delesyonlarının birbirinden bağımsız birer prognostik belirteç olduğu ortaya konmuş ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [102,124]. Agresif NB’de segmental kromozomal aberasyonlar sıklıkla gözlenirken benign NB’de ise segmental kromozomal aberasyonların görülme sıklığı düşer ve tüm kromozom kazanımları gözlenir. Agresif NB ile benign NB iki küme olarak düşünüldüğünde, kesişen iki kümenin ortak alanı orta risk grubunu oluşturur. Bu grupta, tüm kromozom artışlarının yanı sıra segmental kromozomal aberasyonlarda gözlenir [26]. Çalışmamızda segmental kromozomla aberasyonları sıklıkla gördüğümüz Grup1, 2 ve 3 agresif NB karakteri taşıırken, Grup4 daha çok kesişim kümesi ile benign gruba doğru kaymaktadır.

Çok sayıda tümör içeren ve genom ölçeğinde yapılan çalışmalardan elde edilen kopya sayısı değişiklikleri, segmental aberasyonlar ve gen düzeyindeki bilgiler kendi aralarında veya klinik veriler ile farklı istatistiksel analizler (lojistik regresyon analizi) yapılabilir [130]. Çalışmamızdaki çoklu değişken içeren lojistik regresyon analizi sonuçlarına göre, *MYCN* amplifikasyonu gözlenen olgular güçlü bir şekilde kötü prognoz ile ilişkilidir. Klinik parametreler ekseninden *MYCN* amplifikasyonları değerlendirildiğinde; *MYCN* amplifikasyonu pozitif olguların yüksek eve (Evre 3/4) olma olasılığı *MYCN* amplifikasyonu negatif olgulara göre 6.7 kat ( $P=0.005$ ) daha fazla olduğu ve kötü histoloji olma olasılığının da 4.1 kat ( $P=0.043$ ) arttığı saptanmıştır. Literatürde, *MYCN* amplifikasyonu gözlenen olguların yüksek evre, kötü histoloji ve yüksek risk ile karakterize olduğu bilinmektedir [30,102,131].

Bir no'lu kromozomun NB genetiğindeki önemi primer tümörlerde ve NB hücre hatlarında yapılan sitogenetik analizlerde anlaşılmıştır. Diğer sitogenetik çalışmalarda da özellikle 1p delesyonları olmak üzere 1p değişimleri yüksek sıklıkta saptanmıştır. Bir no'lu kromozomun kısa kolunda NB gelişiminde rol oynayan bir ya da fazla sayıda genin bulunduğu düşüncesi böylece ağırlık kazanmıştır [132]. 1p delesyonu gözlenen NB tümörlerinin kötü prognoz ve metastatik hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Primer NB olgularının %25-30'unda 1 no'lu kromozomun kısa kolunda; delesyonlar tanımlanmıştır [132]. Öte yandan *MYCN* amplifikasyonu ile 1p delesyonu arasında güçlü bir birliktelik vardır ve klinik olarak kötü prognoz ile ilişkilidir [66,133]. Olgu grubumuzda *MYCN* amplifikasyonu taşıyan 47 bireyin 38'inde (% 80.9) 1p delesyonu da taşımaktadır. Genetik parametrelerin kendi aralarındaki lojistik regresyon analizleri; 1p delesyonu olan olgularda *MYCN* amplifikasyonu gözlenme olasılığının 1p delesyonu olmayanlara göre 27.0 kat ( $P<0.0001$ ) daha fazla olduğu ortaya koymaktadır. 1p kromozom kolunun delesyonu ya da allelik kaybının bağımsız prognostik anlamlılığı tartışmalı olsa da 1p36 bölgesindeki allelik kaybın yerel tümörlü olgularda hastalık relapsı için risk artırıcı bir faktör olduğu yönünde kanıtlar vardır [66,78].

11q delesyonu, *MYCN* amplifikasyonu gözlenen olgularda nadiren gözlenmektedir ve diğer klinik parametrelerden bağımsız prognostik değeri olduğu gösterilmiştir [81]. Primer NB olgularının % 35-45'inde 11 no'lu kromozomun kısa kolunda delesyonlar tanımlanmıştır [134]. MLPA çalışma sonuçlarımıza göre, *MYCN* amplifiye olmayan olgularda 11q delesyonu sıklıkla gözlenmektedir. 11q delesyonu gözlenen olguların 12 aylık üstü olma olasılığının 12 ay ve altı olma olasılığından 2.6 kat ( $P=0.014$ ) fazla olduğu saptandı. Dolayısıyla 11q delesyonu taşıyan 12 aydan büyük olguların riskleri daha da artmaktadır. 11q delesyonu NB'nin malign evrimini büyük ölçüde desteklemektedir [80,81,102]. *MYCN* amplifikasyonundan bağımsız 11q delesyonu ile 3p delesyonu arasında güçlü bir birliktelik bilinmektedir [127]. Çalışmamızdaki lojistik regresyon analizi sonuçları da bu birlikteliği desteklemektedir. 11q delesyonu olan olgularda 3p delesyonu gözlenme olasılığı 11q delete olmayan olgulara göre 5.6 kat ( $P<0.0001$ ) daha fazla olduğu saptanmıştır.

NB olgularında delete olan 3p lokusu olguların % 20.8'inde gözlenmektedir ve diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir [127]. 3p delesyonu taşıyan olguların klinik özellikleri; ileri evre (evre 3/4, % 69.4), kötü histoloji (%73.3) ve yaş >12 aydır (66.7%) ve

kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Spitz ve ark. yaptığı çalışmada 3p ve 11q delesyonlarının özellikle *MYCN* tek kopya olgularda yüksek risk NB grubu için önemli birer belirteç olduğu vurgulanmıştır [87]. *MYCN* amplifikasyonu-1p delesyonu ve 1q delesyonu-3p delesyonu birlikteliklerini ortaya koyan literatürden farklı olarak [66,87,133,135], lojistik regresyon analizi sonuçlarına göre; genetik parametreler arasında 3p delesyonu gözlenen olgularda 1p delesyonu görülme olasılığı 3p delesyonu olmayanlara göre 2.7 kat ( $P=0.035$ ) daha fazla olduğu saptandı.

17q kazanımı olguların % 77.2'sinde ve tüm tümör gruplarında yüksek oranda gözlenmiştir (Grup1, 70.8%; Grup2, 93.5%; Grup3, 76.0%; Grup4, 72.3%) Geçmişte yapılan çalışmalarda iki karşıt görüş yer almaktadır. 17q kazanımlarının kötü prognozla, *MYCN* amplifikasyonu ve 1p delesyonları ile ilişkili olduğunu savunanlar ve bu ilişkinin olmadığını savunanlar olarak ikiye ayrılmaktadır [95,100,101]. Caren ve ark. yaptığı çalışmada *MYCN* amplifikasyonu ve 11q delesyonu olmayan 17q kazanımı olan olguların 17q kazanımı olmayan olgulara göre daha kötü prognoz gösterdiği saptanmıştır [102]. Çalışmamızda, 17q kazanımı gözlenen olguların kötü histoloji olma olasılığı 17q kazanımı olmayanlara göre 3.1 kat ( $P=0.021$ ) daha fazla olduğu saptandı. Aynı zamanda 11q delesyonu ile arasında sıkı bir birliktelik gözlemlendi. 11q delesyonu gözlenen olguların 17q kazanımı olma olasılığı 11q delesyonu olmayanlara göre 3.4 kat ( $P=0.025$ ) daha fazladır. Dolayısıyla bu çalışmalardan farklı olarak, 17q kazanımının varlığı kötü histoloji ve kötü prognostik belirteç 11q delesyonu ile ilişkilidir. Farklı bir bakış açısı ile Yu ve çalışma grubu 17q kolunda haritaladıkları aday kodlamayan RNA olan *ncRAN*'ın ileri NB tümörlerinde onkogen gibi davrandığını öne sürmüşlerdir [136].

Tümörlerde grupları oluşturan majör anomalilerin yanı sıra daha az sıklıkta saptanan 4p, 9p ve 14q delesyonları çalışmamızda bu üç kromozom kolunda da % 5.0 oranında saptandı. Bu bölgelerde yapılan LOH analizlerinde TSG içerebileceği öngörülen bölgeler tanımlanmasına rağmen herhangi bir TSG gösterilememiştir [137]. Öte yandan 9p kromozom kolunda yer alan *CDKN2A* geninde MLPA sonuçlarına göre sekiz olguda delesyon saptandı. *CDKN2A*, *p16INK4a* ve *p14ARF* proteinlerini alternatif okuma çerçevesine göre kodlamaktadır. *p16INK4a* hücre siklusu aktivatörlerinden *CDK4* ve *CDK6*'nın inhibitörü olarak rol alır [138]. Yapılan çalışmalar, *CDK2NA* geninde gözlenen kayıpların ileri evre NB'lerde iyi prognoz göstermesine rağmen tümörün ilerlemesini engelleyici bir etkisi

gözlenmemiştir [139]. Çalışmamız bu bulguları destekleyecek nitelikte olup, *CDK2NA* delesyonu gözlediğimiz sekiz olgudan ikisinde *MYCN* amplifikasyonu gözlenmiş ve olguların üçü Grup1'de, üçü Grup2'de ve ikisi Grup4'de yer almaktadır. 14q kromozom kolunda *NFκBIA* geninde MLPA sonuçlarına göre 29 olguda delesyon saptandı. *NFκBIA* proteini *NFκB* proteinini kontrol etmektedir. Hodgkin's lenfomalarda *NFκBIA*'nin TSG gibi davrandığı gösterilmiştir [140]. Ancak NB tümörlerinde etkisi bilinmemektedir. Ayrıca tümörlerde görülme sıklığı sırasına göre 7q, 7p, 17p, 9q, 9p, 12p, 12q ve 4q kromozom kollarında artışlar saptandı. Birçok çalışma NB tümörlerinde bu tür artışların olabileceğini belirtmektedir [123].

MLPA sonuçlarının değerlendirilmesinde, özellikle *MYCN* geni amplifikasyonları FISH sonuçları ile karşılaştırıldığında sonuçların tamamen örtüştüğü gözlemlendi. FISH interfaz nükleuslarının tek tek analiz edilmesinin üstünlüğü ile az sayıda da olsa diploididen kayan hücreleri saptayabilmektedir. Bunun yanı sıra NB tümörlerinde az sayıda olabilen heterojen hücre popülasyonlarını saptayabilmek, FISH'in yöntemsel üstünlüğüdür. Çalışmamızda, *MYCN* geninin FISH ve MLPA sonuçlarına göre tutarlılık göstermeyen (amplifikasyonlar tam tutarlıdır) on tümör örneği saptanmıştır. MLPA'da tümör örnekleri DNA havuzundan çalışıldığı için % 10'un altındaki heterojenlikler saptanamamaktadır [121]. Villamon ve ark. yaptığı validasyon çalışmalarında MLPA çalışmalarının NB'nin genetik aberasyonlarını belirlemede çok etkili olduğu ve aynı zamanda FISH çalışmaları ile yüksek konkordans gösterdiği belirtilmiştir [141]. Çalışmamızda özellikle *MYCN* amplifikasyonu olan olgularda tam tutarlı bir sonuç veren MLPA'nın duyarlı bir metodolojik yaklaşım olduğu ortaya konmuştur.

MLPA kopya sayısı analizlerinde de güçlü bir yöntemsel yaklaşımdır. Çalışmamızda toplam 100 gene ait kopya sayıları belirlendi. Özellikle amplifikasyonun gözlemlendiği 2p bölgesinde yer alan *NAG-DDXI-MYCN* ve *ALK* genlerinin kopya sayıları MLPA ile saptandı (Tablo 9). Bu sonuçlara göre; dört genin de birlikte amplifiye olduğu iki olgu, *MYCN* ve *ALK* genlerinin birlikte amplifiye olduğu üç olgu, *NAG-DDXI-MYCN* genlerinin birlikte amplifiye olduğu 18 olgu, *DDXI* ve *MYCN* genlerinin birlikte amplifiye olduğu yedi olgu ve sadece *MYCN* geninin soliter olarak amplifiye olduğu 19 olgu bulunmaktadır. *MYCN* geni merkez olmak kaydıyla özellikle genin yukarı ucunda bulunan *NAG* ve *DDXI* genlerinin kopya sayılarının azaldığı gözlemlendi. Çalışmamızda, soliter *MYCN* amplifikasyonu olan olgular



dışında *MYCN* merkez olmak kaydıyla uçlara doğru azalarak *NAG* ve *DDX1* genlerinin amplifiye olduğu saptanmıştır. Kopya sayısı analizlerine farklı bir bakışla, *NAG*, *DDX1* ve *ALK* gen amplifikasyonları ile *MYCN* amplifikasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla  $P=0.001$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.01$ ). *NAG*, *DDX1* ve *ALK* gen amplifikasyonları güçlü bir şekilde *MYCN* bağımlı amplifikasyonlar olup, bu genlerin olgu grubumuzun tamamında *MYCN* olmadan amplifiye olmadığı saptanmıştır. Literatürde *NAG*, *DDX1* ve *MYCN* genlerinin birlikte amplifiye olduğunu gösteren birçok farklı çalışma bulunmaktadır [40-45]. Ayrıca, *ALK* kopya sayısı değişikliklerini kapsayan yayınlanan çalışmamızın sonuçlarına göre; *ALK* kopya sayısının artışının nedeni kromozomal dengesizlik ya da segmental artıştan kaynaklı olduğu ve soliter *ALK* kopya sayısı değişikliklerinin nadiren gözleendiği ortaya konmuştur [49]. Onkogen olarak nitelendirilen *ALK* geni normal gelişim ve NB patogenezinde rol alması bakımından tedavi hedefi olarak gündemdedir [130]. Kinaz aktivitesini artırıcı veya sürekli olmasına neden olan bazı mutant *ALK* formlarının hücre hattı çalışmalarında inhibe edilerek hücrelerin apoptoza gitmesi, *ALK* geninin potansiyel tedavi hedefi olarak belirlenmesine neden olmuştur [24]. *ALK* genin amplifikasyonu *MYCN* amplifikasyonu gözlenen 47 olgunun üçünde gözleendi, soliter *ALK* amplifikasyonu saptanmadı. *ALK* da gözlenen artışların kromozomal imbalans ya da segmental artışla ilişkili olduğu çalışmamızda ortaya konmuştur [49]. Mutant ve/veya amplifiye *ALK* içeren olgular NB olgularının küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Dolayısıyla *ALK* genin NB patogenezinde rolü olabilmekle birlikte iyi bir tedavi hedefi olmaktan uzaktır.

Genomik mikrodizin (array-CGH) yapısal düzenlemeler sonucunda oluşan dengesiz segmentlerin kırılma noktaları yığılım bölgelerini (“break cluster regions”) ve yeni kırılma noktalarını saptayabilen bütünsel bir tekniktir. *MYCN* amplifiye olmayan tümörler ile ilgili yapılan çalışmalarda 11q delesyonun olguların % 15-20’sinde gözlenmektedir. 3p delesyonları ise sıklıkla 11q delesyonları ile güçlü birliktelik göstermektedir [81,84,142]. Yapılan çalışmalar bu iki lokusta da TSG olasılıkları düşünülüp detaylı CGH analizleri yapılmış olmasına rağmen hala net bir kanıtı varabilmek mümkün olamamıştır [130,143-145]. 11q ve 3p delesyonlarının birlikte gözleendiği dokuz Grup2 olgusunda yaptığımız dizin CGH sonuçları bu iki kromozom segmenti içinde yer alan herhangi bir en küçük delesyon noktasını ortaya koyamamıştır. Bulunan delesyonlar telomeri de kapsayacak şekilde terminal delesyonlardır. Ancak bazı olgularda (60 ve 43) kol ve/veya inter kromozomal bir delesyon olmamasına karşın, MLPA sonuçlarına göre sınırlı bölgede gen düzeyinde delesyonlar

saptandı. Bu olgularda diğer kromozom kollarındaki dengesizlikler heterojen dağıldığı gözlemlendi (Tablo 11, Şekil 9). Sonuç olarak, literatürde de belirtildiği gibi bizim çalışmamızda da dokuz olgu için ortak bir delesyon noktası veya aday bir TSG içerecek lokus tanımlanamamıştır. 11q ve 3p delesyonu birlikte görülen olgularda bu anomalilere eşlik eden belirgin, tutarlı ilave bir dengesizlik gözlenmedi. Ancak bu olgularda 13, 18 ve 20. kromozomlarda, literatürde NB olgularının herhangi bir grubunda da gözlenebilen şekilde, tüm kromozom artışları kaydedildi [123,146].

DNA replikasyonu gen bakımından zengin ve ökromatik bölgelerde daha önce, dişi bireylerde ise X kromozomunun aktif ve inaktif olanına göre daha önce olduğu gösterilmiştir. Öte yandan GC zengin bölgelerin AT zengin bölgelere göre daha erken replike olduğu bilinmektedir [147]. Yapılan çalışmalar DM'lerin erken S fazından itibaren semi-senkron bir düzende replike olduğunu HSR bölgelerinin ise geç S fazında replike olduğu gösterilmiştir [110]. SiMa ve Kelly NB hücre hatlarında yaptığımız çalışmalarda DM yapılarının replikasyon zamanının olağan hücre döngüsü replikasyon zamanlamasından bağımsız hareket etmediği saptandı. SiMa hücrelerinde metafaz plaklarında yapılan analizlerde DM'ler üzerinde diğer kromozomlardan farklı olarak herhangi bir BrdU katılımları saptanmadı. İnterfaz nükleuslarında da S fazı hücreleri hariç herhangi bir fazda bir BrdU katılımı gözlenmedi. Sonuç olarak, SiMa hücre hattına DM'lerin kendini eşlemesinin replikasyon döngüsünden bağımsız olmadığı ve S fazının içerisinde replike olduğu gösterildi.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

NB heterojen ve karmaşık bir tümör tipi olmasına karşın, çoklu gen analizleri ile gruplanabilmesi mümkün olabilmiştir. Çalışmamızda dört grup altında böldüğümüz tümörlerin en agresif karakterli olanlarının *MYCN* amplifikasyonu ve/veya 1p delesyonları ile karakterize olduğunu görmekteyiz. Bunun yanı sıra 11q ve/veya 3p delesyonu taşıyan olgularda da prognoz kötü seyretmektedir. Farklı segmental ve veya tüm kromozomal aberasyonların olduğu Grup4'de ise daha az agresif tümör karakteri gözlenmektedir. Sonuç olarak MLPA, NB için genetik özellikler dikkate alınarak yapılacak bir gruplamada güçlü bir metodolojik yaklaşımdır. Tümörlerin farklı birçok kromozom kollarındaki anomaliler ve ilgili kollardaki gen kopya sayılarının belirlenmesi hastanın klinik durumu ile ilgili bilgiler vermektedir. NB'de çoklu genetik değişikliklerin saptanmasında MLPA kullanılması etkin ve duyarlı bir yaklaşım olup, tümörlerin çoklu genetik özellikleri bakımından sınıflandırılmasını sağlayabilmektedir. Metodolojik olarak MLPA uygulamalarının NB hasta tedavi protokollerinin etkin bir biçimde uygulanmasına destek olacağı kanısındayız.

*MYCN* amplifikasyonu gözlenmeyen olgularda genomik dengesizliklerin saptanması ve klinik fenotiple ilişkilendirilmesi, yeni genetik prediktif faktörlerin ve hastalığın risk katmanlarının tanımlanması bakımından önem taşımaktadır. NB olgularında MLPA sonuçlarına göre *MYCN* amplifiye olmayan grupta öne çıkan prognostik faktörler 11q ve 3p olarak belirlenmiştir. Hastaların risk sınıflandırılmasında bu parametrelerinde etkin anlamda kullanılabileceği ortaya konmuştur.

MLPA sonuçlarının değerlendirilmesinde, özellikle *MYCN* geni amplifikasyonları FISH sonuçları ile karşılaştırıldığında sonuçların tamamen örtüştüğü, ancak beklendiği şekilde gen/sentromer oranı bir olan bazı olgularda ve/veya tümör heterojenitesinden kaynaklı uyuşmayan sonuçlarda gözlendi.

*MYCN* amplifiye olgularda amplikon boyutlarının ve içeriğinin tanımlanması ile amplifikasyon mekanizmalarını hakkında ipuçları elde edilmiştir. *NAG*, *DDX1* ve *ALK* gen amplifikasyonları ile *MYCN* amplifikasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ve bu gen amplifikasyonları güçlü bir şekilde *MYCN* bağımlı amplifikasyonlar olup, olgu grubumuzun tamamında *MYCN* olmadan amplifiye olmadığı saptanmıştır. Soliter *MYCN* amplifikasyonu bulunan olgular dışında amplikonun merkezinden (*MYCN* geni) periferde doğru kopya sayılarının azaldığı gözlendi.

Dizin CGH verileri dengesiz kromozom düzenlenmelerinin kırılma noktası yığılım bölgelerini tanımlayabilme, en küçük ortak delesyon noktalarını saptayabilme potansiyeline sahiptir. En küçük ortak delesyon bölgelerinin saptanabilmesi NB'deki 11q ve 3p kromozom kollarında olabileceği öngörülen TSG'lerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır. 11q ve 3p delesyonlarının birlikte gözlendiği dokuz Grup2 olgusunda yaptığımız dizin CGH sonuçlarına göre, ilgili lokuslarda en küçük ortak delesyon noktası delesyonların kromozom içinde belirli bir bölgeye yığılım göstermeden kol delesyonu şeklinde görülmesinden dolayı saptanmamıştır.

*MYCN* amplifikasyonlarının metafaz plağında görülme şekillerinden biri olan DM'ler hücre döngüsünün hangi aşamasında replike olduğunun gösterilmesi amplifikasyon mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlayabileceği öngörüldü. Ancak, SiMa hücre hattına DM'lerin kendini eşlemesinin replikasyon döngüsünden bağımsız olmadığı ve S fazının içerisinde replike olduğu gösterilmiştir.

## **7. REFERANSLAR**

1. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003;4:472-480
2. Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1430-1437; discussion 1437-1438
3. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203-216
4. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999;86:349-363
5. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* 2008;55:97-120, x
6. Olgun N. On behalf of the Turkish Pediatric Oncology Group. An Intermediary Analysis of the Neuroblastoma Treatment Protocol 2003 of the Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) at October 2006. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:14-14
7. Eser S. Childhood Cancer Incidence in Izmir, Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:6-6
8. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106-2120
9. Brodeur GM ed. *Clinical and biological aspects of neuroblastoma*. 2001 ed. New York: McGraw-Hill; 2001:1167-1188
10. Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* 2001;54:897-910
11. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19:93-101
12. Brodeur GM. Clinical significance of genetic rearrangements in human neuroblastomas. *Clin Chem* 1989;35:B38-42
13. Brodeur GM, Fong CT, Morita M, et al. Molecular analysis and clinical significance of N-myc amplification and chromosome 1p monosomy in human neuroblastomas. *Prog Clin Biol Res* 1988;271:3-15

14. Westermann F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett* 2002;184:127-147
15. Longo L, Panza E, Schena F, et al. Genetic predisposition to familial neuroblastoma: identification of two novel genomic regions at 2p and 12p. *Hum Hered* 2007;63:205-211
16. Tonini GP, McConville C, Cusano R, et al. Exclusion of candidate genes and chromosomal regions in familial neuroblastoma. *Int J Mol Med* 2001;7:85-89
17. Maris JM, Kyemba SM, Rebbeck TR, et al. Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36. *Cancer Res* 1996;56:3421-3425
18. Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, et al. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* 2002;62:6651-6658
19. Perri P, Longo L, Cusano R, et al. Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. *Oncogene* 2002;21:8356-8360
20. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455:930-935
21. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004;74:761-764
22. van Limpt V, Schramm A, van Lakeman A, et al. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene* 2004;23:9280-9288
23. Chen Y, Takita J, Choi YL, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:971-974
24. George RE, Sanda T, Hanna M, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:975-978
25. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:967-970
26. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362:2202-2211
27. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983;305:245-248

28. Schwab M, Ellison J, Busch M, et al. Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4940-4944
29. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 1984;308:288-291
30. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-1124
31. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313:1111-1116
32. Alitalo K. Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. *Med Biol* 1984;62:304-317
33. Bahr G, Gilbert F, Balaban G, Engler W. Homogeneously staining regions and double minutes in a human cell line: chromatin organization and DNA content. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:657-661
34. Balaban-Malenbaum G, Gilbert F. Double minute chromosomes and the homogeneously staining regions in chromosomes of a human neuroblastoma cell line. *Science* 1977;198:739-741
35. Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, et al. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 1981;41:4678-4686
36. Haag MM, Soukup SW, Neely JE. Chromosome analysis of a human neuroblastoma. *Cancer Res* 1981;41:2995-2999
37. Kano-Tanaka K, Higashida H, Fukami H, Tanaka T. Double minutes in mouse neuroblastoma cells and their hybrids. *Cancer Genet Cytogenet* 1982;5:51-62
38. Moreau LA, McGrady P, London WB, et al. Does MYCN amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A Children's Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 2006;12:5693-5697
39. Solovei I, Kienle D, Little G, et al. Topology of double minutes (dmins) and homogeneously staining regions (HSRs) in nuclei of human neuroblastoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:297-308

40. Defferrari R, Tonini GP, Conte M, et al. Concomitant DDX1 and MYCN gain in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2007;256:56-63
41. George RE, Kenyon R, McGuckin AG, et al. Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:2037-2042
42. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, et al. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:185-192
43. Scott D, Elsdon J, Pearson A, Lunec J. Genes co-amplified with MYCN in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? *Cancer Lett* 2003;197:81-86
44. Scott DK, Board JR, Lu X, et al. The neuroblastoma amplified gene, NAG: genomic structure and characterisation of the 7.3 kb transcript predominantly expressed in neuroblastoma. *Gene* 2003;307:1-11
45. Wimmer K, Zhu XX, Lamb BJ, et al. Co-amplification of a novel gene, NAG, with the N-myc gene in neuroblastoma. *Oncogene* 1999;18:233-238
46. Scaruffi P, Coco S, Cifuentes F, et al. Identification and characterization of DNA imbalances in neuroblastoma by high-resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;177:20-29
47. Reiter JL, Brodeur GM. MYCN is the only highly expressed gene from the core amplified domain in human neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23:134-140
48. Subramaniam MM, Piqueras M, Navarro S, Noguera R. Aberrant copy numbers of ALK gene is a frequent genetic alteration in neuroblastomas. *Human Pathology* 2009;40:1638-1642
49. Bagci O, Tumer S, Olgun N, Altungoz O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Lett* 2012;317:72-77
50. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984;311:231-235
51. Brenner DW, Barranco SC, Winslow BH, Shaeffer J. Flow cytometric analysis of DNA content in children with neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1989;24:204-207



52. Cohn SL, Rademaker AW, Salwen HR, et al. Analysis of DNA ploidy and proliferative activity in relation to histology and N-myc amplification in neuroblastoma. *Am J Pathol* 1990;136:1043-1052
53. Gansler T, Chatten J, Varello M, Bunin GR, Atkinson B. Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma. Correlation with histology and clinical outcome. *Cancer* 1986;58:2453-2458
54. Huddart SN, Muir KR, Parkes SE, et al. Retrospective study of prognostic value of DNA ploidy and proliferative activity in neuroblastoma. *J Clin Pathol* 1993;46:1101-1104
55. Muraji T, Okamoto E, Fujimoto J, Suita S, Nakagawara A. Combined determination of N-myc oncogene amplification and DNA ploidy in neuroblastoma. Complementary prognostic indicators. *Cancer* 1993;72:2763-2768
56. Naito M, Iwafuchi M, Ohsawa Y, et al. Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma: prognostic significance of DNA ploidy in unfavorable group. *J Pediatr Surg* 1991;26:834-837
57. Hayashi Y, Kanda N, Inaba T, et al. Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer* 1989;63:126-132
58. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, et al. Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer Res* 1987;47:311-318
59. Takita J, Hayashi Y, Yokota J. Loss of heterozygosity in neuroblastomas--an overview. *Eur J Cancer* 1997;33:1971-1973
60. Weiss MJ, Guo C, Shusterman S, et al. Localization of a hereditary neuroblastoma predisposition gene to 16p12-p13. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:526-530
61. Gilbert F, Balaban G, Moorhead P, Bianchi D, Schlesinger H. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1982;7:33-42
62. Atkin NB. Chromosome 1 aberrations in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;21:279-285
63. Laureys G, Speleman F, Versteeg R, et al. Constitutional translocation t(1;17)(p36.31-p36.13;q11.2-q12.1) in a neuroblastoma patient. Establishment of somatic cell hybrids and identification of PND/A12M2 on chromosome 1 and NF1/SCYA7 on chromosome 17 as breakpoint flanking single copy markers. *Oncogene* 1995;10:1087-1093

64. Mitchell EL, McNally K, Kelsey A. Involvement of chromosomes 1 and 17 in a case of neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol* 1996;13:457-461
65. Van Roy N, Laureys G, Cheng NC, et al. 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:103-114
66. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334:225-230
67. Caron H, Spieker N, Godfried M, et al. Chromosome bands 1p35-36 contain two distinct neuroblastoma tumor suppressor loci, one of which is imprinted. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:168-174
68. Caron H, van Sluis P, van Hoeve M, et al. Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nat Genet* 1993;4:187-190
69. Fong CT, White PS, Peterson K, et al. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1992;52:1780-1785
70. Gilbert JA, Knodel EL, Stenstrom SD, Richelson E. Function and regulation of methionine5-enkephalin and its receptors in murine neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1982;257:1274-1281
71. Henrich KO, Claas A, Praml C, et al. Allelic variants of CAMTA1 and FLJ10737 within a commonly deleted region at 1p36 in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2007;43:607-616
72. Martinsson T, Weith A, Cziepluch C, Schwab M. Chromosome 1 deletions in human neuroblastomas: generation and fine mapping of microclones from the distal 1p region. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:67-78
73. Martinsson T, Sjoberg RM, Hedborg F, Kogner P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res* 1995;55:5681-5686
74. Peter M, Michon J, Vielh P, et al. PCR assay for chromosome 1p deletion in small neuroblastoma samples. *Int J Cancer* 1992;52:544-548
75. Ritke MK, Shah R, Valentine M, Douglass EC, Tereba A. Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in neuroblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 1989;50:84-90

76. Weith A, Martinsson T, Cziepluch C, et al. Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:159-166
77. Takeda T, Shimada M, Iizuka S, Takasugi N. Effects of mass screening for neuroblastoma and the presumptive natural history of this tumor. *Prog Clin Biol Res* 1994;385:383-388
78. Maris JM, Weiss MJ, Guo C, et al. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000;18:1888-1899
79. Spitz R, Hero B, Westermann F, et al. Fluorescence in situ hybridization analyses of chromosome band 1p36 in neuroblastoma detect two classes of alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:299-305
80. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005;353:2243-2253
81. Guo C, White PS, Weiss MJ, et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999;18:4948-4957
82. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 2009;100:1471-1482
83. Maris JM, Hii G, Gelfand CA, et al. Region-specific detection of neuroblastoma loss of heterozygosity at multiple loci simultaneously using a SNP-based tag-array platform. *Genome Res* 2005;15:1168-1176
84. Guo C, White PS, Hogarty MD, et al. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:544-546
85. Agathangelou A, Bieche I, Ahmed-Choudhury J, et al. Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Res* 2003;63:5344-5351
86. Hoebeck J, Vandesompele J, Nilsson H, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene expression level has prognostic value in neuroblastoma. *Int J Cancer* 2006;119:624-629

87. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:52-58
88. Volchenbom SL, Li C, Li S, et al. Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 2009;69:4143-4149
89. Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, et al. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:28-31
90. Gilbert F, Feder M, Balaban G, et al. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* 1984;44:5444-5449
91. Jeison M, Ash S, Halevy-Berko G, et al. 2p24 Gain region harboring MYCN gene compared with MYCN amplified and nonamplified neuroblastoma: biological and clinical characteristics. *Am J Pathol* 2010;176:2616-2625
92. Stallings RL, Howard J, Dunlop A, et al. Are gains of chromosomal regions 7q and 11p important abnormalities in neuroblastoma? *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140:133-137
93. Pezzolo A, Rossi E, Gimelli S, et al. Presence of 1q gain and absence of 7p gain are new predictors of local or metastatic relapse in localized resectable neuroblastoma. *Neuro Oncol* 2009;11:192-200
94. Su WT, Alaminos M, Mora J, et al. Positional gene expression analysis identifies 12q overexpression and amplification in a subset of neuroblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154:131-137
95. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1999;340:1954-1961
96. Bown N, Lastowska M, Cotterill S, et al. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:14-19
97. Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD, et al. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer* 1997;33:1627-1633
98. Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet* 1994;55:334-340

99. Van Roy N, Vandesompele J, Berx G, et al. Localization of the 17q breakpoint of a constitutional 1;17 translocation in a patient with neuroblastoma within a 25-kb segment located between the ACCN1 and TLK2 genes and near the distal breakpoints of two microdeletions in neurofibromatosis type 1 patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35:113-120
100. Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, et al. Distal chromosome 17 gains in neuroblastomas detected by comparative genomic hybridization (CGH) are associated with a poor clinical outcome. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:11-13
101. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:4835-4840
102. Caren H, Kryh H, Nethander M, et al. High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4323-4328
103. Albertson DG. Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 2006;22:447-455
104. Squire JA, Thorner PS, Weitzman S, et al. Co-amplification of MYCN and a DEAD box gene (DDX1) in primary neuroblastoma. *Oncogene* 1995;10:1417-1422
105. Vasudevan SA, Nuchtern JG, Shohet JM. Gene profiling of high risk neuroblastoma. *World J Surg* 2005;29:317-324
106. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9:319-325
107. Storlazzi CT, Lonoce A, Guastadisegni MC, et al. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure. *Genome Res* 2010;20:1198-1206
108. Van Roy N, Vandesompele J, Menten B, et al. Translocation-excision-deletion-amplification mechanism leading to nonsyntenic coamplification of MYC and ATBF1. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:107-117
109. Tower J. Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet* 2004;38:273-304
110. Shimizu N, Ochi T, Itonaga K. Replication timing of amplified genetic regions relates to intranuclear localization but not to genetic activity or G/R band. *Exp Cell Res* 2001;268:201-210

111. Grinberg-Rashi H, Cytron S, Gelman-Kohan Z, Litmanovitch T, Avivi L. Replication timing aberrations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Neoplasia* 2010;12:668-674
112. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Jr., et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:405-416
113. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86:364-372
114. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1988;6:1874-1881
115. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466-1477
116. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821
117. Villamon E, Piqueras M, Mackintosh C, et al. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch* 2008;453:47-55
118. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57
119. Villamon E, Piqueras M, Berbegall AP, et al. Comparative study of MLPA-FISH to determine DNA copy number alterations in neuroblastic tumors. *Histology and Histopathology* 2011;26:343-350
120. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions. *Human Mutation* 2004;23:413-419
121. Ambros IM, Brunner B, Aigner G, et al. A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:792-804
122. Chughtai SA, Genus T, Ramani P, et al. Multilocus loss of heterozygosity allelotypes identify a genetic pathway associated with progression from low to high stage disease in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2006;42:1826-1834

123. George RE, Attiyeh EF, Li S, et al. Genome-wide analysis of neuroblastomas using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *PLoS One* 2007;2:e255
124. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1026-1033
125. Lastowska M, Viprey V, Santibanez-Koref M, et al. Identification of candidate genes involved in neuroblastoma progression by combining genomic and expression microarrays with survival data. *Oncogene* 2007;26:7432-7444
126. Mora J, Cheung NK, Oplanich S, Chen L, Gerald WL. Novel regions of allelic imbalance identified by genome-wide analysis of neuroblastoma. *Cancer Res* 2002;62:1761-1767
127. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer* 2001;91:680-686
128. Schleiermacher G, Michon J, Huon I, et al. Chromosomal CGH identifies patients with a higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *Br J Cancer* 2007;97:238-246
129. Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci* 2010;101:2295-2301
130. Speleman F, De Preter K, Vandesompele J. Neuroblastoma genetics and phenotype: a tale of heterogeneity. *Semin Cancer Biol* 2011;21:238-244
131. Deyell RJ, Attiyeh EF. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet* 2011;204:113-121
132. White PS, Maris JM, Beltinger C, et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5520-5524
133. White PS, Thompson PM, Gotoh T, et al. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 2005;24:2684-2694
134. Maris JM, Guo C, White PS, et al. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:24-27
135. Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 2005;17:7-13

136. Yu M, Ohira M, Li Y, et al. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int J Oncol* 2009;34:931-938
137. Mora J, Gerald WL, Cheung NK. Evolving significance of prognostic markers associated with new treatment strategies in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003;197:119-124
138. Caren H, Erichsen J, Olsson L, et al. High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene. *BMC Genomics* 2008;9:353
139. Giordani L, Iolascon A, Servedio V, et al. Two regions of deletion in 9p22- p24 in neuroblastoma are frequently observed in favorable tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;135:42-47
140. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the I $\kappa$ B $\alpha$  gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I $\kappa$ B $\alpha$ . *Oncogene* 1999;18:3063-3070
141. Villamon E, Piqueras M, Berbegall AP, et al. Comparative study of MLPA-FISH to determine DNA copy number alterations in neuroblastic tumors. *Histol Histopathol* 2011;26:343-350
142. Luttkhuis ME, Powell JE, Rees SA, et al. Neuroblastomas with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Br J Cancer* 2001;85:531-537
143. Hoebeeck J, Michels E, Menten B, et al. High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggests commonly involved 3p21-p22 tumor suppressor genes in neuroblastoma and more frequent tumors. *Int J Cancer* 2007;120:533-538
144. Ando K, Ohira M, Ozaki T, et al. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int J Cancer* 2008;123:2087-2094
145. Michels E, Hoebeeck J, De Preter K, et al. CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23. *BMC Cancer* 2008;8:173
146. Spitz R, Oberthuer A, Zapatka M, et al. Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:1130-1142




147. Goren A, Cedar H. Replicating by the clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:25-32

## **8. EKLER**

### **Ek1. Etik Kurul Raporu**

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

Tarih ve Sayı: 23.07.2007/ 274

<p><b><u>Etik Kurul Üyeleri</u></b> Prof.Dr.Taner ÇAMSARI Prof.Dr.Tunç ALKIN Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK Doç.Dr.Mustafa SEÇİL Doç.Dr.Murat DUMAN Doç.Dr.Güven ASLAN Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN Yunus KARSLI</p> <p><b><u>Etik Kurul Başkanı</u></b> Prof.Dr.Taner ÇAMSARI</p> <p><b><u>Etik Kurul Sekreteri</u></b> Hatice İĞÇİ</p>	<p style="text-align: center;"><b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,</b></p> <p>Etik Kurulumuzun 19 Temmuz 2007 tarih ve 11/18/2007 no.lu toplantısında, 241/2007 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yard.Doç.Dr.Oğuz ALTINGÖZ'ün sorumlusu olduğu "Nöroblastik tümörlerdeki bölgesel DNA kopya sayısı değişikliklerinin, allelik dengesizliklerin tanımlanması ve Schwann hücresi-Bnöroblastik hücre etkileşiminin hücre hattı modellerinde araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.</p> <p>Katılanların oy birliği ile karara verilmiştir.</p> <p>Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.</p> <p style="text-align: right;"> <b>Prof. Dr.Taner ÇAMSARI</b> <b>Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları</b> <b>Etik Kurul Başkanı</b></p> <p style="text-align: center;">NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır</p>
---	--

Tel: 0232 412 22 54

## Ek2. Bilgilendirilmiş Onam Formu.



### TÜRK PEDIATRİK ONKOLOJİ GRUBU NÖROBLASTOMA TEDAVİ PROTOKOLÜ GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU



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

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

#### Tanı veya tedavi amaçlı test yapılması:

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

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

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

\*Hasta küçük çocuk ise velayet sahibi belirtilecektir.

Bu form bir sayfadır ve bir kopyası hastaya/yakınına verilmiştir.

## Ek.3 Özgeçmiş

### ÖZGEÇMİŞ ve ESERLER LİSTESİ

16 Mayıs 2013

#### 1. Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Sait Tümer

**Akademik Ünvanı:** Araştırma Görevlisi

**Adres:** Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. 35340 Balçova-İzmir

**Tel:** 532 450 18 60

**E-Posta:** sait.tumer@deu.edu.tr

**Medeni Hali:** Evli

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 13 Temmuz 1979, İzmir

#### 2. Eğitim

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
<b>Doktora</b>	Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	21.05.2013
<b>Yüksek Lisans</b>	Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	2007
<b>Lisans</b>	Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	Celal Bayar Üniversitesi, Manisa	2003
<b>Ön Lisans</b>	Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Programı	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	1999

#### Doktora Tezi:

Tümer, S, “Nöroblastik Tümörlerdeki Bölgesel DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin ve Allelik Dengesizliklerin Tanımlanması”, Bitirme Aşamasında, İzmir. Danışman Öğretim Üyesi: Doç Dr. Oğuz Altungöz.

### **Yüksek Lisans Tezi:**

Tümer, S, “*Kalıtımsal ve Non-Sendromik İşitme Kaybı Olgularının Aday Lokuslardaki Mutasyonel Analizi*” 2007, İzmir. Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç Dr. Oğuz Altungöz.

### **Uzmanlık Alanı:**

- Hematolojik maligniteler ve solid tümörlerde (Nöroblastom) kromozomal değişimlerin moleküler sitogenetik tekniklerle tanımlanması.
- Marker kromozomların kökenlerinin moleküler sitogenetik tekniklerle tanımlanması.
- Prenatalde sitogenetik ve moleküler sitogenetik tanı teknikleri.
- Spontan abortus sitogenetiği.
- Kalıtsal hastalıklarda mutasyon ve genotip analizleri.
- Kantitatif DNA kopya sayısı analizleri (MLPA) ve nöroblastik tümörlerdeki klinik anlamı.
- Protein düzeyinde gen ifadesi analizleri.
- Array-CGH analizleri.
- Genom gezgini ve mutasyonel analiz araçlarının kullanımı.

### **3.Görevler:**

<b>Görev Ünvanı</b>	<b>Görev Yeri</b>	<b>Yıl</b>
Ar.Gör.	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2004-2013

### **4.Projelerde Yaptığı Görevler:**

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

**4.2.** *Nöroblastom Hücre Hatlarındaki miRNA Ekspresyon Profilleriyle Genetik Parametreler Arasındaki İlişkilerin Araştırılması.* Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2009-2012.

**4.3.** *Nöroblastik Tümörlerdeki Prognostik DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin Saptanması.* Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Destek Programı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2009-2010.

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

**4.5.** *Ph(+)* Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında der(9) Delesyonlarının ve Hastalık Prognozundaki Etkisinin Dual Füzyon in situ Hibridizasyon Yöntemi ile Araştırılması. TÜBİTAK Hızlı Destek Programı, Proje No: 105S024 (SBAG-HD-8). Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2005-2006.

**4.6.** *Helicobacter pylori* ve claritromycin direncinin parafin bloklarda FISH yöntemi ile belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2005-2007.

**4.7.** Kalıtsal ve Non-sendromik İşitme Kayıplarında Aday Lokusların Mutasyonel Analizi. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2004-2006.

**4.8.** *Nöroblastoma* Tümörlerinde Genetik Değişikliklerin Saptanması. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG), Nöroblastoma Protokolü Kapsamında ([www.tpog.org.tr/tpog.pdf](http://www.tpog.org.tr/tpog.pdf)) Projedeki Görevi: TPOG-NBL Protokolü Genetik Çalışmaların Sürdürülmesi, 2003-2012

**4.9.** *İskemik Ön koşullandırma ile Oluşan NO Artışının NFκB Üzerine Etkisi*. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı. Projedeki Görevi: Araştırmacı, 2003-2004.

## 5.Ödüller:

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

**5.2. Poster Bildiri 1.lik Ödülü:** **Tümer S**, Altungöz O, Kırkım G, Şerbetçioğlu B. “Kalıtsal ve Non-Sendromik İşitme Kaybı Olgularının Aday Lokuslardaki Mutasyonel Analizi”. IV. Sağlık Bilimleri Günü 26 Ekim 2007, İzmir.

**5.3. Yüksek Lisans Mezuniyet Birinciliği.** Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007

**5.4. Sözlü Bildiri 1.lik Ödülü:** Aygün N, Altungöz O, **Tümer S**, Özer E, Olgun N, Sakızlı M (TPOG, NBL 2003 Tedavi Protokolü Hazırlama Kurulu Adına). “Nöroblastom Olgularının MYCN ve 1p36 Lokuslarındaki Genetik Dengesizliklerin Moleküler Sitogenetik Yaklaşımlarla Değerlendirilmesi”. 16. Ulusal Kanser Kongresi 20-24 Nisan 2005, Antalya.

**5.5. Sözlü Bildiri 1.lik Ödülü:** Karademir S, **Tümer S**, Astarçioğlu H, Altungöz O, Tuncel P, Sağol Ö, Derici S, Astarçioğlu İ. “Sıçan hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullandırma: nitrik oksid'in Nfkb yolağındaki rolü”. 22. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, 30 Ağustos-4 Eylül 2005, Malatya. The Turkish Journal of Gastroenterology; 2005: 16; 23

## 6.Eserler

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

**6.A1.** Bağcı O, Tümer S, Olgun N, Altungöz O. “Copy number status and mutation analyses of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors”, *Cancer Lett*, 317(1): 72–77 (2012).

**6.A2.** Özer E, Altungöz O, Ünlu M, Aygün N, Tümer S, Olgun N. “Association of MYCN Amplification and 1p Deletion in Neuroblastoma with High Tumor Vascularity”, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 15(2):181-186 (2007).

**6.A3.** Demiray E, Tümer S, Yılmaz Ö, Altungöz O, Yörükoğlu K, Soytürk M, Şimşek İ. “Detection of *Helicobacter pylori* and Determination of Clarithromycin Susceptibility Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Gastric Biopsy Specimens by Fluorescent In Situ Hybridization”, *Helicobacter*, 12(2):136-141 (2007).

**6.A4.** Altungöz O, Aygün N, Tümer S, Özer E, Olgun N, Sakızlı M. “Correlation of Modified Shimada Classification with MYCN and 1p36 Status Detected by Fluorescence In Situ Hybridization in Neuroblastoma”, *Cancer Genet Cytogenet*, 172(2):113-119 (2007).

### **B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :**

**6.B1.** Tümer S, Bağcı O, Olgun N, Altungöz O “Significance of Multilocus Analyses in Neuroblastoma.” EMBO Young Scientists’ Forum 14-16 June Istanbul (Basılmadı).

**6.B2.** Tümer S, Bağcı O, Olgun NH, Altungöz O. “Detection of Multiple Genetic Changes in Neuroblastoma by MLPA”. In vivo 25: 565-565. IV. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul, June 2011.

**6.B3.** Çağlar HO, Tümer S, Bağcı O, Olgun NH, Altungöz O. “PHOX2B Gene Mutations in Neuroblastomas”. In vivo 25: 517-518. IV. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul, June 2011.

**6.B4.** Yılmaz O, Demiray E, Bekmen N, Oskouei DD, Tümer S, Soytürk M, Sagol O, Akpınar H, Simsek I. “*Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing: histopathology through culture to FISH”. *Helicobacter*, 2009; 14 (4): 344-344. (European helicobacter study group (EHSG) XXIIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer, September 2009, Portugal).

**6.B5.** Perez Perez GI, Yılmaz O, Olivares A, Demiray E, Tümer S, Sagol O, Gonen C, Soytürk M, Simsek I. “Detection of *H. pylori* and Clarithromycin Susceptibility by FISH and Traditional Methods”. *Helicobacter*, 2008; 13 (5); 408-408. (XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer, September 2008, Lativa).

**6.B6.** Demiray E, **Tümer S**, Perez GIP, Olivares AZ, Sagol O, Altungöz O, Soyutürk M, Yılmaz O. “A new approach in the determination of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* infection”. *Helicobacter*, 2007; 12 (4); 389-389. (European helicobacter study group (EHSG) XXth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation, September 2007, İstanbul).

**6.B7.** Özer E, Altungöz O, Ünlü M, Aygün N, **Tümer S**, Olgun N. “The Association of *MYCN* Amplification and 1p Deletion in Neuroblastomas with High Tumor Vascularity”, 52nd Annual Meeting of the Paediatric Pathology Society, September 14-16 2006, Liverpool, UK, Abstract Book, pp. O2.

**6.B8.** Demiray E, **Tümer S**, Yılmaz Ö, Altungöz O, Yörükoğlu K, Soyutürk M, Şimşek İ. “Detection of *Helicobacter pylori* and Clarithromycin Resistance by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) Method in Turkish Dyspeptic Patients”. *Helicobacter*, 2006;11(4):399-400. (XIXth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation, September 7-9, 2006, Wrocław, Poland).

**6.B9.** Karademir S, **Tümer S**, Astarıcıoğlu H, Altungöz O, Tuncel P, Sağol Ö, Derici S, Astarıcıoğlu İ. “Nitric Oxide Induced by Ischemic Preconditioning Fails to Stabilize NFκB/IκB Complex During Hepatic Ischemia and Reperfusion in Rat”, *Liver Transplant*, 2005;11(7):C-41 (164). (International Liver Transplantation Society 11th Annual International Congress, July 20-23, 2005 Los Angeles, California).

#### **C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :**

**6.C1.** Akdemir N, Okyay E, **Tümer S**, Özer E, Güleklı B. “*Spontan abortus spesimenlerinin histopatolojik bulguları ile fetal karyotipik değişikliklerin korelasyonu*”. *Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi*, 2008; 22(1):25-28.

#### **D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

**6.D1.** Çağlar HO, **Tümer S**, Bağcı Ö, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O.”*Nöroblastik Tümörlerde PHOX2B Geni Kopya Sayısı Değişimlerinin QPCR ile Saptanması.*” Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;(31):S76 (Suppl). XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, Ekim 2011.

**6.D2.** **Tümer S**, Bağcı Ö, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O. “*Nöroblastom Olgularında Çoklu Genetik Değişikliklerin MLPA ile Saptanması*”. 19. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, Nisan 2011.

**6.D3.** Bağcı Ö, **Tümer S**, Güneş D, Olgun NH, Altungöz O. “*Sporadik Nöroblastomda 2p23.2-2p24.3 Kromozom Bölgesindeki Segmental Dengesizliklerle ALK Geni Değişiklikleri Arasındaki İlişki*”. 16. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Samsun, Mayıs 2010.

**6.D4.** Kırkım G, Şerbetçioğlu B, **Tümer S**, Altungöz O. “*35delG Mutasyonuna Bağlı İşitme Kayıplarında Odyolojik Değerlendirme*”, 30. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz Bağ Boyun Cerrahisi Kongresi, Kumluca, Ekim 2008.



**6.D5.** Akdemir N, Okyay R, **Tümer S**, Özer E, Gülekli B. “*Spontan Abortus Spesmenlerinin Histopatolojik Bulguları ile Fetal Karyotipik Değişikliklerin Korelasyonu*”. 6. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, Antalya, 14-19 Mayıs 2008.

**6.D6.** Bora E, Giray Bozyaka Ö, Altungöz O, **Tümer S**, Ülgenalp A, Erçal D. “*8q Duplikasyonu: Bir Olgu Sunumu*”. VIII. Tıbbi Genetik Kongresi, 06-09 Mayıs 2008, Çanakkale. Bildiri Kitabı s. 289 (PS-182).

**6.D7.** **Tümer S**, Altungöz O, Kırım G, Şerbetçioğlu B. ”*Ege Bölgesindeki 88 Pre-lingual İşitme Kaybı Olgusunda GJB2 (CX26) Genindeki Mutasyon Türleri ve Sıklığı*”, (Sözlü Bildiri) X. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007. Bildiri Kitabı s. 83 (S5).

**6.D8.** Altungöz O, **Tümer S**, Ay E, Çakmakoğlu Ş, Ay Ö, Paralı F, Eresen Ç, Sakızlı M. “*Prenatal Tanıda Saptanan İlave Marker Kromozomlar (SSMC): Prevalans ve Kromozomal Köken*”, (Sözlü Bildiri) X. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007. Bildiri Kitabı s. 101 (S23).

**6.D9.** Yıldırımcan Ş, Eresen Yazıcıoğlu Ç, Aydoğdu Dinç Z, **Tümer S**, Altungöz O, Kargı A, Sakızlı M. “*Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanselerinde Fluoresan in situ Hibridizasyon ile HER-2/neu Amplifikasyonunun Saptanması*”, X. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007. Bildiri Kitabı s. 146 (P26).

**6.D10.** Demiray E, **Tümer S**, Yılmaz Ö, Altungöz O, Yörükoğlu K, Soytürk M, Şimşek İ. “*Helicobacter pylori ve Klaritromisin Direncinin Floresan İn Situ Hibridizasyon Metodu (FISH) ile Saptanması*”, XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Eylül 2006, Belek, Antalya. Bildiri Kitabı s. 412 (P62).

**6.D11.** Özer E, Altungöz O, Ünlü M, Aygün N, **Tümer S**, Olgun N. “*Nöroblastomlarda MYCN Amplifikasyonu ve 1p Delesyonunun Artmış Tümör Vasküleritesi ile Birlikteliği*”, 18. Ulusal Patoloji Sempozyumu: Onkolojik Patoloji, 7-11 Mayıs 2006, Çeşme. Bildiri Kitabı s. 220 (066).

**6.D12.** Karademir S, **Tümer S**, Astarçioğlu H, Altungöz O, Tuncel P, Sağol Ö, Derici S, Astarçioğlu İ. “*Sıçan Hepatik İskemi-Reperfüzyon Modelinde İskemik Önkoşullandırma: Nitrik Oksid’in NFκB Yolağındaki Rolü*”, 22. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, 30 Ağustos – 4 Eylül 2005, Malatya. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 16(Supl 1):23 (SB.03/3).

**6.D13.** Aygün N, Altungöz O, **Tümer S**, Özer E, Olgun N, Sakızlı M. “*Nöroblastom Olgularının MYCN, 1p36 Lokuslarındaki Genetik Değişikliklerin Moleküler Sitogenetik Olarak Değerlendirilmesi*”, XVI. Ulusal Kanser Kongresi, 20-24 Nisan 2005, Antalya.

#### **E. Yayınlarına Yapılan Atıflar**

**6.E1.** SCI Kapsamında (SCI Web of Science): 23 atf (16.05.2013)

## **7.Katıldığı Bilimsel Etkinlikler**

- 7.1.** EMBO Young Scientists' Forum Istanbul, 2012 (Poster Sunu).
- 7.2.** 4. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi, İstanbul, 2011 (Poster Sunu).
- 7.3.** Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Teorik Kursu, İzmir, 2011 (Katılımcı).
- 7.4.** EMBL-EBI Uygulamalı Biyoinformatik Kursu, İzmir, 2010 (Katılımcı).
- 7.5.** Sağlık Bilimleri Müdürleri XXII. Toplantısı, Eskişehir, 2010 (Katılımcı).
- 7.6.** 3. Ege Genetik Sempozyumu, Denizli, 2007 (Katılımcı).
- 7.7.** 10.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2007 (Poster ve Sözlü Sunu).
- 7.8.** Sağlık Bilimleri Enstitüsü Seminerleri, İzmir, 2007 (Davetli Konuşmacı).
- 7.9.** 31. Uluslararası FEBS kongresi, İstanbul, 2006 (Katılımcı).
- 7.10.** Bilimsel Araştırmalar: Bilgi Üreten Topluma Geçiş, İzmir, 2006 (Katılımcı).
- 7.11.** Apoptosis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri, İzmir, 2006 (Katılımcı).
- 7.12.** 1. Ege Genetik Sempozyumu, İzmir, 2005 (Katılımcı-Bildiri Sunma).
- 7.13.** 9. Tıbbi Biyoloji Kongresi, Manisa, 2005 (Katılımcı).
- 7.14.** Serbest Radikaller, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, İzmir, 2005 (Katılımcı).
- 7.15.** 16. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, 2005 (Katılımcı-Bildiri Sunma).
- 7.16.** Moleküler Kanser Sempozyumu, İzmir, 2004 (Katılımcı).

## **8.Verilen Dersler**

- 8.1.** Mezuniyet sonrası "TBG 5022 Sitogenetik" dersi, insan kromozomları uygulamalarının yürütülmesi ve derse asist.
- 8.2.** Mezuniyet sonrası "TBG 5029 Temel Moleküler Yöntemler I" dersi uygulamalarının yürütülmesi.



## Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors

Ozkan Bagci<sup>a,1</sup>, Sait Tumer<sup>a,1</sup>, Nur Olgun<sup>b</sup>, Oguz Altungoz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Biology and Genetics, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Izmir, Turkey

<sup>b</sup>Department of Pediatric Oncology, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Izmir, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 April 2011

Received in revised form 5 November 2011

Accepted 8 November 2011

#### Keywords:

Neuroblastoma

*ALK*

2p24.1 locus

MLPA

### ABSTRACT

Somatic and germline mutations of the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene were recently described in neuroblastoma (NB). In this study, we investigated the association of *ALK* copy number alterations with copy number status 2p24.1 amplicon harboring DEAD box polypeptide 1 (*DDX1*), *MYCN* and neuroblastoma-amplified (*NAG*) genes in 90 primary tumors of sporadic NB cases by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). We also performed mutation analysis of *ALK* gene by directly sequencing the exons 20–28 which cover the region that encodes juxtamembrane and kinase domains. A total of 39 (43.3%) NB cases revealed copy numbers alterations of *ALK* gene. There was highly significant association of *ALK* copy number gains with gains of one or more of the genes at 2p24.1 (*DDX1*, *MYCN* or *NAG*) in *MYCN* unamplified tumors ( $P < 0.000$ ). In addition, 15 of 17 *MYCN* amplified cases (88.2%) had aberrant *ALK* status. Solitary gain of *ALK* with normal copy number status of all other genes was observed only in one case. DNA sequencing of exons 20–28 of *ALK* revealed two different nucleotide changes in three cases leading to amino acid substitutions of F1245V and R1275Q in tyrosine kinase domain. In conclusion, the frequency of *ALK* mutations in NB is low and solitary copy number change of it is rarely observed.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Neuroblastoma (NB) is an embryonic tumor of the neuroectodermal cells that stem from the neural crest and differentiate into sympathetic neurons and adrenal medulla. It is the most common extracranial solid tumor in childhood and accounts for nearly 15% of all pediatric cancer deaths [1]. The distinctive clinical characteristics of NB are variability in its behavior, ranging from spontaneously regressing tumors in a few patients to chemoresistant, aggressive, and disseminated tumors in most cases [1,2].

The biological characteristics of NB are complex aneusomies, aneuploidies, and ploidy shifts acquired by the tumor cells, and some of these chromosomal changes are known to be associated with clinical behavior. The most commonly observed aneusomies include gains of 17q and deletions or allelic losses of 1p and 11q [1–9]. Combinations of these and other less prevalent genetic changes are detected in different genetic and clinical subsets of NB's, and shown to be associated with tumor phenotype [10,11]. Notwithstanding intensive investigation to map the shortest region of overlaps at deleted segments of 1p and 11q, a consistently

involved candidate tumor suppressor gene has not yet been identified. Similarly, although *PPM1D* has been reported to be the most likely target [12], genes with a recurrent oncogenic role at the minimal common region of gains at 17q remain to be identified. For years, *MYCN* was the only oncogene known to be involved recurrently in approximately 22% of tumors, and the *MYCN* protein is overexpressed via high copy number gains of the gene in tumors with advanced stages and aggressive clinical behavior [13–16].

Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) is a membrane associated tyrosine kinase receptor encoded by the *ALK* gene located in the 2p23 chromosomal region, proximal to the *MYCN* amplicon on 2p24.1 [17]. It was originally identified as part of the transforming fusion tyrosine kinase, nucleophosmin-*ALK*, which is formed as a result of the t(2;5)(p23;q25) translocation associated with anaplastic large cell lymphoma (ALCL) [18,19]. Genome-wide scanning for linkage at single nucleotide polymorphisms (SNPs) and bacterial artificial chromosome (BAC)-array comparative genomic hybridization (CGH) approaches revealed germline and activating somatic mutations of the *ALK* gene in both hereditary and sporadic NB [20–24]. Consistent, but less frequently occurring high-level amplification of *ALK* was also detected. In addition, constitutive and increased kinase activity of mutated *ALK* protein was shown in these studies. Inhibition of some mutant forms of *ALK* in human NB cell lines resulted in apoptosis and impaired cell proliferation, demonstrating *ALK* a potential therapeutic target for this disease [21].

\* Corresponding author. Address: Department of Medical Biology and Genetics, Dokuz Eylul University, School of Medicine, 35340 Balçova, Izmir, Turkey. Tel.: +90 232 412 4605, mobile: +90 505 635 3435; fax: +90 232 412 4635.

E-mail address: [oguz.altungoz@deu.edu.tr](mailto:oguz.altungoz@deu.edu.tr) (O. Altungoz).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

In this study, we analyzed the copy number changes of *ALK* in relation to the copy number status of the 2p24.1 amplicon harboring DEAD box polypeptide 1 (*DDX1*), *MYCN*, and neuroblastoma-amplified (*NAG*) genes in 90 primary tumors of sporadic NB cases by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). In addition, we performed mutation analysis of the *ALK* gene by directly sequencing exons 20–28 which cover the region that encodes the juxtamembrane and kinase domains.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and tumor samples

Patients presented between January 2000 and September 2010 at any one of the 26 Turkish centers, and were registered with the Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG), Neuroblastoma Protocol. Histologically proven primary NB tumor specimens from a total of 90 patients (54 boys and 36 girls) obtained during surgery or biopsy were subjected to copy number status and mutation analyses after informed consent was obtained from the parents of each patient. The study was approved by the Local Ethics Committee of Dokuz Eylul University, School of Medicine. The patients' ages ranged from 1 month to 17.5 years, with a median of 18.5 months. All specimens were obtained at diagnosis prior to therapy as fresh tumor samples (excisional biopsies from 85 cases and Tru-cut biopsies from five cases). The samples were immediately frozen upon arrival to the laboratory and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The patients were diagnosed and staged according to the International Neuroblastoma Staging System (INSS) [25]. Staging information was available for 67 patients, the distribution of stages being as follows: stage 1 (8 patients), 2 (10 patients), 3 (16 patients), 4 (28 patients), and 4s (5 patients). All of the cases were classified according to the International Neuroblastoma Pathology Classification System (INPC) and the distribution of subtypes was as follows: 21 NB, undifferentiated; 24 NB, poorly differentiated; 16 NB, differentiating, and 29 NB, NOS.

### 2.2. Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen fresh tumor samples using a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany), following the manufacturer's instructions. Concentration and purity of isolated tumor DNA samples were quantified by ND-1000 spectrophotometry (NanoDrop, Wilmington, DE, USA).

### 2.3. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Copy number status of *ALK* and the genes that reside in the 2p24 chromosome band (*NAG*, *DDX1*, and *MYCN*) were determined by MLPA. Genomic DNA samples (200 ng) were hybridized with MLPA P252 probe mix (MRC-Holland, The Netherlands) containing probes for *NAG*, *DDX1*, *MYCN*, and *ALK* genes as well as other loci located on chromosomes 2 and 17. Detection of at least one segmental chromosome aberration by one of the NB specific MLPA kits (P251, P252, and P253) according to the guidelines suggested by Ambros et al. [26] (except threshold levels) or detection of at least 50% clonal hyperdiploidy by FISH were used as criteria for sufficiently detectable tumor DNA content. The MLPA kits contain probes for 19 chromosomal regions located in 10 different chromosomes known to be recurrently involved in NB [26]. The probe mixes also contain control probes complementary to chromosomal regions rarely altered in NB. Following the ligation step, samples were subjected to PCR reactions using 6-FAM labeled common primer sets. Amplified PCR products were separated with an Applied Biosystems 3130x1 Genetic Analyzer, and fragments were analyzed using GeneMapper software v4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The peak area data from GeneMapper software were imported into a spreadsheet-based automated analysis program, Coffalyzer MLPA-DAT v9 (MRC Holland, The Netherlands) with which data normalization and calculation of probe ratios were performed. The threshold ratio levels for copy number status as established by the manufacturer were used. Probe ratios between 0.7 and 1.3 were defined as normal. Ratios below and above the normal range were defined as deletion and gain, respectively, while ratios exceeding 10.0 were defined as high copy number amplification.

### 2.4. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

To confirm the MLPA results of the 2p24 amplicon, FISH targeting *MYCN* locus was performed for all tumor samples. A direct fluorochrome-labeled, dual color DNA probe cocktail (Kreatech Biotechnology, Cat. No. KI-10706 or Q-Biogene, Cat. No. PONCO224) for *MYCN*-2p24 and reference loci (LAF-2q11 or  $\alpha$ -satellite DNA at the centromeric region of chromosome 2) was hybridized to touch-preparation slides of fresh tumor samples. Hybridizations and washings were carried out according to the stringency conditions and the procedures recommended by the manufacturers. Dual-color fluorescent signals were detected and analyzed under epifluorescence microscopy equipped with specific filter sets.

At least 200 interphase nuclei were analyzed and scored by two independent investigators. As in the case of the MLPA analyses, samples having signal ratios (*MYCN* copies relative to reference signals) of at least 10-fold were considered as amplification.

### 2.5. DNA sequencing

Mutations in exons 20–28 of the *ALK* gene, which covers the juxtamembrane and kinase domains, were examined in tumor genomic DNA's by direct sequencing analysis using an Applied Biosystems 3730x1 Genetic Analyzer. Primer sets as designed in a previous study by Chen et al. were used in eight different PCR reactions for each tumor sample [22]. Exons 21 and 22 were included in an amplicon covered by a single primer pair. Mutant fragments were confirmed by bi-directional and repeated sequencing, establishing new PCR reactions. Sequence data were analyzed via Mutation Surveyor v. 3.30 software (SoftGenetics, LLC State College, PA USA).

### 2.6. Statistical analyses

Biological relevance of genetic parameters investigated in this study was evaluated using Fisher's exact and McNemar's chi-square ( $\chi^2$ ) tests.

## 3. Results

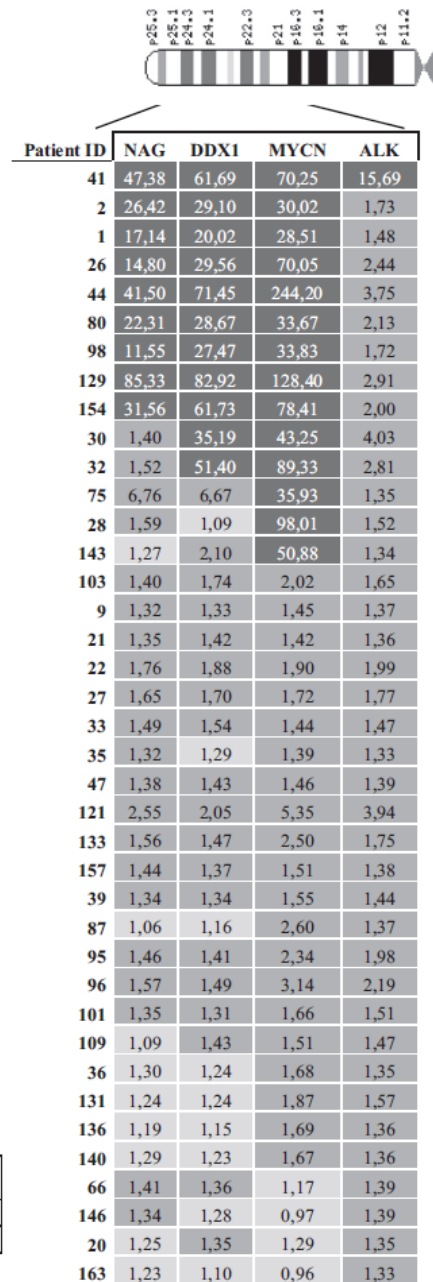
### 3.1. *DDX1*, *MYCN*, *NAG*, and *ALK* gene copy numbers

MLPA analysis revealed copy number alterations of the *ALK* gene in 39 of the 90 NB cases (43.3%). All copy number alterations of *ALK* were gains ranging between 1.33- and 4.03-fold except one case in which a 15.69-fold amplification was observed (Supplementary Tables 1 and 4). Fig. 1 shows the copy number status of three genes at the 2p24.1 chromosome band in all cases that displayed *ALK* copy number alterations. For the *ALK*-amplified case, *MYCN*, *DDX1* and *NAG* genes were also found to be amplified. *MYCN* amplification was detected in 17 cases (18.9%) and *ALK* status was normal in only three of the 17 *MYCN*-amplified patients. In the 37 cases with *ALK* gain, the gain of at least one of the genes at 2p24.1 was also observed. In 35 patients (38.9%), *MYCN* and *ALK* copy number alterations were detected together. Among cases with *MYCN* amplification, *DDX1* and *NAG* genes were found to be co-amplified in 13 (76.5%) and 11 (64.7%) tumors, respectively. All 11 tumors with *NAG* amplification also had *DDX1* amplification. There was complete concordance between the FISH and MLPA results in all tumors with *MYCN* amplification. However, FISH and MLPA results were discordant for three cases (case no: 38, 64, and 118). While FISH analysis displayed single *MYCN* copy gain in about 50% of the cells, MLPA peak ratios of *MYCN* locus were close to the borderline in these three cases (Supplementary Tables 1 and 2).

The frequency of *ALK* alterations and its association with the status of genes residing in the 2p24.1 amplicon in NB's are given Table 1. There was a highly significant association of *ALK* copy number gains with gains of one or more of the genes at 2p24.1 (*DDX1*, *MYCN* or *NAG*) in *MYCN*-unamplified tumors ( $P < 0.000$ ). *ALK* gains were also found to be highly associated in tumors with gains of all three genes together (*DDX1*, *MYCN*, and *NAG*) ( $P < 0.000$ ). The solitary gain of *ALK* with normal copy number status of all other genes was observed only in one case (Fig. 1).

### 3.2. DNA sequence analysis of *ALK*

DNA sequencing of exons 20–28 of *ALK* (that codes the juxtamembrane and kinase domains) revealed two different nucleotide substitutions in three out of 90 (3.3%) primary NB tumors (Table 2). Two nucleotide changes leading to amino acid substitutions (F1245V and R1275Q) were in the tyrosine kinase domain. One of the two cases with the *ALK* R1275Q mutation had *MYCN* amplification. In addition, a single nucleotide polymorphism (SNP) rs3795850 (c.3375C > A), which is a synonymous coding variant,



**Fig. 1.** Copy number status of the 2p24.1 chromosome band in relation to aberrant *ALK* status detected by MLPA. Mean value of probe ratio figures (pertaining to each gene) in cells are haploid copy numbers of corresponding genes. Ratios between 0.7 and 1.3 are normal; ratios above 1.31 are gains; and ratios exceeding 10.00 are high copy number (amplification) status of genes. The partial ideogram of chromosome 2p is shown at the top. The figure contains the 39 cases with *ALK* copy number change. Solitary change of *ALK* status was observed only in one case (case no. 163). All 38 cases with *ALK* gain or amplification had also gain or amplification of at least one of the genes at 2p24.1.

was detected in two cases. Only the variant allele was present in both of the tumor DNA samples. A matched blood sample was available for one of the cases and sequencing of it displayed the AA genotype. This case had both *MYCN* and *ALK* amplifications.

#### 4. Discussion

Relatively recent findings on NB suggested that activation of the *ALK* gene may contribute to tumor development through copy number alterations and specific mutations targeting the tyrosine

**Table 1**  
Frequency of copy number aberrations of *ALK* and its correlation with status of *DDX1*, *MYCN*, and *NAG* (n = 90).

	Total (%)	ALK		
		Amp. (%) 1 (1.1)	Gain (%) 38 (42.2)	Normal (%) 51 (56.7)
<i>DDX1</i>				
Amp.	13 (14.4)	1 (1.1)	10 (11.1)	2 (2.2)
Gain	22 (24.4)	0	19 (21.1)	3 (3.3)
Normal	55 (61.2)	0	9 (10.0)	46 (51.2)
<i>MYCN</i>				
Amp.	17 (18.9)	1 (1.1)	13 (14.4)	3 (3.3)
Gain	28 (31.1)	0	21 (23.3)	7 (7.7)
Normal	45 (50.0)	0	4 (4.4)	41 (45.8)
<i>NAG</i>				
Amp.	11 (12.2)	1 (1.1)	8 (8.8)	2 (2.2)
Gain	22 (24.4)	0	21 (23.3)	1 (1.1)
Normal	57 (63.4)	0	9 (10.0)	48 (53.5)

(Amp.: amplification).

kinase domain. In genome-wide studies focusing on genetic aberrations of primary NB tumors, the *ALK* locus was identified as a recurrent target for copy number gain and gene amplification [20–23]. We have used MLPA to perform copy number analysis of the *NAG*, *DDX1*, and *MYCN* genes residing on the 2p24.1 and *ALK* gene on the 2p23.2 chromosome band in primary tumors of sporadic NB cases. MLPA is sensitive enough to reproducibly detect gain or loss of a single copy at multiple loci. Compared to DNA arrays, it is more sensitive in terms of accurate copy number detection [27]. In previous studies, *ALK* copy number aberrations were detected in 17–33% of tumors using locus-specific and genome-wide scanning approaches [20–24,28,29]. In the present study, 42.2% of sporadic NB cases displayed *ALK* copy number gains and *ALK* amplification was detected in only one case. The case with *ALK* amplification also had *MYCN* amplification.

*ALK* amplification was detected in approximately 2–6% of the cases regardless of disease stages [20,22,29–33]. Among a total of 709 previously published tumors screened for *ALK* mutations, only 12 tumors (1.7%) displayed *ALK* amplification [34]. Although the presence of an aberrant copy number status that included amplifications was reported to be associated with an aggressive clinical outcome [20,23], most of the *ALK* amplifications co-occurred with *MYCN* amplification. A solitary amplification of *ALK* is so rare that it was previously detected only in two cases in separate studies [20,22]. Thus, the contribution of *ALK* amplification to NB pathogenesis and its association with clinical phenotype remains to be established. Weber et al. indicate that the frequency of gene co-amplification on 2p24 in neuroblastoma is correlated directly to the physical distance from *MYCN* [35]. Although *DDX1*, *NAG* genes are close to *MYCN* and physical distance of them is under 1 Mb (310 kb, 380 kb respectively), physical distance of *ALK* gene is almost 14 Mb. Based on his observation that *MYCN* and *ALK* loci were localized in nuclei as separate amplicons for a single case, Chen et al. stated that *ALK* amplifications actively contribute to the pathogenesis of NB rather than being secondary passenger events of *MYCN* amplifications [22]. It is hard to reach such a conclusion based on the observation of signal topology *per se* for several reasons. First, the 2p23 and 2p24.1 amplicons were non-contiguous

in all reported *ALK* and *MYCN* co-amplified tumors except for a single case which had a 40.3 Mb contiguous amplicon [36]. Second, independent non-contiguous amplicons on 2p are not restricted to the 2p23 amplicon containing *ALK* in *MYCN*-amplified cases. Chen et al. found six separate amplicons between the 2p25 and 2p13 chromosome bands in 16 *MYCN*-amplified tumors [37] and it has been shown that tandemly repeated *MYCN* amplicons are integrated within homogeneously staining regions (hsr) on different chromosomes or in extrachromosomal double minutes (dmin) with the retention of a single copy at the resident site of the gene [38–41]. Thus, amplicons ectopically integrated on various genomic regions always manifest themselves in different territories of interphase nuclei [42,43].

In our study, *ALK* gains were significantly associated with gains of genes on the 2p24.1 amplicon in 90 sporadic NB cases. The *ALK* copy number gain with normal status of all other loci investigated was observed in only a single case. Our findings highly suggest that copy number gains of *ALK* are due to chromosomal or segmental imbalances. The short arm of chromosome 2 is involved in tumors with segmental alterations and found to be gained in approximately 17–23% of the NB's from all clinical stages in genome-wide studies using array based comparative genomic hybridization (CGH) and high-density oligonucleotide based SNP arrays [8,20,23,32,34]. Low level 2p gains encompassing the *ALK* locus were found to be associated with poor survival or Stage 4 disease, independent of the *MYCN* amplification status as shown in various studies [34,44,45] and tumors with 2p gain had increased *ALK* expression level [34]. In a group of 22 patients with high-risk disease, George et al. detected a gain of chromosome 2p in 50% of the cases [30].

We detected two cases with R1275Q mutation and a case with F1245V mutation. One of the cases with R1275Q mutation also had *MYCN* amplification. In previous studies of primary cases and cell lines, 18 different non-synonymous mutations leading to substitutions at 11 different amino acid positions were detected [20–24] (Table 3). Among 936 previously reported primary tumors, a total of 67 samples (7.2%) had *ALK* mutations [20–24,34]. As of the time of the preparation of this manuscript, R1275 and F1174 were the most frequently detected mutations in all previously published cases involving mutant *ALK* (41.8% and 37.3%, respectively). Contrary to primary NB samples, F1174 was the most frequent mutation among 94 cell lines (58.6%) (see Supplementary Table 3). Martinsson et al. reported a therapy-resistant case with aggressive tumor progression which had the F1174S mutation in a metastatic tumor sample [46]. The biopsy sample from the primary tumor initially had wild type *ALK* and a partial copy-neutral loss of heterozygosity (LOH) of 2p was also acquired during tumor progression, thus rendering the metastatic sample homozygous for F1174S mutation. The higher frequency of the F1174 mutation in cell lines is probably due to a selective advantage of the mutation acquired during *in vitro* passages or to the fact that they are mostly established from advanced tumors. In the meta-analysis of 709 samples, De Brouwer et al. found that *ALK* mutations were most frequently observed in *MYCN*-amplified tumors and F1174 substitutions were significantly higher in this group. For the group cases included in this study, the frequency of *MYCN* amplification (17%) was lower than the overall frequency seen in previously published studies

**Table 2**  
Age, stage, and *MYCN* and *ALK* copy number status of cases with *ALK* mutations.

Case no.	Age (months)	INSS stage	Exon	Mutation	Nucleotide substitution	Haploid <i>ALK</i> copy number	Haploid <i>MYCN</i> copy number
20	2	4s	24	F1245V	TTC > GTC	1.35	1.29
75	47	4	25	R1275Q	CGA > CAA	1.35	35.93
132	24	4	25	R1275Q	CGA > CAA	1.16	1.19

**Table 3**  
Frequency of previously published *ALK* mutations in 936 primary tumors and 94 cell lines.

Amino acid substitutions	Primary tumors (n:936)	Cell lines (n:94)	Reference (primary tumors)	Reference (cell lines)
R1275	28	9	[20–24,33]	[20–22,24,33], CGP
F1174	25	17	[20–24,33]	[20–22,24,33], CGP
F1245	6	1	[20–23]	[21]
I1171	2	–	[20]	–
D1091	–	1	–	[20,21,33]
A1234	1	–	[21]	–
Y1278	2	–	[24,33]	–
M1166	1	–	[20]	–
K1062	–	1	–	[22]
R1231	1	–	[33]	–
R1061	1	–	[23]	–

CGP: the study is the Cancer Genome Project (CGP) at the Wellcome Trust Sanger Institute (COSMIC; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

that screen *ALK* mutations. Thus, the lower frequency of mutations and the lack of F1174 substitution in our study are probably due to a lower frequency of *MYCN* amplification in our group of cases.

#### Grant support

This study was sponsored by the Dokuz Eylul University Research Fund, Project No. 2007.KB.SAG.023 (to Oguz Altungoz).

#### Acknowledgements

We are grateful to Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) for providing the tumor samples from neuroblastoma cases. We are grateful to Dr. H. Caglar Karakaya and the Biotechnology Core Facility of the Izmir Institute of Technology (IZTECH) for help with instruments. We thank Evrim Balci for technical support in automated capillary electrophoresis. We would also like to thank Dr. Ritchie Eanes at the Izmir Institute of Technology (IZTECH) for his proofreading suggestions.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.canlet.2011.11.013.

#### References

- [1] J.M. Maris, M.D. Hogarty, R. Bagatell, S.L. Cohn, Neuroblastoma, *Lancet* 369 (2007) 2106–2120.
- [2] N. Bown, Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects, *J. Clin. Pathol.* 54 (2001) 897–910.
- [3] H. Caron, Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma, *Med. Pediatr. Oncol.* 24 (1995) 215–221.
- [4] N. Bown, S. Cotterill, M. Lastowska, S. O'Neill, A.D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, G. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D.R. Betts, J. Vandesompele, N. Van Roy, Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 1954–1961.
- [5] G.M. Brodeur, A.A. Green, F.A. Hayes, K.J. Williams, D.L. Williams, A.A. Tsiatis, Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines, *Cancer Res.* 41 (1981) 4678–4686.
- [6] C. Brinkschmidt, H. Christiansen, H.J. Terpe, R. Simon, W. Boecker, F. Lampert, S. Stoerker, Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas – an important methodological approach in paediatric tumour pathology, *J. Pathol.* 181 (1997) 394–400.
- [7] M. Lastowska, E. Nacheva, A. McGuckin, A. Curtis, C. Grace, A. Pearson, N. Bown, Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group, *Gene Chromosome Cancer* 18 (1997) 162–169.
- [8] J. Vandesompele, N. Van Roy, M. Van Gele, G. Laureys, P. Ambros, P. Heimann, C. Devalck, E. Schuurings, P. Brock, J. Otten, J. Gyselinck, A. De Paepe, F. Speleman, Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization, *Gene Chromosome Cancer* 23 (1998) 141–152.
- [9] E.S. Srivatsan, V. Murali, R.C. Seeger, Loss of heterozygosity for alleles on chromosomes 11q and 14q in neuroblastoma, *Prog. Clin. Biol. Res.* 366 (1991) 91–98.
- [10] M. Lastowska, C. Cullinane, S. Variend, S. Cotterill, N. Bown, S. O'Neill, K. Mazzocco, P. Roberts, J. Nicholson, C. Ellershaw, A.D. Pearson, M.S. Jackson, Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors, *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 3080–3090.
- [11] I. Janoueix-Lerosey, G. Schleiermacher, E. Michels, V. Mosseri, A. Ribeiro, D. Lequin, J. Vermeulen, J. Couturier, M. Peuchmaur, A. Valent, D. Plantaz, H. Rubie, D. Valteau-Couanet, C. Thomas, V. Combaret, R. Rousseau, A. Eggert, J. Michon, F. Speleman, O. Delattre, Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 1026–1033.
- [12] F. Saito-Obara, I. Imoto, J. Inoue, H. Hosoi, A. Nakagawara, T. Sugimoto, J. Inazawa, PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 1876–1883.
- [13] R.C. Seeger, G.M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S.E. Siegel, K.Y. Wong, D. Hammond, Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas, *N. Engl. J. Med.* 313 (1985) 1111–1116.
- [14] M. Schwab, K. Alitalo, K.H. Klempnauer, H.E. Varmus, J.M. Bishop, F. Gilbert, G. Brodeur, M. Goldstein, J. Trent, Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour, *Nature* 305 (1983) 245–248.
- [15] G.M. Brodeur, Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 203–216.
- [16] R.C. Seeger, R. Wada, G.M. Brodeur, T.J. Moss, R.L. Bjork, L. Sousa, D.J. Slamon, Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene, *Prog. Clin. Biol. Res.* 271 (1988) 41–49.
- [17] R.H. Palmer, E. Vernersson, C. Grabbe, B. Hallberg, Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease, *Biochem. J.* 420 (2009) 345–361.
- [18] S.W. Morris, M.N. Kirstein, M.B. Valentine, K.G. Dittmer, D.N. Shapiro, D.L. Saltman, A.T. Look, Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma, *Science* 263 (1994) 1281–1284.
- [19] M. Shiota, J. Fujimoto, T. Semba, H. Satoh, T. Yamamoto, S. Mori, Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, *AMSO, Oncogene* 9 (1994) 1567–1574.
- [20] Y.P. Mosse, M. Laudenslager, L. Longo, K.A. Cole, A. Wood, E.F. Attiyeh, M.J. Laquaglia, R. Sennett, J.E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N.J. Schork, G.M. Brodeur, G.P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, J.M. Maris, Identification of *ALK* as a major familial neuroblastoma predisposition gene, *Nature* 455 (2008) 930–935.
- [21] R.E. George, T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. Luther 2nd, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W.B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V.E. Gregor, T.R. Webb, N.S. Gray, D.G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S.W. Morris, M. Meyerson, A.T. Look, Activating mutations in *ALK* provide a therapeutic target in neuroblastoma, *Nature* 455 (2008) 975–978.
- [22] Y. Chen, J. Takita, Y.L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, S. Ogawa, Oncogenic mutations of *ALK* kinase in neuroblastoma, *Nature* 455 (2008) 971–974.
- [23] H. Caren, F. Abel, P. Kogner, T. Martinsson, High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the *ALK* gene in advanced sporadic neuroblastoma tumors, *Biochem. J.* 416 (2008) 153–159.
- [24] I. Janoueix-Lerosey, D. Lequin, L. Brugieres, A. Ribeiro, L. De Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel, O. Delattre, Somatic and germline activating mutations of the *ALK* kinase receptor in neuroblastoma, *Nature* 455 (2008) 967–970.
- [25] E.I. Smith, G.M. Haase, R.C. Seeger, G.M. Brodeur, A surgical perspective on the current staging in neuroblastoma – the International Neuroblastoma Staging System proposal, *J. Pediatr. Surg.* 24 (1989) 386–390.
- [26] I.M. Ambros, B. Brunner, G. Aigner, C. Bedwell, K. Beiske, J. Benard, N. Bown, V. Combaret, J. Couturier, R. Defferrari, N. Gross, M. Jeison, J. Lunec, B. Marques, T. Martinsson, K. Mazzocco, R. Noguera, G. Schleiermacher, F. Speleman, R. Stallings, G.P. Tonini, D.A. Tweddle, A. Valent, A. Vicha, N.V. Roy, E. Villamon, A. Ziegler, S. Preuner, M. Drobics, R. Ladenstein, G. Amann, R.J. Schuit, U. Potschger, P.F. Ambros, A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma, *Clin. Cancer Res.: Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17 (2011) 792–804.

- [27] J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, G. Pals, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) e57.
- [28] M. Cheng, G.R. Ott, Anaplastic lymphoma kinase as a therapeutic target in anaplastic large cell lymphoma, non-small cell lung cancer and neuroblastoma, *Anticancer Agents Med. Chem.* 10 (2010) 236–249.
- [29] M.M. Subramaniam, M. Piqueras, S. Navarro, R. Noguera, Aberrant copy numbers of ALK gene is a frequent genetic alteration in neuroblastomas, *Hum. Pathol.* 40 (2009) 1638–1642.
- [30] R.E. George, E.F. Attiyeh, S. Li, L.A. Moreau, D. Neuberg, C. Li, E.A. Fox, M. Meyerson, L. Diller, P. Fortina, A.T. Look, J.M. Maris, Genome-wide analysis of neuroblastomas using high-density single nucleotide polymorphism arrays, *PLoS One* 2 (2007) e255.
- [31] H. Caren, J. Erichsen, L. Olsson, C. Enerback, R.M. Sjöberg, J. Abrahamsson, P. Kogner, T. Martinsson, High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene, *BMC Genom.* 9 (2008) 353.
- [32] M. Lastowska, V. Viprey, M. Santibanez-Koref, I. Wappler, H. Peters, C. Cullinane, P. Roberts, A.G. Hall, D.A. Tweddle, A.D. Pearson, I. Lewis, S.A. Burchill, M.S. Jackson, Identification of candidate genes involved in neuroblastoma progression by combining genomic and expression microarrays with survival data, *Oncogene* 26 (2007) 7432–7444.
- [33] R. Spitz, A. Oberthuer, M. Zapatka, B. Brors, B. Hero, K. Ernestus, J. Oestreich, M. Fischer, T. Simon, F. Berthold, Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome, *Gene Chromosome Cancer* 45 (2006) 1130–1142.
- [34] S. De Brouwer, K. De Preter, C. Kumps, P. Zabrocki, M. Porcu, E.M. Westerhout, A. Lakeman, J. Vandesompele, J. Hoebbeck, T. Van Maerken, A. De Paepe, G. Laureys, J.H. Schulte, A. Schramm, C. Van Den Broecke, J. Vermeulen, N. Van Roy, K. Beiske, M. Renard, R. Noguera, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, P. Kogner, T. Martinsson, A. Nakagawara, M. Ohira, H. Caron, A. Eggert, J. Cools, R. Versteeg, F. Speleman, Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 4353–4362.
- [35] A. Weber, P. Imisch, E. Bergmann, H. Christiansen, Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 2681–2690.
- [36] P. Scanuffi, S. Coco, F. Cifuentes, D. Albino, M. Nair, R. Defferrari, K. Mazzocco, G.P. Tonini, Identification and characterization of DNA imbalances in neuroblastoma by high-resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization, *Cancer Genet. Cytogenet.* 177 (2007) 20–29.
- [37] Q.R. Chen, S. Bilke, J.S. Wei, C.C. Whiteford, N. Cenacchi, A.L. Krasnoselsky, B.T. Greer, C.G. Son, F. Westermann, F. Berthold, M. Schwab, D. Catchpoole, J. Khan, CDNA array-CGH profiling identifies genomic alterations specific to stage and MYCN-amplification in neuroblastoma, *BMC Genom.* 5 (2004) 70.
- [38] R. Corvi, L.C. Amler, L. Savelyeva, M. Gehring, M. Schwab, MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23–24 during amplification in human neuroblastoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5523–5527.
- [39] M. Schwab, H.E. Varmus, J.M. Bishop, K.H. Grzeschik, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, G. Brodeur, J. Trent, Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc, *Nature* 308 (1984) 288–291.
- [40] B.S. Emanuel, G. Balaban, J.P. Boyd, A. Grossman, M. Negishi, A. Parmiter, M.C. Glick, N-myc amplification in multiple homogeneously staining regions in two human neuroblastomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3736–3740.
- [41] L.C. Amler, Y. Shibasaki, L. Savelyeva, M. Schwab, Amplification of the N-myc gene in human neuroblastomas: tandemly repeated amplicons within homogeneously staining regions on different chromosomes with the retention of single copy gene at the resident site, *Mutat. Res.* 276 (1992) 291–297.
- [42] K. De Preter, F. Pattyn, G. Berx, K. Strumane, B. Menten, F. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, J. Vandesompele, Combined subtractive cDNA cloning and array CGH: an efficient approach for identification of overexpressed genes in DNA amplicons, *BMC Genom.* 5 (2004) 11.
- [43] E. Michels, J. Vandesompele, J. Hoebbeck, B. Menten, K. De Preter, G. Laureys, N. Van Roy, F. Speleman, Genome wide measurement of DNA copy number changes in neuroblastoma: dissecting amplicons and mapping losses, gains and breakpoints, *Cytogenet. Genome Res.* 115 (2006) 273–282.
- [44] Y.P. Mosse, S.J. Diskin, N. Wasseman, K. Rinaldi, E.F. Attiyeh, K. Cole, J. Jagannathan, K. Bhamhani, C. Winter, J.M. Maris, Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression, *Gene Chromosome Cancer* 46 (2007) 936–949.
- [45] M. Jeison, S. Ash, G. Halevy-Berko, J. Mardoukh, D. Luria, S. Avigad, G. Feinberg-Gorenshtein, Y. Goshen, G. Hertz, J. Kapelushnik, A. Ben Barak, D. Attias, R. Steinberg, J. Stein, B. Stark, I. Yaniv, 2p24 Gain region harboring MYCN gene compared with MYCN amplified and nonamplified neuroblastoma: biological and clinical characteristics, *Am. J. Pathol.* 176 (2010) 2616–2625.
- [46] T. Martinsson, T. Eriksson, J. Abrahamsson, H. Caren, M. Hansson, P. Kogner, S. Kamaraj, C. Schonherr, J. Weinmar, K. Ruuth, R.H. Palmer, B. Hallberg, Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumor progression and unresponsiveness to therapy, *Cancer Res.* 71 (2011) 98–105.