

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Nöroblastik Tümörlerdeki Anaplastik Lenfoma
Kinaz (*ALK*) Gen Mutasyonlarının
Tanımlanması**

ÖZKAN BAĞCI

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Nöroblastik Tümörlerdeki Anaplastik Lenfoma
Kinaz (*ALK*) Gen Mutasyonlarının
Tanımlanması**

ÖZKAN BAĞCI

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2007.KB.SAG.023 sayı ile desteklenmiştir.

“Nöroblastik Tümörlerdeki Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) Gen Mutasyonlarının Tanımlanması” isimli bu tez çalışması 20.08.2009 tarihinde tarafımızdan kabul edilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Dilek GÜNEŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve
Genetik Bölümü

Yedek Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yedek Jüri Üyesi

Doç.Dr. Yusuf BARAN
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve
Genetik Bölümü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Tablolar dizini	vi
Şekiller dizini.....	vii
Kısaltmalar	ix
Teşekkür	x
Özet (Türkçe).....	1
Özet (İngilizce).....	2
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	3
1.1 Nöroblastomun Tarihçesi	3
1.2 Nöroblastomun Epidemiyolojisi.....	3
1.2.1 Çevresel Risk Faktörleri	4
1.3 Nöroblastomun Biyolojik ve Genetik Özellikleri.....	5
1.4 ALK Geninin Genel Özellikleri	8
1.4.1 ALK Geninin Rol Oynadığı Metabolik Olaylar	9
1.5 ALK Geni ile Kanser İlişkisi	9
1.5.1 ALK Geni ile Nöroblastom İlişkisi	10
2. AMAÇ	12
3. YÖNTEM.....	13
3.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi.....	13
3.2 Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu	13
3.2.1 Kullanılan Stok Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	14
3.2.2 Fenol Kloroform İsoamil Alkol Yöntemiyle DNA Eldesinde Kullanılan Protokol	15
3.2.3 High Pure PCR Template Preparation Kit İle DNA Eldesinde Kullanılan Protokol	16
3.2.4 Elde Edilen DNA nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması.....	18
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	18
3.3.1 ALK Geninin 20. Ekzonun Çoğaltılması	18
3.3.2 ALK Geninin 21.22. Ekzonun Çoğaltılması	19
3.3.3 ALK Geninin 23. Ekzonun Çoğaltılması	19
3.3.4 ALK Geninin 24. Ekzonun Çoğaltılması	20

3.3.5 ALK Geninin 25. Ekzonun Çoğaltılması	20
3.3.6 ALK Geninin 26. Ekzonun Çoğaltılması	21
3.3.7. ALK Geninin 27. Ekzonun Çoğaltılması	21
3.3.8 ALK Geninin 28. Ekzonun Çoğaltılması	22
3.3.9 PCR da Kullanılan Komponentler ve PCR ın Hazırlanışı.....	22
3.3.10 PCR Koşulları ve Optimizasyon Deneyleri.....	24
3.4 PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler	31
3.4.1 PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Görüntülenmesi	32
3.5 DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları	33
3.5.1 Örneklerin Dizi Analizinin Yaptırılması	33
3.5.2 Kromotogramların Değerlendirilmesi	33
4. BULGULAR	34
4.1 Olgu Grubunun Demografik ve Onkolojik Verileri	34
4.2 Olguların DNA İzolasyonu ve Ölçüm Değerleri.....	35
4.3 Olguların PCR Ürünlerinin Oluşturulması ve Kontrolü.....	37
4.3.1 ALK Geninin 20.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	37
4.3.2 ALK Geninin 21-22.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	38
4.3.3 ALK Geninin 23.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	38
4.3.4 ALK Geninin 24.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	39
4.3.5 ALK Geninin 25.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	39
4.3.6 ALK Geninin 26.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	40
4.3.7 ALK Geninin 27.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması	40

4.3.8 ALK Geninin 28.Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR	
Ürününün Saptanması	41
4.4 Olgu ve Kontrollerin DNA Dizi Analizi Verileri.....	42
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	46
EKLER	
EK1 Aydınlatılmış Onam Formu	49
EK1 Etik Kurul Formu	50

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: 25 ve 50 µl'lik PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	24
Tablo 2: 20 ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	24
Tablo 3: 21-22. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	26
Tablo 4: 23 ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	27
Tablo 5: 24. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	27
Tablo 6: 25. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	28
Tablo 7: 26. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	29
Tablo 8: 27. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	29
Tablo 9: 28. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri.....	30
Tablo10: Olguların cinsiyete göre dağılımı	34
Tablo11: Olguların yaşlarına göre dağılımı.....	34
Tablo12: Olguların MYCN geni amplifikasyonuna göre dağılımı.....	34
Tablo13: Olguların histolojik evrelerine göre dağılımı.....	35
Tablo14: Olguların “Shimada” sınıflandırmasına göre histolojik durumları.....	35
Tablo15: Olguların izlem sonunda son durumlarına göre dağılımı.....	35
Tablo16: Tümör örneklerine ait genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: ALK geninin 2.kromozom üzerindeki lokalizasyonu.....	8
Şekil 2: ALK geninin çeşitli hastalıklarda diğer genlerle yaptığı translokasyonlar.....	10
Şekil 3: ALK geni 20. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	18
Şekil 4: ALK geni 21-22. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	19
Şekil 5: ALK geni 23. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	19
Şekil 6: ALK geni 24. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	20
Şekil 7: ALK geni 25. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	20
Şekil 8: ALK geni 26. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	21
Şekil 9: ALK geni 27. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	21
Şekil 10: ALK geni 28. ekzon primer oturma bölgeleri ve amplifiye edilecek gen bölgesi.....	22
Şekil 11: Amplifiye edilen ALK geni 20.ekzon görüntüsü.....	25
Şekil 12: ALK geni 20.ekzonunun annealing sıcaklığı için yapılan optimizasyon görüntüsü.....	26
Şekil 13: Amplifiye edilen ALK geni 21-22.ekzon görüntüsü.....	26
Şekil 14: Amplifiye edilen ALK geni 23.ekzon görüntüsü.....	27
Şekil 15: Amplifiye edilen ALK geni 24.ekzon görüntüsü.....	28
Şekil 16: Amplifiye edilen ALK geni 25.ekzon görüntüsü.....	28
Şekil 17: Amplifiye edilen ALK geni 26.ekzon görüntüsü.....	29
Şekil 18: Amplifiye edilen ALK geni 27.ekzon görüntüsü.....	30
Şekil 19: Amplifiye edilen ALK geni 28.ekzon görüntüsü.....	30
Şekil 20: 20. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	37
Şekil 21: 21-22. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	38

Şekil 22:	23. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	38
Şekil 23:	24. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	39
Şekil 24:	25. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	39
Şekil 25:	26. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	40
Şekil 26:	27. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	40
Şekil 27:	28. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü.....	41

KISALTMALAR

NBL: Nöroblastom

OR: Odds Ratio

GA: Güven Aralığı

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

Da: Dalton

kDa: Kilo dalton

NPM: Nucleophosmin

SNP: Single-Nucleotide Polymorphism

TPOG: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

FKİ: Fenol Kloroform İsoamil Alkol

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase Chain Reaction

bp: Base Pair

TBE: Tris-Borat-EDTA

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki Lisans üstü eğitimimin başlangıcından itibaren hem bilimsel hem de hayata dair deneyimlerini benimle açık bir şekilde paylaşan, yaşadığım her türlü sıkıntımı kendisiyle paylaşmama imkan sunan, kişilik ve bilimsel anlamda örnek almaya çalıştığım ve kendisinden daha çok şey öğreneceğim çok değerli hocam; Doç. Dr. Oğuz Altungöz'e sonsuz teşekkür ederim.

Zor zamanlarımda her zaman yanımda olan, desteğini ve tecrübelerini benimle paylaşan ve çalışmalarımda büyük emeği geçen çok değerli dostum; Sait Tümer'e sonsuz teşekkürler.

TPOG NBL 2003 protokolü çerçevesinde birimize tümör örnekleri gönderen merkezlere teşekkür ederiz. Ayrıca, protokolün yürütülmesinde, örnek akışının sağlanmasında ve çalışmalarına yaptıkları ciddi katkılardan dolayı Prof. Dr. Nur Olgun ve Yrd. Doç. Dr. Dilek Güneş'e teşekkürü borç bilirim.

Anabilim Dalı'nda bizlere sağlıklı çalışma koşulları için zemin hazırlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Neşe Atabey'e sonsuz teşekkürler.

ÖZET

NÖROBLASTİK TÜMÖRLERDE ANAPLASTİK LENFOMA KİNAZ (*ALK*) GEN MUTASYONLARININ TANIMLANMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
Balçova-İzmir
ozkan.bagci@deu.edu.tr

Nöroblastoma merkezi sinir sistemi tümörlerinden sonra, en yaygın ikinci solid tümördür ve 15 yaş altındaki tanı almış tüm çocukluk çağı kanserlerin %7.2 sinden sorumludur. Nöroblastom (NBL), nöral krestten köken alıp adrenal medulla ve sempatik sinir sistemine hedeflenen nöroektodermal hücrelerin embriyonel bir tümürüdür. Nöroblastom çeşitli klinik ve biyolojik özellikler gösteren, çok sayıda bilinmeyen olan bir tümördür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon yada agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır. Son yıllarda nöroblastom olgularında Anaplastik Lenfoma Kinaz (*ALK*) gen mutasyonu üzerine yapılan çalışmalar özellikle nöroblastomun ailesel modeli üzerinde yoğunlaşmış olup, bu olgularda *ALK* genindeki germline mutasyonlar gösterilmiştir.

Türkiye nöroblastom popülasyonunu temsil eden 79 sporadik olgularda sporadik *ALK* gen mutasyonu olmadığı net olarak gösterilmiştir. Bu olgularda *ALK* geninde mutasyon saptanmaması literatürde önerilen nöroblastomun sağaltım modeli için son derecede önemlidir. Bilindiği üzere nöroblastomun ailesel formları tüm olguların sadece %1'ini içermektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda henüz etkili bir tedavi yöntemi bulunmayan nöroblastom olguları için, *ALK* gen ürününün kinaz bölgesini baskılayan hedef ilaçların önerilmesi nöroblastomun sıklıkla meydana geldiği sporadik olgular için uygun bir önermenin olamayacağı düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak Türkiye nöroblastom popülasyonunu temsil eden 79 sporadik olgularda sporadik *ALK* gen mutasyonu olmadığı net olarak gösterilmiştir. Bu durum literatürde nöroblastom olguları için prognostik faktör olarak önerilen *ALK*'nın kinaz bölgesinin tartışılması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *ALK* geni, Sporadik Nöroblastom, *ALK* kinaz bölgesi

ABSTRACT

THE IDENTIFICATION OF ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE (*ALK*) GENE MUTATIONS IN NEUROBLASTIC TUMORS

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Medical Biology and Genetics,
Balcova-IZMIR,
ozkan.bagci@deu.edu.tr

Neuroblastoma is the second most common tumor, following central nervous system tumors and is the cause of 7.2% of childhood cancer diagnosed before the age of 15. Neuroblastoma (NBL) is an embryonic tumor of the neuroectodermal cells that stem from neural crest and target sympathetic nervous system and adrenal medulla. Neuroblastoma is a tumor that shows a variety of clinical and biological characteristics along with a multitude of questions not answered yet. Due to the volatility of the tumor in its biological behaviors, neuroblastoma could show spontaneous regression, benign transformation or aggressive manner, which results in complications related to the prognosis and treatment of the disease.

In recent years, the researches on Anaplastic lymphoma kinase gene mutation in neuroblastoma cases have been particularly focused on the familial model of neuroblastoma; and germ line mutations in *ALK* gene have been shown in such cases. It has been clearly presented that there is no sporadic *ALK* gene mutation in the 79 sporadic cases that represent the neuroblastoma population in Turkey. Not detecting mutations in *ALK* gene in these cases is of the utmost importance for the treatment model of neuroblastoma recommended in the literature. As known, the familial forms of neuroblastoma consist of only 1% of all the cases.

Hence, for the neuroblastoma cases for which no affective treatment method has been found yet in the studies carried out, we do not think that prescribing target drugs pressing the kinase domain of the *ALK* gene production is an appropriate proposal for the sporadic cases in which neuroblastoma frequently occurs.

In conclusion, it has been clearly presented that there is no sporadic *ALK* gene mutation in the 79 sporadic cases that represent the neuroblastoma population in Turkey. This situation shows the necessity to discuss *ALK* kinase domain proposed as the prognostic factor in the literature for neuroblastoma cases.

Key words: *ALK* gene, Sporadic Neuroblastoma, *ALK* kinase domain

1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Nöroblastom'un Tarihçesi

Malign bir çocukluk çağı hastalığı olarak nöroblastomun tarihi Alman patolog R.L.K Virchow' un 1864 yılında yayınlamış olduğu "Beyin epifizi ve böbrek üstü bezlerinin hiperplazisi" isimli makalesine dayanmaktadır. Virchow makalesinde adrenal medulladan meydana gelen, böbrek üstü bezlerindeki nodüllere dikkat çekmiştir. Virchow adrenal medullanın olağan bileşenlerinin dışında, bazı durumlarda yüksek miktarda sempatik hücrelerin bulunmasını tanımlamak üzere çalışmalarda bulundu [1].

1910 yılında "Nöroblastom" terimini ilk olarak kullanan J.H. Wright, nöral fibrillerin oluşmasını böbrek üstü bezlerinin gelişmesiyle kıyasladı. Wright, embriyo oluşumu sırasında primitif sinir hücrelerinin göç etmesiyle, vücudun geniş bölgelerinde aynı tümörün gelişebileğine dair çalışmalarda bulundu [1].

Virchow'un çalışmasını takiben sonraki yüzyılda nöroblastom hakkında bilgi birikimi yavaş bir biçimde gerçekleşirken, yirminci yüzyılın ortalarından itibaren nöroblastom üzerine yapılan araştırmalarda ciddi artışlar gerçekleşmiştir [1].

1.2. Nöroblastomun Epidemiyolojisi

Nöroblastoma merkezi sinir sistemi tümörlerinden sonra, en yaygın ikinci solid tümördür ve 15 yaş altındaki tanı almış tüm çocukluk çağı kanserlerin %7.2 sinden sorumludur. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nün, sürveyans, epidemiyoloji ve sonuçlar programı tarafından 1975-2000 yılları arasında 1424 olgu bildirmiştir [2].

Aynı program tarafından nöroblastomun toplam insidansı 15 yaş altındaki çocuklar için milyonda 10.2 olarak hesaplanmıştır. Erkekler için bu oran milyonda 10.3, kızlarda 10.1 ve beyazlarda 10.8 iken siyah çocuklarda 8.4 olarak bulunmuştur. Diğer etnik gruplarda ise bu oran 7.5 olarak bulunmuştur. Yaşa göre gruplama yapıldığında insidans oranları; 0-4 yaş için milyonda 19.6, 5-9 yaş için 2.9 ve 10-14 yaş için 0.7 olarak bulunmuştur. Nöroblastomun insidans oranı bebeklerdeki cinsiyete göre de farklılık göstermektedir. Erkek bebeklerde oran milyonda 62.8 iken kızlarda 59.8 dir [2].

Uluslararası olarak kanser kayıtları temel alındığında, nöroblastomun uluslararası insidansı, Kuzey Amerika, Avrupa, Avustralya ve İsrail'den çıkan beyaz ırka mensup bireyler arasında daha yüksektir. İnsidans oranı güneydeki bölgelerde, Hindistan ve Çin'i de içeren Doğu Asya'da, Latin ve Güney Amerika'da daha düşüktür. Japonya'da ise batı ülkelerinden daha düşüktür [2]. Rutin sağlık muayenesinde ya da farklı endikasyonlar için yapılan sağlık incelemelerinde rastlantısal olarak nöroblastom tanı koyma sıklığı ülkeler arasında büyük değişkenlik göstermektedir. İngiltere'de nöroblastom hastalarının % 7.7'si rastlantısal olarak tanı alırken, bu oranın Avusturya ve Almanya'da sırasıyla % 27.1 ve % 33.9 olduğu görülmüştür [3].

Türk Pediatrik Onkoloji Grubu NBL 2003 protokolünün Ekim 2006 verilerine göre; Türkiye'de ortanca tanı koyma yaşı 22 aydır ve kız/erkek oranı ise 1.01 dir [4].

İzmir ilinde 1997-2002 yılları arasında çocukluk çağı kanser inisidansına yönelik bir başka çalışmada nöroblastomu da içeren periferik sinir hücrelerinden kaynaklı kanserlerin rölatif sıklığı %7.1 olarak saptanmıştır [5].

Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'nun (TPOG) 2002 yılında solid tümörler ve lenfomaya sahip olan 1073 çocuk üzerinde yaptığı çalışmada, sempatik sistem tümörlerinin %9.40 ile görüldüğü saptanmıştır [6]. Türkiye'deki 2002 -2005 pediatrik tümör kayıtlarına göre, 1435 çocukluk çağı tümörlerinin % 10.6 'sı sempatik sinir sistemi kökenlidir [7].

1.2.1.Çevresel risk faktörleri:

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar nöroblastomun etyolojisi üzerindeki doğumsal karakteristikleri ve reproduktif öykünün rolünü incelemiştir. Çalışmaların sonucunda çelişkili bulgular bulunmakla beraber; önceki gebeliklerde meydana gelen düşükler, gebelik süresince oluşan enfeksiyonlar, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, tekrarlayan sezaryan doğumlar, düşük doğum ağırlığı (<2,500g) nöroblastom için risk oluşturduğu birçok çalışmada vurgulanmıştır [2].

Yapılan son çalışmalarda da erken doğumun (<33hafta) nöroblastom riskini (OR:1.9) artırdığı bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise; erken doğumun hastalığın ileri evrede olma riskini (OR:3.4) artırdığı bulunmuştur. Daniels ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 6 aydan fazla emzirmenin nöroblastom riskini % 40 oranında düşürdüğü saptanmıştır [2].

Japonya, Avustralya ve İsrail’de yapılan olgu serisi çalışmalarında anne tarafından ovulasyonu indükleyen ilaçlar ile nöroblastom arasında ilişki saptanmıştır. Yapılan dört olgu-kontrol çalışmasında gebelik süresince veya öncesinde hormon kullanımı nöroblastom riskini (OR>2.0) artırmaktadır. Ancak yapılan diğer olgu kontrol çalışmalarında risk gösterilememiştir. Aynı şekilde annenin gebelik süresince alkol ve sigara kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir [2].

Yapılan çeşitli çalışmalarda, babanın mesleği ile nöroblastom riski arasında ilişkinin olduğuna yönelik sonuçlara ulaşılmıştır. Elektrikli cihazların ve elektrik hatlarının tamiri gibi elektrik ile ilgili mesleki bir pozisyonda çalışan babaların nöroblastom riskini artırdığı (OR>2.0) saptanmıştır. Aynı şekilde plastik, boya ve endüstri sanayisinde çalışanların da hastalık riskini artırdığı bulunmuştur [2].

Annenin mesleği ile nöroblastom riski ilişkisine yönelik yapılan çalışmalarda ise, plastik, elektrik ve metal ürünlerin üretilmesine yönelik iş kollarında çalışmanın riski artırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak nöroblastom riskini hesaplamak için çeşitli çalışmalar yapılmış ancak hastalık için hiçbir neden ya da nedenler izole edilememiştir [2].

1.3. Nöroblastomun Biyolojik ve Genetik Özellikleri

Nöroblastom (NBL), nöral krestten köken alıp adrenal medulla ve sempatik sinir sistemine hedeflenen nöroektodermal hücrelerin embriyonel bir tümürüdür. Bunun sonucunda tümör sempatik sinir sisteminin herhangi bir yerinde gelişebilir. Ancak çoğunlukla tümörlerin %65’i abdomende gözlenir. Diğer yaygın bölgeler ise boyun ve göğüsdür [8].

Nöroblastom çeşitli klinik ve biyolojik özellikler gösteren, çok sayıda bilinmeyen olan bir tümürdür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır [9-12].

Bir yaşından büyük çocuklarda, olguların yaklaşık % 75’i yaygın metastazlar sergiler (evre 4) ve bu tümörler kemoterapiye dirençli, sağaltıma yanıt vermeyen tümörlerdir. NBL’un çocukluk çağı kanser mortalitesine katkıda bulunan kısmı (Gelişmiş ülkelerde çocukluk çağında kanserle ilgili ölümlerin % 15’i) bu gruba giren tümörlerden oluşmaktadır. Bunun tersine, düşük evre hastalık özellikleri gösteren (evre 1, 2, 4S) NBL olgularının klinik davranışı, agresif gruba giren tümörlerinkinden son derece farklıdır. Bu gruptaki tümörler kemoterapiye duyarlı olup, yüksek sağaltım oranı gösterirler.

Dahası, yaygın metastaz gösteren evre 4S tümörleri de dahil olmak üzere, düşük evreli tümörlerin bir kısmı kendiliğinden gerilemektedir.

Kötü prognozun bilinen klinik belirteçleri, tanı alan hastanın 1 yaşı üzerinde ve ileri evrede olmasıdır. Ayrıca; gangliyonik farklılaşma, Schwann hücre stromasının düzeyi gibi tümör histolojisine dayanan risk belirleme sistemleri de geliştirilmiştir [13-17].

Histolojik olarak farklılaşmış tümörlerde Schwann hücresi stroması yaygın olarak gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda Schwann hücrelerinin nöronal hücrelerin diferansiyasyonunu indüklediği ve proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [18].

Ancak, stromal bileşenin kaynağı ve stroma varlığının bir sonuç mu yoksa neden mi olduğu henüz bilinmemektedir [19].

Son yıllarda nöroblastomda prognostik bir tümör faktörü belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Riley ve arkadaşlarının nöroblastomda prognostik faktörler için yaptıkları literatür çalışması sonucunda otuzbir prognostik faktör rapor ettiler. Prognostik faktörlerden 6'sı genetik aberasyonlardan oluşmaktadır. Bunlar ploidy, *MYCN* amplifikasyonu, 1 no'lu kromozomun kısa kolunun (1p) kaybı, 17 no'lu kromozomun uzun kolunun (17q) kazanımı, kromozom 14q kaybı ve kromozom 11q nun kaybıdır.

Prognostik marker üzerinden gerçekleştirilen meta-analiz çalışmalarında *MYCN* amplifikasyonunun ve DNA ploidisinin güçlü bir prognostik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmada *MYCN* amplifikasyonu için risk oranı 5.48 (%95 G.A: 4.30-6.97) , DNA near diploidi için risk oranı 3.23(%95 G.A: 2.08-5.00) olarak hesaplanmıştır [20].

Tümör polidisi ile ilgili olarak, “near triploidi” iyi prognozla ilişkiliyken; *MYCN* onkogen amplifikasyonu, 17q kazanımı, 1p veya 11q allelik kaybı agresif tümör özellikleri ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [21, 22].

MYCN Geni

MYCN amplifikasyonu NBL tümörlerinde yaklaşık %20-40'ında gözlenen bir özelliktir. Bu anomalinin hastalığın ilerlemiş evresiyle birliktelik gösterdiği bilinmektedir [23, 24]. Yapılan çalışmalarda *MYCN* geninin aşırı eksprese olduğu transgenik farelerde nöroblastomun geliştiği saptanmıştır [15]. *MYCN* amplifikasyonu evre 3 ve 4 de %30-40 oranında bulunmaktadır. Amplifikasyon daha düşük evrelerdeki (evre 1 ve 2 de, %4 evre 4S de) tümörlerde daha az sıklıkla (%8) meydana gelmektedir [20, 25].

1p allelik kaybı

Bir no'lu kromozomun nöroblastom genetiğindeki önemi primer tümörlerde ve NBL hücre hatlarında yapılan sitogenetik analizlerde anlaşılmıştır. Yapılan bir çalışmada 915 nöroblastom örneği taranmış ve 1p36 bölgesinde meydana gelen delesyonun *MYCN* amplifikasyonu ile ilişki olduğu bulunmuştur [20]. Diğer sitogenetik çalışmalarda da özellikle 1p delesyonları olmak üzere 1p değişimleri yüksek sıklıkta saptanmıştır. Bir no'lu kromozomun kısa kolunda NBL gelişiminde rol oynayan bir ya da daha fazla sayıda genin bulunduğu düşüncesi böylece ağırlık kazanmıştır.

1p delesyonları yalnızca NBL tümörlerinde değil, aynı zamanda hematolojik maliniteler ve solid tümörler de dahil çok sayıda insan malign hastalıklarında neoplastik hücrelerde gözlenmektedir [20, 25].

Kromozom 1p nin allelik kaybı agresif tümör davranışı ile ilişkilidir. Delesyon sıklıkla ilerlemiş evredeki hastalığa sahip olan hastalarda görülmektedir [25]. Ancak, 1p delesyonunun prognostik önemi konusunda çalışmalar tartışmalıdır. Örneğin, bir seri tümörde yapılan çalışmada 1p kaybının sağkalım üzerindeki etkisinin olumsuz etkisinin *MYCN* amplifikasyonu gözlenen tümörlerle sınırlı olduğu saptanmıştır [20]. Diğer yandan, yapılan çeşitli sitogenetik çalışmalar 1p delesyonunun olumsuz hastalık süreci için anlamlı derecede bağımsız bir öngörü belirteci olduğunu göstermiştir.

Heterozigosite kaybını (LOH) saptamaya dayalı olarak yapılan diğer çalışmalarda, 1p'de LOH gözlenmesinin hastalık prognozu için en güçlü öngörü etmeni olduğu gösterilmiştir [26].

17q kazanımı

Nöroblastom olgularının %60'dan daha fazlasında 17. kromozomun tamamının veya 17q kolunun kısmi bir paraçasının kazanımı gözlenmektedir [20].

DNA ploidi

Nöroblastom DNA içeriği açısından, near-diplodi (%45) ve near triploid (%55) olarak ikiye ayrılabilir. Near triploid nöroblastomlar yapısal genetik aberasyonlar olmaksızın tam bir kromozom kazanımı veya kaybı ile karakterizedir. Klinik olarak near-triploid tümörler daha

iyi bir prognoza sahiptirler. Near-diplodi tümörler *MYCN* amplifikasyonu, 17 q kazanımı ve diğer kromozal kayıplar gibi genetik aberasyonların varlığı ile karakterizedir [20].

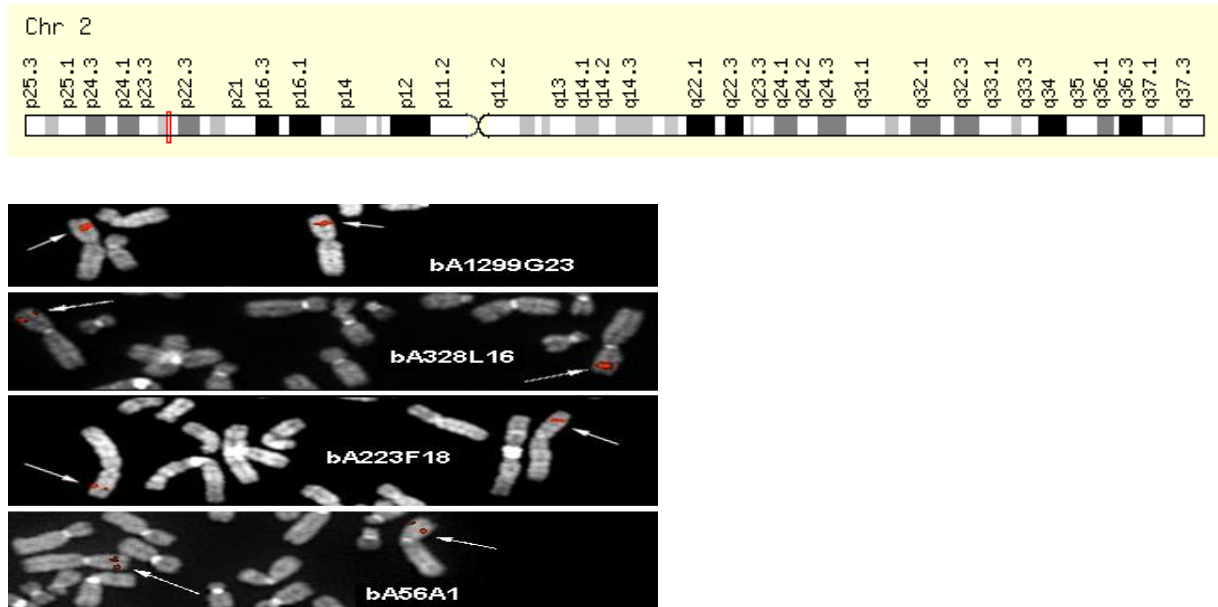
11q allelik kaybı

Kromozom 11q kaybı olguların yaklaşık %40'ında gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda 11q delesyonuyla olumsuz klinik parametreler arasında güçlü bir ilişki bulunmuş ve kromozom 11q kaybı *MYCN* amplifikasyonu ile ters yönde korelasyon göstermektedir [20, 27-31].

1.4 *ALK* Geninin Genel Özellikleri

Anaplastik Lenfoma Kinaz (*ALK*) geni 2. kromozomun kısa kolu üzerinde 2p23 de 728,793. bazda lokalize olmuş bir gendir. *ALK* geni 29 ekzon ve 29 introndan oluşmaktadır. *ALK* geni tirozin kinaz aktivitesi göstermekle birlikte sinir sisteminin gelişmesinde ve sinir sisteminin normal fonksiyonunda önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [32].

ALK geni; reseptör tirozin kinaz ilişkili, tek yön geçişli tip 1 transmembran proteini kodlamaktadır. *ALK* geninin kodladığı protein merkezi sinir sisteminin bazı hücrelerinde eksprese olurken ve diğer normal hücrelerde hemen hemen hiç eksprese olmamaktadır [33]. *ALK* geni tarafından kodlanan protein, 1,620 aminoasitden oluşup 177 kDa ağırlığındadır. Bu proteinden, glikolizasyon işleminden sonra 200kDa luk olgun glikoprotein oluşur [34].



Şekil 1: *ALK* geninin 2.kromozom üzerindeki lokalizasyonu [34, 35].

1.4.1 ALK Geninin Rol Oynadığı Metabolik Yolaklar

ALK geninin rol oynadığı metabolik yolaklar: kalsiyum sinyal yolağı, apoptozis, VEGF sinyal yolağı, axon oluşumu, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, insülin sinyal yolağı şeklinde sıralanabilir.

1.5 ALK geni ile Kanser İlişkisi

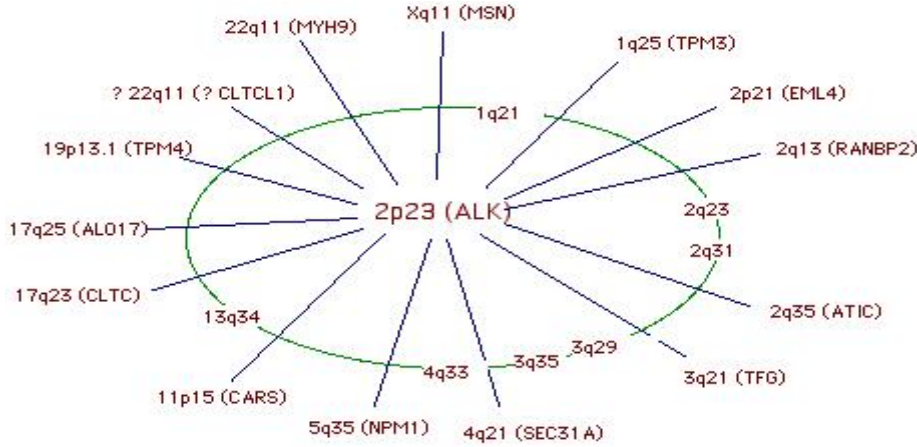
ALK geni ilk olarak büyük hücreli anaplastik lenfomalarda tanımlanmıştır. Morris ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, büyük hücreli lenfoma tümörlerinin yaklaşık üçte birinde 2 ile 5. kromozomlar arasında translokasyon t(2;5)(p23;q35) saptanmıştır.

Beşinci kromozomda bulunan nüklefosmin geni ile transloke olan 2. kromozomun p23 bölgesi daha önceden tanımlanmamış olmakla birlikte, bu çalışma sonucunda Morris ve arkadaşları tarafından bu bölge, Anaplastik Lenfoma Kinaz (*ALK*) geni olarak tanımlandı [36].

Sonraki yıllarda yapılan bir başka çalışmada büyük hücreli anaplastik lenfomalarda *ALK* geninin TPM3-*ALK* şeklinde yeni bir füzyon geni t(1;2)(q25;p23) oluşturduğu saptanmıştır [37]. t(2;5)(p23;q35) translokasyonu sonucunda oluşan hibrid proteini, nüklefosmin geninin amimo terminali ile *ALK* geninin katalitik bölgesi arasında bağlantılandırılmıştır. Bu anormal NPM-*ALK* fusion geninin transkripsiyonu tirozin kinaz olarak işlev yapan ve p80 olarak isimlendirilen anormal proteini oluşturur. Oluşan bu protein nükleus ile ilintili fosfoprotein ribozomların oluşmasının son aşamasında stoplazma ile nükleolus arasında ribozom komponentlerinin taşınmasında görev alır. Tipik olarak t(2;5)(p23;q35) translokasyonuna sahip olan hastalarda bu protein hem nükleer hem de stoplazmada *ALK*-1 antikoru ile boyanarak gösterilmiştir.

Sonuçlar oldukça farklı olmasına rağmen, *ALK* nın ekspresyonu malign periferik sinir kılıfı tümör olgularının %40'ında, *rhabdomyosarkom* olgularının %19-22'sinde, *leiomyosarkom* olgularının %10'unda, *Malign fibröz histiyositom* olgularının %9'unda, nöroblastom olgularının %39'unda ve *Ewing's/ Primitif nöroektodermal tümörlerin* %22'sinde, enflamatuar *miyofibroblastik* tümörlerin %28-62'sinde rapor edilmiştir [33]. Yapılan diğer çalışmalarda *ALK* geninin programlanmamış ekspresyonunun lenfomaların malign transformasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir [38]. Buna ilaveten, büyük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda, 2. kromozomun p kolu içindeki

inversiyon ile oluşan *ALK* ve *EML4* genlerinin yeni bir füsyon geni oluşturduğu gösterilmiştir [39].



ALK and 21 partners and/or recurrent translocations. Editor 08/2001 ; last update 05/2008

Şekil 2: *ALK* geninin çeşitli hastalıklarda diğer genlerle yaptığı translokasyonlar [34].

1.5.1 *ALK* Geni ile Nöroblastom İlişkisi

ALK geni ile nöroblastom arasındaki ilişkiyi ilk olarak; ailesel nöroblastom soyağaçlarında SNP (Tek Nükleotit Polimorfizmi) *array* çalışmaları 2. kromozomun p23-24 bandlarında önemli bir linkaj sinyalini Mossé ve arkadaşları tanımlamıştır. Aynı araştırmacılar bölgesel aday genleri tekrar sekanslayarak, *ALK* geninin tirozin kinaz bölgesinde missense mutasyonları saptadı. Buna ilaveten bu çalışmada, 194 yüksek riskli nöroblastom örneklerinin %12.4'ünde tirozin kinaz bölgesinde somatik olarak kazanılmış mutasyonları gösterdiler. Yapılan çalışmada *ALK* geninin 29 ekzonun sekanslanmasıyla, saptanan probandların 8'inde *ALK* tirozin kinaz bölgesinde 3 farklı tek baz değişimi tanımlanmış olup 218 normal kontrol allelinde ise *ALK* tirozin kinaz bölgesinin sekanslanmasında mutasyon saptanmamıştır. Yapılan çalışmada mutasyona uğrayan *ALK*'nın fosforillendiği immüno blotlama yöntemi ile gösterilmiştir [40]. Aynı çalışmada, mutasyonların *ALK* proteinin hangi bölgesinde olduğuna dair yapılan analizlerde, ailesel olgularda tanımlanan mutasyonların sıklıkla, *ALK* protein yapısının p ilmeği, aktivasyon ilmeği ve β 4 fiberinde bulunduğu saptanmıştır [40].

Yapılan diğer çalışmalarda, somatik olarak kazanılmış mutasyonların ise, *ALK* proteinin katalitik bölgesinde ya da C heliksinde bulunduğu gösterilmiştir [36]. Bir başka çalışmada ise

saptanan somatik mutasyonların *ALK* proteinin N terminalinde, C heliksinde ve katalitik ilmekte bulunduğu gösterilmiştir [37].

Aynı çalışmada genomdaki kopya sayısı değişimlerini değerlendirmek amacıyla “Single Nükleotit Polimorfizm” (SNP) temelli mikroaray çalışması yapılmış ve 112 olgunun %22.8’inde *ALK* lokusunu da içeren 2p bölgesinde dengesiz kazanım –kısmi trizomi-saptanmıştır. Buna ilaveten olguların %3.3’ünde yüksek düzeyde *ALK* amplifikasyonu gösterilmiştir [37]. Ayrıca; *ALK* kopya sayısındaki değişimlerin (kazanım veya amplifikasyon) agresif klinik fenotiple ve nöroblastomun mortalitesi ile yüksek derecede ilişkili olduğu bulunmuştur [40, 41].

Son zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, kalıtsal nöroblastomun tümör oluşumunda *ALK* onkogeninin önemli bir rol oynadığını desteklemektedir [41, 42].

Yapılan bir başka çalışmada, *ALK* nın sekanslanması sonucunda, 215 nöroblastik tümör dokusunun %6.1’inde ve 24 nöroblastom hücre hattının %33’ünde 8 yeni mutasyon saptanmıştır. Çalışmada mutasyona uğrayan kinazların otofosforile olduğu saptanmıştır. Ayrıca kinaz aktivitesinin, yabancı tiplerle karşılatırıldığında mutasyonla birlikte arttığı gösterilmiştir [39]. Bununla birlikte RNA interferans yöntemiyle, *ALK* nın kısmi susturulmasının, mutant *ALK* açısından pozitif olan nöroblastom hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada saptanan mutasyonların %90’ının kinaz bölgesinde olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada *ALK* mutasyonunun *MYCN* amplifikasyonu ile yüksek derecede korelasyon gösterdiği saptanmıştır [43].

Hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada *ALK*’nın knockdown edilmesiyle hücrelerde apoptozun arttığı ve proliferasyonun azaldığı saptanmıştır [44].

2. AMAC

ALK geninin NBL ile ilişkisini gösteren çalışmalarda, *ALK* geninin yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiş ve bu amplifikasyonun *ALK* nin kinaz aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Buna ek olarak genin *MYCN* onkogeni ile birlikte amplifiye olduğu durumlarda malign tümör oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca *ALK* geninin mutasyonunun ileri düzeyde *MYCN* geni ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar *ALK* geninin nöroblastom için prognostik bir faktör olabileceği yönünde öngörülerde bulunmuşlardır. Ancak, literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde *ALK* gen mutasyonunun sıklıkla, nöroblastomun tüm olgularının içinde sadece %1 sıklıkla meydana geldiği ailesel olgularda saptandığı görülmektedir. Buna ilaveten, nöroblastom olguları sıklıkla sporadik olarak meydana gelmesine rağmen, sadece sporadik olgular üzerinden yürütülen bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Aynı zamanda, ailesel olgular üzerinden yürütülen çalışmalarda saptanan mutasyonlardan hareketle, *ALK* kinaz bölgesinin inhibitörü olabilecek ajanların bütün nöroblastom olguları için bir sağaltım yöntemi olabileceği önerilmektedir.

Literatürde sadece spradik olgular üzerinden *ALK* gen mutasyonunu araştıran herhangi bir çalışmanın olmaması ve çalışmalarda önerilen sağaltım yöntemlerinin sporadik olgular içinde geçerli olup olamacağını araştırmak için bu çalışmayı planladık.

3.YÖNTEM

3.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmamızda hasta grupları, Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) 2003 tedavi protokolü kapsamında Türkiye genelindeki çeşitli üniversite ve devlet hastanelerinden oluşan 35 merkezden bize ulaşan nöroblastom tümör örneklerinden 79'u çalışmanın olgu grubunu oluşturmaktadır. Laboratuvarımıza ulaşan nöroblastom tümör dokusu örnekleri -80°C'de saklanarak çalışmalarda kullanılmak üzere tümör dokusu bankası oluşturulmuştur.

Nöroblastom tümör dokusu örnekleri hasta yakını tarafından imzalanan aydınlatılmış onam formu karşılığında alınmıştır (Bkz.Ek-1).

Çalışmamızın kontrol grubunu, Dokuz Eylül Üniveristesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı'nda yapılan başka bir tez çalışmasında (Sait Tümer "Kalıtsal ve Non-sendromik işitme Kaybı Olgularının Aday Lokuslarındaki Mutasyonel Analizi" 2007, D.E.Ü, S.B.E, Yüksek Lisans Tezi, Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Oğuz Altungöz) nöroblastom tanısı almadığı bilinen 96 hasta DNA'sı oluşturmuştur.

3.2 Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu

Hastaya ait tümör dokusundan DNA örnekleri, fenol-kloroform-isoamil alkol yöntemiyle genomik DNA ekstraksiyonu ve amonyum asetat presipitasyonu yöntemiyle elde edilmiştir. Aynı zamanda fenol-kloroform-isoamil alkol yöntemiyle DNA elde etmek için uygun miktarda olmayan tümör dokusu örneklerinden DNA eldesi için "High Pure PCR Template Preparaiton Kit" (Roche , Cat no:11796828001 version june 2007) kullanılmıştır.

3.2.1 Kullanılan Stok Çözeltiler ve Hazırlanışları

1- TNE +SDS çözeltisi:

<u>Stok</u>	<u>Alınacak miktar</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
5M NaCl	2ml	0.1M
0.5 M EDTA	2ml	20mM
1M Tris-Cl	5ml	25mM
%10 SDS	10ml	%1

Çözelti 81 ml dH₂O ile 100 ml ye tamamlanıp, otoklavlanarak steril edilip ve oda sıcaklığında saklandı.

5M NaCl 100 ml

29.2 gr NaCl tartılır

100 ml ye tamamlanıp otoklavlandı.

1M Tris-Cl 100 ml

12.1 gr Tris-baz tartılır

pH 8.0 a %37 lik HCL ile getirildi.

100 ml ye tamamlanıp otoklavlandı.

0.5 M EDTA 100 ml

18.61 gr EDTA tartılır

20 gr NaOH pelleti kullanılarak pH 8.0 ayarlandı.

100 ml ye tamamlanıp otoklavlandı.

%10 luk SDS 100 ml

10 gr SDS tartılır üzerine 80 ml su kondu ve pH 7.2 ye ayarlandı.

100 ml ye dH₂O ile tamamlanıp filtreleme yapılarak steril edildi.

2- 3M NaOAC 100ml

24.6 gr NaOAC

pH 5.2 ye glasiyal asetik asit ile ayarlandı..

100 ml ye dH2O ile tamamlanıp filtreleme yapılarak steril edildi.

Filtreleme işlemi 10 ml lik enjektöre 0.2 µm lik filtreleme aygıtı takılarak yapıldı.

3.2.2 Fenol-kloroform-isoamil alkol Yöntemiyle DNA Eldesinde Kullanılan Protokol

1.GÜN

- 1) -80 ° C den alınan örnekler oda sıcaklığında çözüldükten sonra 150-200 mg doku parçası ayrılır.
- 2) 150- 200 mg doku parçası, petri kabı içinde pipet ucu ve bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrılır ve içine 3 ml Hanks solusyonu konur.
- 3) Tüm parçalar pipetör yardımıyla 15 ml lik mavi kapaklı tüplere konup, petri kabı tekrar 3 ml lik Hanks ile yıkanıp tüpe konur ve 200 g de 10 dk santrifüj yapılır ve üst faz sıvı atık kabına atılır.
- 4) Tüpte kalan pellet vortex yapılarak kaldırılır ve üzerine 4 ml TNE+SDS tamponundan ve 20 mg/ml proteinaz-K dan 100 µl eklenerek alt-üst ettikten sonra 37 ° C ye ayarlanmış su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılır.

2.GÜN

- 1) 37° C deki süspansiyon tam homojenize olmamışsa 10 -15 dk 55 ° C de bekletilerek homojenize olması sağlanır.
- 2) Süspansiyonun üzerine eşit hacimde steril cam pipet çeker ocakta 4.5 ml fenol-kloroform-izoamil alkol eklenir. Karışım süt kıvamına gelinceye kadar alt-üst edilerek karıştırılır.
- 3) Karışım + 4 ° C de 3640 g (3540 rpm) 20 dakika santrifüj yapılır. Üst faz kesik uçlu 1000 mk lik pipetle yeni bir mavi kapaklı tüpe aktarılır. Pellet olan tüp deney sonunda DNA görene kadar saklanır.
- 4) Yeni tüpe alınan sulu fazın üzerine 3.5 FKİ konularak 10 dk boyunca alt - üst edilir ve yine 3640 g de 20 dk santrifüj yapılır

- 5) Üst faz yeni bir mavi kapaklı tüpe kesik uçlu pipetle alınır alt fazın olduğu tüp saklanır. Yeni tüpe alınan sulu faz üzerine cam pipetle 4.5 ml kloroform eklenir ve 10 dk boyunca alt-üst ettikten sonra yine 3640 g de 20 dk santrifüj yapılır.
- 6) Üst faz yeni bir mavi kapaklı tüpe kesik uçlu pipetle alınır ve alt fazın olduğu tüp saklanır. Sulu fazın üzerine -20 ° C de önceden soğutulmuş %96 lık etanolde 8.4 ml ve 700 µl amonyum asetat (10x) eklenir.
- 7) Yatay hareketler ile karıştırılıp DNA ipliklerinin oluşumu gözlenir.
- 8) DNA ipliklerinin oluşumu gözlendikten sonra steril plastik öze ile alınıp 500 µl % 70 lik alkol olan mikrosantrifüj tüpünün içinde 10 sn kadar bekletilerek yıkanır.
- 9) Alkolden çıkarılan plastik öze oda sıcaklığında 1-2 dk bekletilerek alkolün uçması sağlanır.
- 10) Steril ependorf tüpü içine 1mM EDTA çözeltisinden 750 µl konulur ve öze ucu boğum olduğu yerden kırılıp bu çözelti içerisine bırakılıp + 4 °C veya -20 °C'de saklanır.

3.2.3 High Pure PCR Template Preparation Kit ile DNA eldesinde kullanılan protokol

- 1) Doku miktarı 25-50 mg olacak şekilde tümörden örnek alınıp bistüri yardımıyla petri kabı içerisinde çok küçük parçalara ayrılır.
- 2) Steril edilmiş 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne, küçük parçalara ayrılmış tümör dokusu, 200 µl Tissue Lysis buffer ve 40 µl proteinaz-K eklenip karıştırılır.
- 3) 55 °C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edilir.
- 4) 200 µl Binding Buffer eklenir ve 70 °C'deki su banyosunda 10 dk inkübe edilir. Aynı zamanda Elution Buffer 70 °C'deki su banyosuna konur.
- 5) Oda sıcaklığında bulunan izopropanolden 100 µl eklenir.

- 6) Toplama tüpünün içine High Filter Tube yerleştirilir. rnek filter tüpün üst rezervuarına boşaltılarak 1 dk 8000g de santrifüj yapılır.
- 7) Santrifüj sonrası collection tüpünden filter tp çıkarılır ve toplama tüpü atılır.
- 8) Filter tp yeni bir toplama tüpüne konur.
- 9) Filter tüpün üst rezervuarına 500 µl inhibitör removal buffer eklenir ve 1dk 8000g de santrifüj yapılır.
- 10) Filter tp yeni bir toplama tüpüne konur.
- 11) Filter tüpün üst rezervuarına 500 µl wash buffer eklenir ve 1dk 8000g de santrifüj yapılır.
- 12) Filter tp yeni bir toplama tüpüne konur.
- 13) Filter tüpün üst rezervuarına 500 µl wash buffer eklenir ve 1dk 8000g de santrifüj yapılır.
- 14) “Flowthrough” sıvısı uzaklaştırdıktan sonra 10 sn maksimum hızda santrifüj yapılır.
- 15) Filter tp steril 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir. Filter tüpün üst rezervuarına 70 ° C deki su banyosunda ısıtılmış Elution Buffer dan 200 µl eklenir ve 1 dk 8000g de santrifüj yapılır.
- 16) 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA -20 ° C de saklanır.

3.2.4 Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması

Protokoller çerçevesinde elde edilen DNA lar, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuar'ında bulunan sekiz kanallı UV spektrofotometre (NanoDrop8000 USA) ile 260 nm de optik yoğunluğu (O.D) ölçüldü. Örneklerin spektrofotometrik ölçümü sonucunda 260 ve 280 nm deki absorbans değerlerinden örneklerin konsantrasyonu saptandı. Her bir örnek için ölçüm 3 kez tekrarlanıp, hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalaması alındı.

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Gen Bölgelerinin Çoğaltılması:

Çalışmada 8 farklı primer çifti kullanılarak *ALK* geninin 20-28 ekzonları çoğaltıldı. Primer olarak, Chen Y. ve arkadaşlarının kullandığı ileri ve geri primerler seçildi. Primerlerin kontrolü NCBI veri tabanı üzerinden *ALK* geninin tüm dizisi indirilerek Fast PCR programı aracılığıyla yapıldı.

3.3.1 *ALK* Geni 20. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 323 bp den oluşmaktadır.

```
697801 aatacaata attatccc atatatctga ttttagctt tgcatttact ttaatcatg
697861 cttcaattaa agacacacct tctttaatca ttttattagt atttctaagt atgatggaaa
697921 ggttcagagc tcaggggagg atatggagat ccagggaggc ttctgtAGG AAGTGGCCTG
697981 TGTAGTgcct caagggccag gctgccaggc catgttcag ctgaccacc accctgcagtg
698041 taccgccgga agcaccagga gctgcaagcc atgcagatgg agctgcagag ccctgagtag
698101 aagctgagca agctccgcac ctgcaccatc atgaccgact acaaccccaa ctactgcttt
698161 gctggcaaga cctcctccat cagtgcactg aaggagggtc cgcgaaaaa catcacctc
698221 attcgggtgag cgccctgctg ccgtcctggg aggagagggg TGCAGTGTAG GGGCTGAATG
698281 TTATcacagc accgcagact cctctagcca caaaaggccg gcagagccct ccctatgggc
698341 acccctagcc ctccctaggag gacaagcctt gacattcagg gccatgtatg ttggcttaca
698401 ttaactccca tagtttatgg agtttataca atgagaggag aaccagggtc ctccctcaaaa
698461 ttcattcaga tgtgctctct ccaagtctac ctggctcccc ttcctccag gggagcaggg
```

Şekil 3: *ALK* geni 20. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: AGGAAGTGGCCTGTGTAGTG

Reverse: ATAACATTCAGCCCCTACAC

3.3.2 ALK Geni 21-22. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 381 bp den oluşmaktadır.

```
698761 cttaccagtt ttcaggtgaa gaactggaag cccgagattg catagcaaag ccatggtgag
698821 ggtattactc ctgagtggt atgttaccac cgcctctcgt gtttgccac taaatgtgac
698881 gccaggetc aggacccccca gctgcctcat tattgtggcc tgttTGACTC TGTCTCCTCT
698941 TGTCttctcc tttgcacagg ggtctgggccc atggcgccctt tggggaggtg tatgaaggcc
699001 agggtgtccgg aatgcccaac gacccaagcc ccctgcaagt ggctgtgaag gtaagaagtg
699061 gctcactctt gagcctgccc ttggcttgcg gactctgtag gctgcagttc tcagctcaca
699121 gcctcctcct cctccccacc ctccccttct ctgccagac gctgcctgaa gtgtgctctg
699181 aacaggacga actggatttc ctcatggaag ccctgatcat caggtaaagc cacagagaga
699241 caccctcacc ccaactcccc tctgccccca aaGAACCTGG AGAGGTTTCT AACagatcga
699301 tatctccaag ggaaatcgtg ttgtccctag catgtcccct tttctccagt aggagactcc
699361 caaacattct agacacttct taccagaatg gaacaaccct tgatggtgtg ttcagaaca
```

Şekil 4: ALK geni 21-22. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: TGA**CTCTGTCTCCTCT**TGTC

Reverse: TTAGAA**ACCTCTCCAGG**TTC

3.3.3 ALK Geni 23. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 250 bp den oluşmaktadır.

```
700561 agcaagattc tgggttttagg ctcagcccgg gaccctgct gcccatgttt acagaatgcc
700621 tttatacatt gtagctgctg aaaatgtaac tttgtatcct gttcctccca gtttAAGATT
700681 TGCCCAGACT CAGCtcagtt aatthttggtt acatccctct ctgctctgca gcaaattcaa
700741 ccaccagaac attgttcgct gcattggggg gagcctgcaa tcctgcccc gttcctcct
700801 gctggagctc atggcgggg gagacctcaa gtccttcctc cgagagacct gccctgccc
700861 ggtgagtgag aaccagtctt tgctgCAGTT GTTGTGCCAA GGACAggagc aaggatggaa
700921 ggagcaagag tgggcagcct gggtagcaag ttcctcgatg gaaccaggg tgtcaacttt
```

Şekil 5: ALK geni 23. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: AAGATTTGCC**CAGACTCAGC**

Reverse: TGT**CCTGGCACAACA**CTG

3.3.4 ALK Geni 24. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 259 bp den oluşmaktadır.

```
707281 ccagagaggt ctgggttggg gccagggcat ccaaattctt tcaaatgcct ccaggtgatt
707341 tctaagtgtc agccagggcc gaggcccctg gtgtagctgc atgttcacgg tctgcctcct
707401 tgtgagcact ggaagccagc atttcAGATT TCCCTCCTCT CACTGacaag ctcctcgtca
707461 gtggcccgct tctgtctccc cacagagcca gccctcctcc ctggccatgc tggaccttct
707521 gcacgtggct cgggacattg cctgtggctg tcagtatttg gaggaaaacc acttcatcca
707581 ccggtgagtc aaagtgactg tgctcttctt gtcctcctgt cgctgatctg tgtgcttccc
707641 cgCAGATCTC AAGGGCTCAC ATtccccct tcagagcaga atactaggtc tccctccaga
707701 gccatttgga tgtaggatga ttcagctttg ttttattgtt tttttgtgag agacagggtc
707761 tcactttgtt gccagggctg gtctcgaatt tctgggctcc agtaatcctc ccaccttggc
```

Şekil 6: ALK geni 24. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: AGATTTCCCTCCTCTCACTG

Reverse: ATGTGAGCCCTTGAGATCTG

3.3.5 ALK Geni 25. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 283 bp den oluşmaktadır.

```
711541 ctcacactga agtataactat actaaaggaa atatagggaa gggaaaggaac tattttaaact
711601 tcagcttgga gataaaatcc TAGTGATGGC CGTTGTACAC tcatcttctt agggataaaa
711661 ttaggaaaatg catttctttt cttcccagag acattgctgc cagaaactgc ctcttgacct
711721 gtccaggccc tggaaagagt gccaagattg gagacttcgg gatggcccga gacatctaca
711781 ggtgagtaaa gactgcctca cccctccggg cctgtctctt ccacctcagc ccctcaagaa
711841 tgggggtgtg ctgcttgTCC CTTACATCAT CTCCTGGtac cctgtcaact ttctacctaa
711901 aatttcacta agttcctttt caggctatgg gaaaccttaa ttagtgacca tgcccgaagg
711961 cctaaatctg ggatcacact tctgcagta attgacacca agcttttttt tttttttttt
```

Şekil 7: ALK geni 25. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: TAGTGATGGCCGTTGTACAC

Reverse: CCAGGAGATGATGTAAGGGA

3.3.6 ALK Geni 26. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 274 bp den oluşmaktadır.

```
714061 tcattcctct catgcctctc gtggtttggt ttgtcttcta ttaaagaca ccaaagttct
714121 taactaaatg atctgtgtgc ccctgctctc ctctgaacc gccaggact catggttaat
714181 ttcagacctt taatgggtag actatattgt tgccactttc tcaactttcc cagcagGGCA
714241 GATGCTTAAT GCCATCtcca gatcctagtt tggttttcct ctcttcccc acagggcgag
714301 ctactataga aaggaggct gtgccatgct gccagttaag tggatgcccc cagaggcctt
714361 catggaagga atattcactt ctaaaacaga cacatggtaa gtcagccatc atcctccagg
714421 tatccctgca gccataaggt ggtgctcctg ggccaaagga cTCTATACTC TAAGCCGGGA
714481 Gcccgtgtgt tagtagggag ggaaaagaga agaatcaata caccgacaa cagtggttct
714541 caaacgtgag catctatcag aattcataaa gacttgtaa aattcagatt attggacctt
```

Şekil 8: ALK geni 26. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: GGCAGATGCTTAATGCCATC

Reverse: CTCCCGGCTTAGAGTATAGA

3.3.7 ALK Geni 27. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 246 bp den oluşmaktadır.

```
723661 ctcagcacag aaacgactta aaaatcaaca ggggttgctt ttaaggag catcatgtgt
723721 agtattttct tattttttaa atttttctac attttaagag ttctatgta tggaaaagg
723781 tataatgggg gaaaaaaaaagg ttgaaattgt atgtctgtgt gcctgtgtgt gtgtgtgaat
723841 gtgggTGGGT GTGTCTATAT CCATCtccat gtcctctgtc ccatgcccag gtcctttgga
723901 gtgctgctat gggaaatctt ttctcttggga tatatgcat accccagcaa aagcaaccag
723961 gaagttctgg agtttgtcac cagtggaggc cggatggacc caccgaagaa ctgccctggg
724021 cctgtgtatg actcttttaG GAACACTTCT GCTAGTTACt aagcagtttt tcttttcaaa
724081 aaatatccag agccacatat gcttctttaa gatgaagggg cagatggctg ccctcccttt
724141 aatatgcccc aagatgcaaa tgtgactgag acttcagtga gatggatgag tctcccaggc
```

Şekil 9: ALK geni 27. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: TGGGTGTGTCTATATCCATC

Reverse: GTAACACTAGCAGAAGTGTCC

3.3.8 ALK Geni 28. Ekzonun Çoğaltılması

Primerler dahil olmak üzere amplifiye edilen alan 320 bp den oluşmaktadır.

```
724441 gaatattctg tccccaaagt ggctttaact caggaatgga gtgacagcag ccgtgggtaa
724501 cataaacatc aggatgtctg tgntagatac ctttacacct gcgactcctt ccttgaccaa
724561 tcagcagggg gcagcatagg ccaagtacac ggggcctaga cgagttcgca CCCTCAACGT
724621 ATTCGTTGCA accctggggc tggaagaaaa tatatttttc atcattgtgc ttctccttat
724681 ttttaattaat gtgcttcttc ttttagatac cggataatga ctcagtgctg gcaacatcag
724741 cctgaagaca ggcccaactt tgccatcatt ttggagagga ttgaatactg caccagga
724801 aaacattttc tccctttggt caacatttac tctatatgaa acagtcttaa agatggcaaa
724861 taccgaaata tgaaaTAGGT CAAGCCAGTC AGAGTacaag atttatgatc aaaatagtga
724921 aaattaattt tctctaaaat gaaatgactg gtgtctccat ttgccattt tgtaaaataa
724981 atattagtaa cttcaccagc acacagcaca gtgccagaca cacagtaaaa actggggaat
```

Şekil 10: ALK geni 28. ekzon primer oturma bölgeleri (koyu ve büyük harf) ve amplifiye edilecek gen bölgesi.

Forward: CCCTCAACGTATTCGTTGCA

Reverse: ACTCTGACTGGCTTGACCTA

3.3.9 PCR'da Kullanılan Komponentler ve PCR'ın Hazırlanışı

Primerlerin Hazırlanması (Alpha DNA)

Liyofilize halde gelen tüm primerler firmanın önerdiği doğrultuda son konsantrasyon 100 pmol/µl olacak şekilde steril distile su ile çözüldü. Çözülen primerler ana stok olarak kullanıldı. Ara stok olarak her primer 25 pmol/µl olacak şekilde 1:3 oranında steril distile su Biological Industries Ultra Pure Water (Cat No:01-866-1A) ile seyreltildi. Hazırlanan ara stoklar 25 µl hacimlerde bölünerek ana stoklarla birlikte -20°C'ye kaldırıldı.

DNA Taq Polimeraz Enzimi (5U/µl): Bioron (Cat No: 101005)

PCR reaksiyonuna; 25 µl için 1-1,5 ünite, 50 µl için 3 ünite olacak şekilde eklendi.

10X Taq Tamponu (MgCl₂'siz) KCl 'li: Fermentas

PCR reaksiyonuna toplam hacimde 1X olacak şekilde ve primerlere uygun (+ KCl) tampon kullanıldı. Bu tampon Taq Polimeraz enzimi ile birlikte üretici firma tarafından verilmiştir.

dNTP'ler (100 µmol/ml): Larova (Cat No: NU-1019S)

100 mM'lık her bir dNTP'den (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) 10 µl alındı (toplam 40 µl). Üzerine 460 µl steril distile su ilave edildi. Karışım 100 µl halinde tüplere bölünüp eksi 20°C'ye kaldırıldı. PCR reaksiyonunda bu stoktan (2mM dNTP) alınıp kullanıldı.

25 mM MgCl₂: Fermentas

PCR reaksiyonu başına toplamda primere göre optimizasyonlar yapılarak 1 ile 4 mM arası eklendi. Bu çözelti Taq Polimeraz enzimi ile birlikte üretici firma tarafından verilmiştir.

PCR'ın Hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl veya 50 µl olacak şekilde Tablo 1'deki bileşenler sırasıyla 0,2 µl steril ve nükleaz enzimlerinden arındırılmış tüplere kondu. Çoklu PCR çalışmalarında bu bileşenlerden su ve kalıp DNA hariç diğerleri karışım halinde hazırlanıp reaksiyonlara eklendi. Reaksiyonda kullanılan bileşenler sürekli buz üzerinde tutuldu.

PCR reaksiyonları Tablo 1'deki miktarlara göre kuruldu. Çoklu PCR reaksiyonları kurulurken ilk olarak H₂O ardından kalıp DNA eklendi. Hazırlanan reaksiyon karışımına Taq polimeraz enzimi en son eklendi. Karışım iyice homojenize edildikten sonra tüplere dağıtıldı. Her bir tüpte köpürtülmeden iyice pipetaj yapıldı ve hızla cihaza yerleştirildi. PCR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan aygıtla (96 Universal Gradient Peqstar, Thermal Cycler) yapıldı.

Tablo 1: 25 ve 50 µl'lik PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	50 µl rx	25 µl rx
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			39.4 µl	19.7 µl
10X Taq tamponu	10X	2X	5.0 µl	2.5 µl
2 mM dNTP Karışımı	100 mM	2 mM	1.0 µl	0.5 µl
İleri Primer	25 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5 µl	0.25 µl
Geri Primer	25 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5 µl	0.25 µl
Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	0.75U	0.6 µl	0.3 µl
25 mM MgCl ₂	25 mM	1-4 mM	2.0 µl	1.0 µl
DNA Kalıp		40µg	1.0 µl	0.5 µl

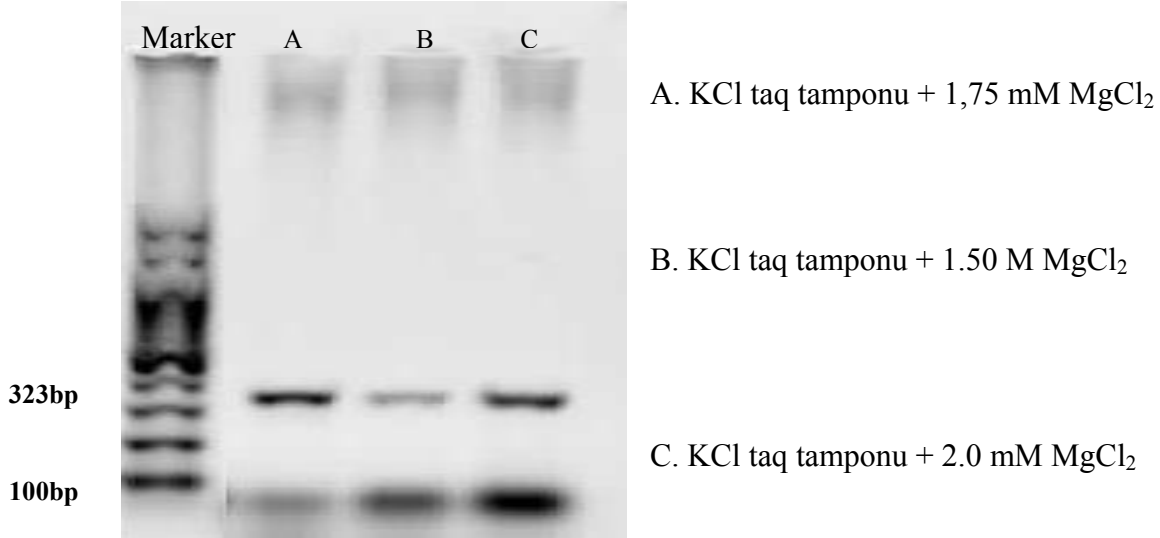
3.3.10 PCR Koşulları ve Optimizasyon Deneyleri

Her bir primer seti için optimizasyon deneyleri yapıldı. Primere göre ise Taq polimeraz tamponu (+ KCl) ve MgCl₂ miktarları belirlendi. Optimizasyon deneyleri sonucunda her bir primer için optimum MgCl₂ miktarı, tampon türü ve ısıl değişkenleri belirlendi. Reaksiyona katılan bileşenler Tablo 1 referans alınarak ve 25 µl hacimde kuruldu.

Tablo 2: 20 ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	20.EKZON Miktarlar	TERMAL PROFİL			
			Sıcaklık	Zaman	
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk	33 siklus
2 mM dNTP mix	0.5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn	
20 F	0,25 ul	Annealing	57,4 °C	30 sn	
20R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn	
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk	ÜRÜN 323 bp
DNA	1ul				
Su	18.55				
25 mM MgCl ₂	1.75 ul				
Toplam	25 ul				

ALK geni 20. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



Şekil 11: Amplifiye edilen *ALK* geni 20.ekzon görüntüsü

ALK geni 20. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyonundan sonra Annealing sıcaklığı optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir. Koşullar Annealing sıcaklığı gradienti yapılarak oluşturuldu. Buna göre merkez sıcaklığı 55 °C alınarak merkezin sağında ve solundaki kuyulara farklı sıcaklıklar oluşturuldu.

A. KCl taq tamponu + 1,75 mM MgCl₂ + Annealing sıcaklığı 53,3 °C

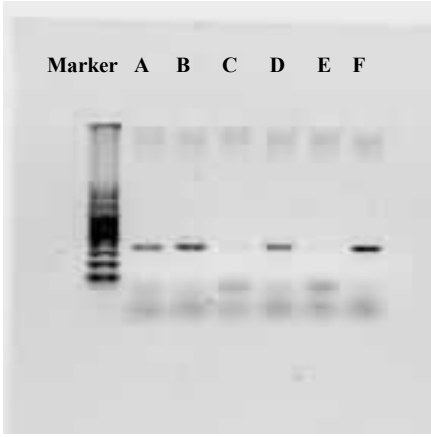
B. KCl taq tamponu + 1,75 mM MgCl₂ + Annealing sıcaklığı 54,7 °C

C. KCl taq tamponu + 1,75 mM MgCl₂ + Annealing sıcaklığı 55,2 °C

D. KCl taq tamponu + 1,75 mM MgCl₂ + Annealing sıcaklığı 55,8 °C

E. KCl taq tamponu + 1,75 mM MgCl₂ + Annealing sıcaklığı 56,5 °C

F. KCl taq tamponu + 1,75 mM MgCl₂ + Annealing sıcaklığı 57,4 °C

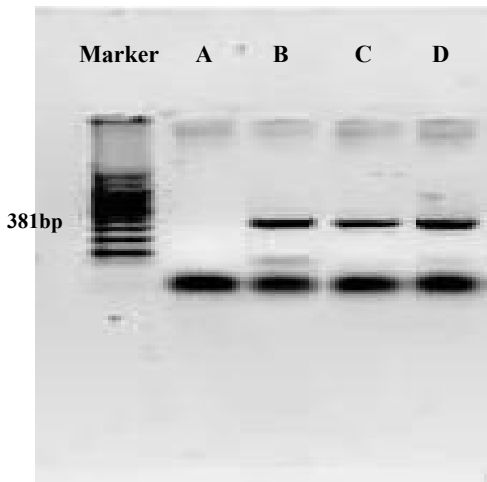


Şekil 12: *ALK* geni 20.ekzonunun annealing sıcaklığı için yapılan optimizasyon görüntüsü

Tablo 3: 21-22. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	21-22.EKZON	TERMAL PROFİL			
		Miktarlar	Sıcaklık	Zaman	
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk	33 siklus
2 mM dNTP mix	0.5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn	
21-22 F	0,25 ul	Annealing	55 °C	30 sn	
21-22 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn	
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk	ÜRÜN 381 bp
DNA	1 ul				
Su	19.2				
25 mM MgCl ₂	2 ul				
Toplam	25 ul				

ALK geni 21-22. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



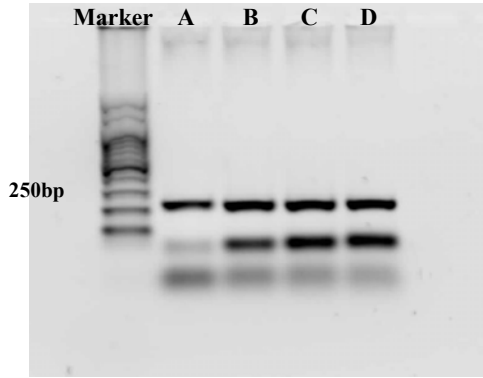
- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
- B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
- D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 13: Amplifiye edilen *ALK* geni 21-22.ekzon görüntüsü

Tablo 4: 23 ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	23.EKZON	TERMAL PROFİL		
		Miktarlar	Sıcaklık	Zaman
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk
2 mM dNTP mix	0.5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn
23 F	0,25 ul	Annealing	58 °C	30 sn
23 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk
DNA	1 ul			
Su	19.3			
25 mM MgCl ₂	1 ul			
Toplam	25 ul			

ALK geni 23. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



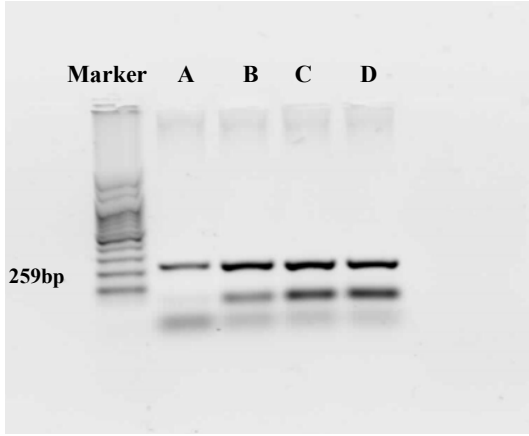
- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
- B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
- D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 14: Amplifiye edilen *ALK* geni 23.ekzon görüntüsü

Tablo 5: 24. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	24.EKZON	TERMAL PROFİL		
		Miktarlar	Sıcaklık	Zaman
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk
2 mM dNTP mix	0,5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn
24 F	0,25 ul	Annealing	55 °C	30 sn
24 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk
DNA	1 ul			
Su	18,3			
25 mM MgCl ₂	2 ul			
Toplam	25 ul			

ALK geni 24. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



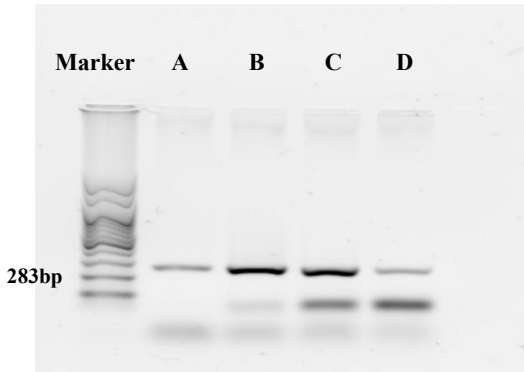
- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
 B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
 C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
 D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 15: Amplifiye edilen *ALK* geni 24.ekzon görüntüsü

Tablo 6: 25. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	25.EKZON Miktarlar	TERMAL PROFİL			
			Sıcaklık	Zaman	
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk	33 siklus
2 mM dNTP mix	0,5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn	
25 F	0,25 ul	Annealing	58 °C	30 sn	
25 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn	
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk	ÜRÜN 283 bp
DNA	1 ul				
Su	18,8				
25 mM MgCl ₂	1,5 ul				
Toplam	25 ul				

ALK geni 25. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



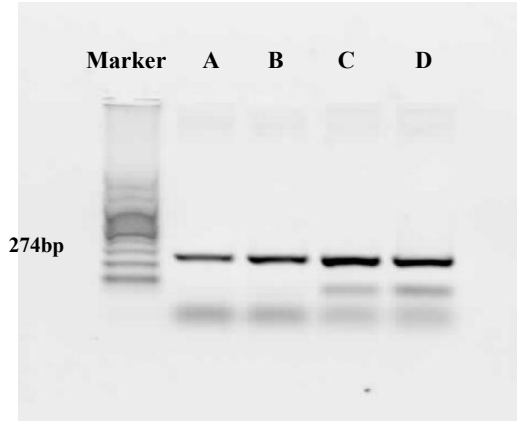
- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
 B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
 C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
 D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 16: Amplifiye edilen *ALK* geni 25.ekzon görüntüsü

Tablo 7: 26. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	26.EKZON	TERMAL PROFİL			
		Miktarlar	Sıcaklık	Zaman	
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk	33 siklus
2 mM dNTP mix	0,5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn	
26 F	0,25 ul	Annealing	55 °C	30 sn	
26 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn	
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk	ÜRÜN 274 bp
DNA	1ul				
Su	18,8				
25 mM MgCl ₂	1,5				
Toplam	25 ul				

ALK geni 26. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



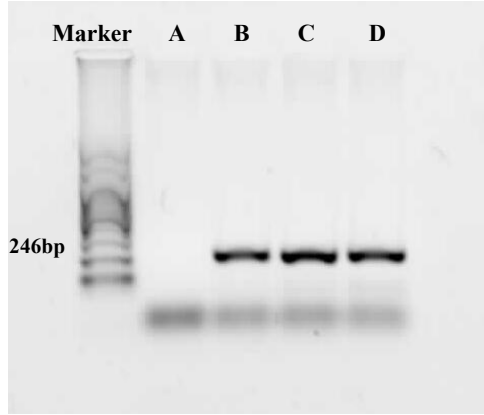
- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
- B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
- D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 17: Amplifiye edilen *ALK* geni 26.ekzon görüntüsü

Tablo 8: 27. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	27.EKZON	TERMAL PROFİL			
		Miktarlar	Sıcaklık	Zaman	
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk	33 siklus
2 mM dNTP mix	0,5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn	
27 F	0,25 ul	Annealing	55 °C	30 sn	
27 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn	
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk	ÜRÜN 246 bp
DNA	1 ul				
Su	18,8				
25 mM MgCl ₂	1,5				
Toplam	25 ul				

ALK geni 27. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



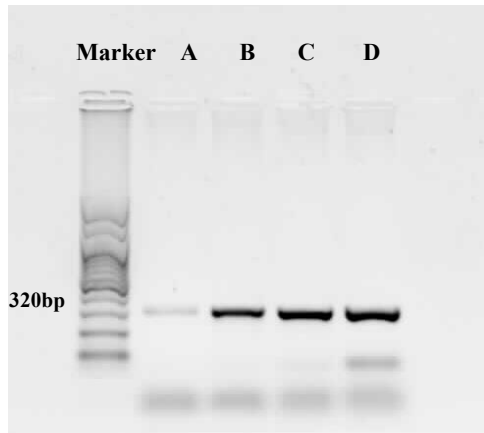
- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
- B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
- D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 18: Amplifiye edilen *ALK* geni 27.ekzon görüntüsü

Tablo 9: 28. ekzonun optimize edilen PCR değişkenleri

Bileşenler	28.EKZON Miktarlar	TERMAL PROFİL			
			Sıcaklık	Zaman	
10x Taq Buffer	2,5 ul	Ön Denat.	96 °C	5 dk	33 siklus
2 mM dNTP mix	0,5 ul	Denatürasyon	96 °C	30 sn	
28 F	0,25 ul	Annealing	55 °C	30 sn	
28 R	0,25 ul	Elongation	72 °C	30 sn	
Taq Pol.	0,2 ul	Final ex.	72 °C	5 dk	ÜRÜN 320 bp
DNA	1 ul				
Su	18,8				
25 mM MgCl ₂	1,5ul				
Toplam	25 ul				

ALK geni 28. ekzonun primer seti için MgCl₂ optimizasyon deneyinin koşulları aşağıdaki gibidir.



- A. KCl taq tamponu + 1.0 mM MgCl₂
- B. KCl taq tamponu + 1.5 mM MgCl₂
- C. KCl taq tamponu + 2.0 mM MgCl₂
- D. KCl taq tamponu + 2.5 mM MgCl₂

Şekil 19: Amplifiye edilen *ALK* geni 28.ekzon görüntüsü

3.4 PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı

54 gr Tris-Base (Sigma, T-8524) ve 27.5 gr Borik Asit (Sigma, B-0394) tartılarak 800 ml distile suda çözüldü. Üzerine 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) (Sigma, E-5134) ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Jel hazırlamada ve elektroforez tankında tampon olarak 0.5X TBE hazırlanılarak kullanıldı.

Yükleme Tamponu (Loading Buffer) 6X:

100 bp lik DNA belirteci ve PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde, Fermentas 6x Mass Loading Dye Solution (Cat:R0621) kullanıldı.

100 bp lik DNA belirteci:

PCR ürünlerinin uzunluklarını saptamak için, Bioron 100 bp DNA belirteci (Cat:306005) kullanıldı.

Agaroz Jelin Hazırlanışı:

PCR ürünlerinin boyutu 246bp ile 381 bp arasında olduğundan %2'lik jel hazırlandı. Yüzde ikilik jel için 0.60 gr agaroz (Promega, V312A) tartılarak 200 ml'lik erlen içerisine aktarıldı. Üzerine son hacmi 30 ml olacak şekilde 0.5x TBE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Çeşme suyu altında el yakmayacak sıcaklığa kadar soğutulan jel içerisine 2.0 µl Lonza Gel Star (Cat No: #50535) ilave edilerek karıştırıldı.

Hazırlanan jel, yatay mini jel yatağı (Thermo, EC330) içerisine döküldü ve içine yüklem kuyuları oluşturmak için taraklar yerleştirilip oda sıcaklığında donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak örnek yüklenmesi için elektroforez tankına (Thermo, EC330) yerleştirildi.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

Tanka yerleştirilen jelin üzerini 1-2 mm geçecek şekilde 0.5 X TBE tamponu ilave edildi. PCR ürününden 5µl, yükleme tamponundan 1 µl alınarak iyice karıştırıldı. Karışım jelde oluşturulan kuyulara sırayla yüklendi. Jele yüklenen PCR ürünleri 80 V sabit gerilim (Thermo Scientific EC 300 XL) ve 25-30 mA akım koşullarında, 100 bp DNA ağırlık belirteci ile birlikte yürütüldü.

3.4.1 PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Görüntülenmesi

Molekül ağırlığına ve jelin agaroz derişimine bağılı olarak 30-40 dakika yürütülen PCR ürünleri, ultraviyole ışık (~304 nm) altında transilüminatörle (Hoefler UV-25) nitel olarak saptandı. Amplikon DNA dizisine göre sırasıyla;

- *ALK* Ekzon 20 için 323 bp (Şekil 12)
- *ALK* Ekzon 21-22 için 381 bp (Şekil13)
- *ALK* Ekzon 23 için 250 bp (Şekil 14)
- *ALK* Ekzon 24 için 259 bp (Şekil 15)
- *ALK* Ekzon 25 için 283 bp (Şekil 16)
- *ALK* Ekzon 26 için 274 bp (Şekil 17)
- *ALK* Ekzon 27 için 246 bp (Şekil 18)
- *ALK* Ekzon 28 için 320 bp (Şekil 19)

Uzunluklarında beklenen PCR ürünleri, amplikon boyutlarıyla DNA belirtecinin saptama sınırları içinde örtüşecek şekilde elde edildi.

3. 5 DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları

ALK geninin 20- 28 ekzon bölgeleri için 50 µl olacak şekilde PCR reaksiyonları kurularak amplifiye edildi. %2'lik agaroz jelde yürütülen örneklerde her bir ekzona ait uygun büyüklükte bantlar gözlemlendi. Örnekler “Macrogen, (Güney Kore)” firmasına 96'luk kapaklı tüplere konularak gönderildi.

3.5.1 Örneklerin Dizi Analizinin Yapıtırılması

Örnekler “Macrogen, (Güney Kore)” firmasına gönderilerek DNA dizi analizi hizmeti alınıyla sağlandı. Gönderilen PCR ürünleri saflaştırma işleminden sonra ilk olarak ileri primerler kullanılarak Otomatize Sekans Cihazı 3730xl ile dizi analizi gerçekleştirildi. İkinci aşamada; sonuçlara göre mutasyon veya SNP saptanan bireylerin tekrar amplifikasyonları yapılarak geri primerler ile dizi analizi yapıldı.

3.5.2 Kromotogramların Değerlendirilmesi

Dizi analizi yaptırılan şirket tarafından gönderilen veri formatları (pdf, gif ve metin) dizi analizi programı kullanılarak değerlendirilme yapıldı.

Dizi Analiz Programı

Program olarak “Chromas Pro 1.50” kullanıldı. Veri olarak “gif” formatı tercih edildi. Bu formattaki grafik verileri üzerinden heterozigot baz değişimleri tanımlandı. Bu program aracılığıyla aynı zamanda online olarak NCBI sekans servsinden sağlanan “Homo sapiens chromosome 2, GRCh37 primary reference assembly” referans alınarak blast (karşılaştırma) yapıldı. Karşılaştırma için Chromas Pro 1.50 programı üzerinden internet üzerindeki www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi adresi kullanıldı. Blast analizi nükleotid düzeyinde yapıldı. Bu işlemde blast programına girilen *ALK* geni ekzonları için olgu ve kontrol grubunda gerçekleştirilen dizi analizi verileri ile *ALK* geni karşılaştırıldı.

4.BULGULAR

Çalışmamıza elimizde bulunan tümör bankasındaki 79 hasta alınmıştır.

Hastalara ait genetik ve histopatolojik bulgular tümör bankasının oluşturulması ile birlikte kayıt altına alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen 79 olgunun demografik özellikleri ve onkolojik verileri aşağıda verilmiştir. Hasta grubunda bulunan 26 hastanın verileri henüz merkezlerden ulaşmadığı için veri dağılımı 53 hasta üzerinden yapılmıştır.

4.1 Olgu Grubunun Demografik ve Onkolojik Verileri

Tablo10: Olguların cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Sayı	Yüzde
Erkek	31	58.5
Kadın	22	41.5
Toplam	53	100.0

Çalışmaya alınan olguların % 58.5'i erkeklerden oluşmaktadır.

Tablo11: Olguların yaşlarına göre dağılımı.

Yaş grubu	Sayı	Yüzde
≥ 1	36	68.0
<1	17	32.0
Toplam	53	100.0

Çalışmaya alınan olguların %68'i 1 yaşın üzerindedir.

Tablo12: Olguların *MYCN* geni amplifikasyonuna göre dağılımı.

<i>MYCN</i> geni amplifikasyonu	Sayı	Yüzde
Var	14	26.0
Yok	38	72.0
Sonuç çıkmayan	1	2.0
Toplam	53	100.0

Çalışmaya alınan olguların %26'sında *MYCN* geni amplifikasyonu mevcuttur.

Tablo13: Olguların histolojik evrelerine göre dağılımı.

Evre	Sayı	Yüzde
1	8	16.0
2A	3	5.0
2B	2	4.0
3	9	17.0
4	27	51.0
4S	4	7.0
Toplam	53	100.0

Çalışmaya alınan olguların %51'i evre 4 de bulunmaktadır.

Tablo14: Olguların “Shimada” sınıflandırmasına göre histolojik durumları.

Histolojik özelliği	Sayı	Yüzde
İyi Prognoz	11	21.0
Kötü prognoz	28	53.0
Bilinmeyen	11	21.0
Doku tanısı olmayan	3	5.0
Toplam	53	100.0

Çalışmaya alınan olguların %53'ü kötü prognoza sahiptir.

Tablo15: Olguların izlem sonunda son durumlarına göre dağılımı.

Son durum	Sayı	Yüzde
Öldü	12	23.0
Yaşıyor	28	53.0
Takipsiz	6	11.0
Tedavi alıyor	7	13.0
Toplam	53	100.0

Çalışmaya alınan olguların %53'ü yaşamaktadır.

Ayrıca olgu grubu “Children Oncology Group” risk gruplamasına göre değerlendirme yapıldığında, hastaların %53 'ü yüksek risk grubunda bulunmaktadır.

4.2 Olguların DNA İzolasyonu ve Ölçüm Değerleri

Çalışmada hastalara ait tümör dokusu örneklerinden manuel olarak fenol-kloroform-isoamil alkol yöntemiyle ve kit ile DNA elde edildi. Elde edilen DNA lar Nano Drop 8000 cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her bir örnek için birbirini takip eden 3 ölçüm yapıldı ve ortalaması alınarak DNA miktarı ng/ul olarak belirlendi.

Tablo16: Tümör örneklerine ait genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları.

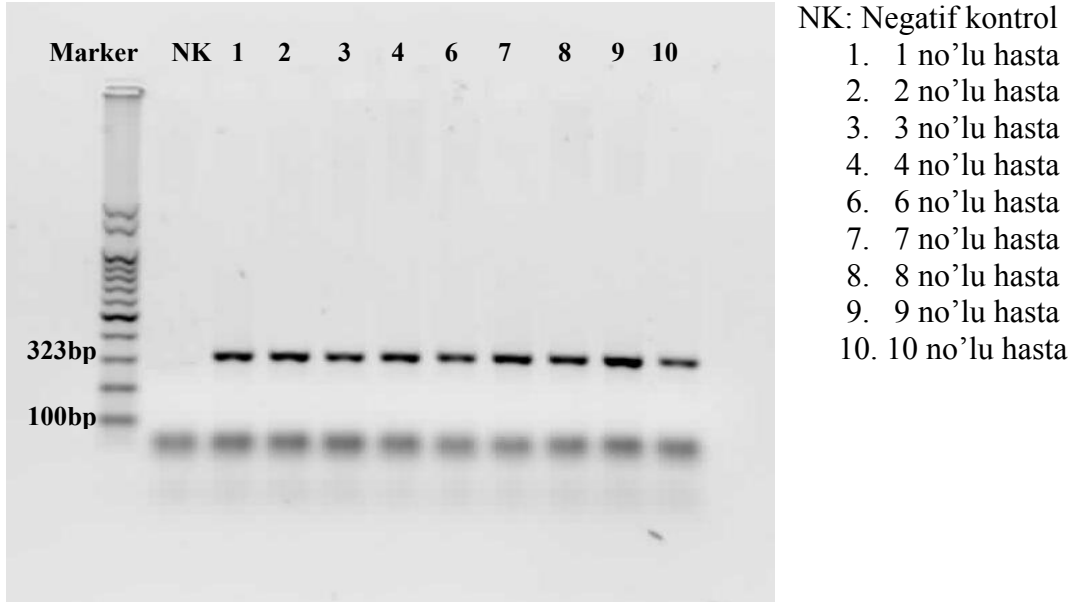
Hasta no:	Abs 260	Abs 280	Ratio	ng/ul					
1	21,04	10,87	1,94	1051,95	63	4,95	2,61	1,90	247,60
2	1,81	0,94	1,93	90,31	64	2,50	1,35	1,85	125,18
3	10,93	5,83	1,88	546,29	71	2,91	1,52	1,92	145,45
4	3,08	1,59	1,94	153,79	75	1,48	0,75	1,98	73,96
7	13,40	6,88	1,95	669,67	78	5,50	2,87	1,92	274,98
8	43,05	22,38	1,92	2152,70	79	13,67	7,06	1,93	683,25
9	14,81	7,64	1,94	740,69	80	11,57	6,11	1,89	578,26
10	0,76	0,41	1,87	38,02	82	9,73	5,11	1,90	486,23
11	13,26	6,87	1,93	662,89	83	15,25	7,88	1,93	762,55
13	30,13	15,41	1,96	1506,47	84	2,79	1,40	1,99	139,09
14	18,67	9,60	1,95	933,41	85	11,05	5,50	2,01	552,72
15	56,05	29,05	1,93	2802,68	86	3,78	1,87	2,03	189,00
18	73,47	45,30	1,62	3673,07	87	7,20	3,77	1,91	360,01
20	6,66	3,35	1,99	332,92	88	3,58	1,89	1,90	178,94
21	20,73	10,60	1,97	1036,47	89	2,29	1,18	1,95	114,51
22	39,82	20,95	1,90	1990,99	95	1,13	0,64	1,78	56,61
23	43,54	22,52	1,93	2177,12	96	1,99	1,03	1,93	99,32
24	75,81	50,96	1,49	3790,54	97	2,23	1,17	1,90	111,61
25	10,97	5,88	1,90	548,47	98	1,50	0,79	1,91	74,94
26	23,21	12,01	1,93	1160,40	99	4,90	2,59	1,89	244,80
27	36,98	19,22	1,92	1848,77	100	6,80	3,52	1,93	340,04
29	48,80	25,47	1,92	2438,02	101	0,54	0,29	1,86	27,05
30	72,87	43,40	1,68	3643,54	102	5,47	2,79	1,96	273,54
32	20,94	10,10	1,90	1047,07	103	10,38	5,43	1,91	519,15
33	25,60	13,33	1,92	1280,23	105	2,74	1,43	1,92	137,00
34	12,96	6,73	1,93	647,73	109	5,23	2,68	1,95	261,65
35	22,98	12,06	1,91	1148,76	113	7,52	3,949	1,90	375,89
36	11,918	6,32	1,89	595,90	115	3,44	1,80	1,91	171,91
37	13,86	7,25	1,91	692,83	116	4,80	2,43	1,98	239,80
38	16,98	8,65	1,96	848,91	117	6,89	83,63	1,90	344,20
39	19,30	10,10	1,91	964,58	118	3,51	1,84	1,91	175,57
40	2,20	1,10	2,00	110,16					
41	13,13	7,01	1,88	656,67					
42	2,64	1,35	1,95	131,97					
43	5,97	3,11	1,92	298,28					
44	20,12	10,56	1,91	1005,81					
45	3,15	1,61	1,96	157,42					
46	2,53	1,55	1,64	126,71					
47	21,99	11,63	1,89	1099,47					
48	18,34	9,57	1,92	919,16					
49	16,65	8,60	1,94	832,32					
51	11,19	5,87	1,91	559,35					
52	22,94	12,01	1,90	1146,91					
54	12,83	6,90	1,86	641,42					
55	4,06	2,07	1,96	202,94					
56	6,37	3,29	1,94	318,21					
60	1,60	0,83	1,91	79,68					
62	1,43	0,74	1,93	71,55					

4.3 Olguların PCR Ürünlerinin Oluşturulması ve Kontrolü

Spektrofotometrik ölçümler ve jel görüntülerine göre uygun saflık ve konsantrasyonda olan DNA'lar PCR'da kalıp olarak kullanıldı. PCR deneyleri, optimize edilen reaksiyon ve ısıl koşullarda yapıldı.

4.3.1 *ALK* geninin 20. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

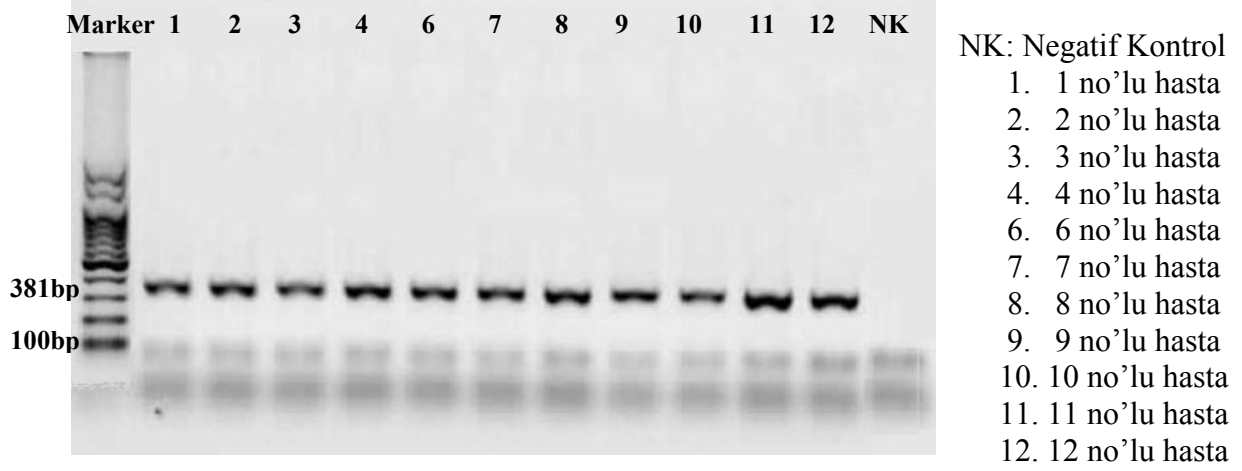
ALK geninin 323 bp'lik 20.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 20'de, 20. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 20: 20. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.2 ALK geninin 21-22. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

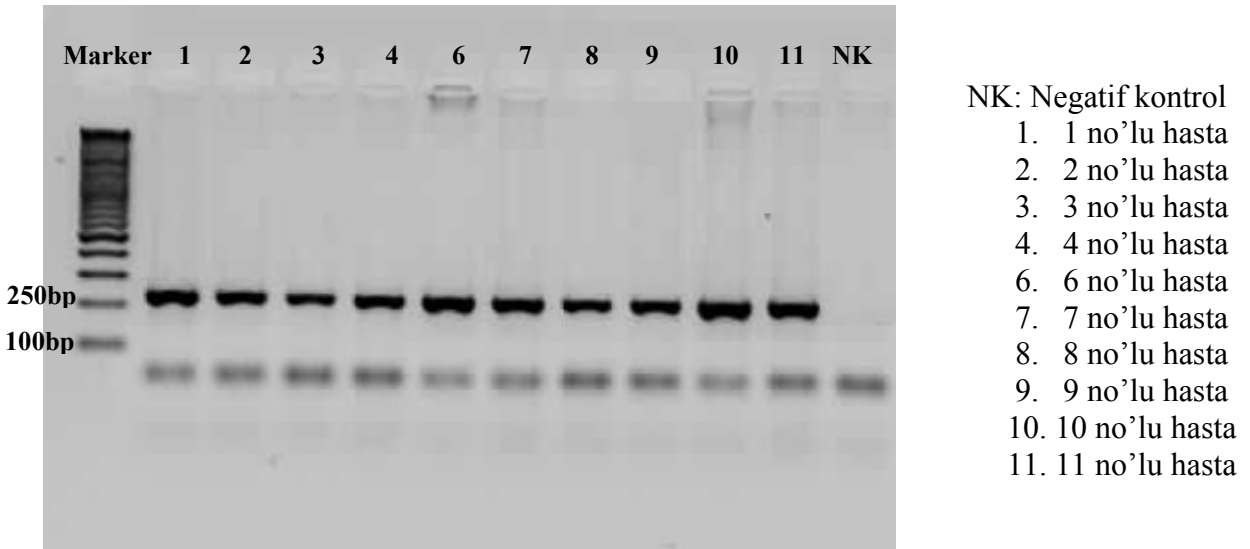
ALK geninin 381 bp'lik 21-22.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 21'de, 21-22. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 21: 21-22. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.3 ALK geninin 23. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

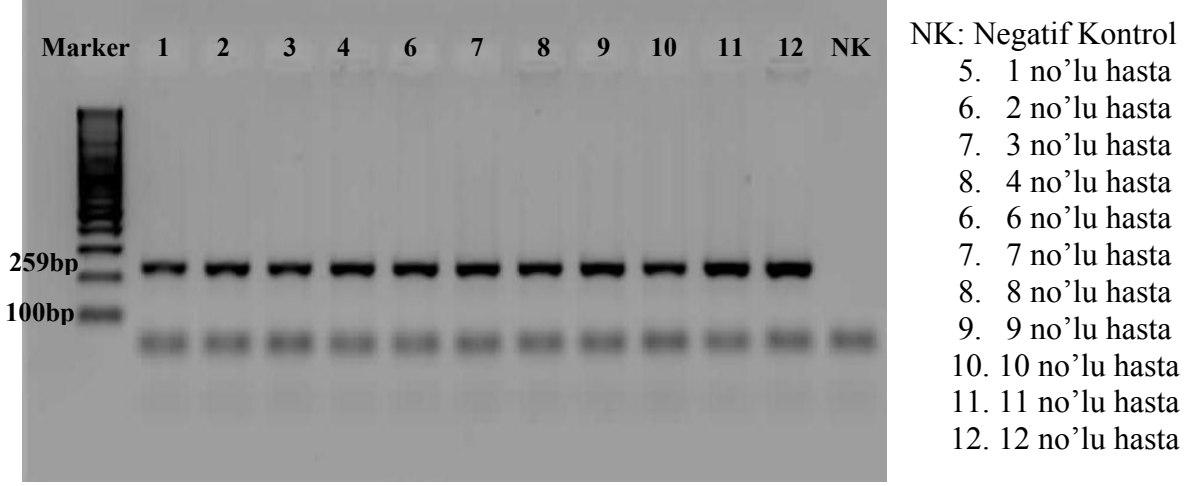
ALK geninin 250 bp'lik 23.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 22'de, 23. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 22: 23. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.4 ALK geninin 24. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

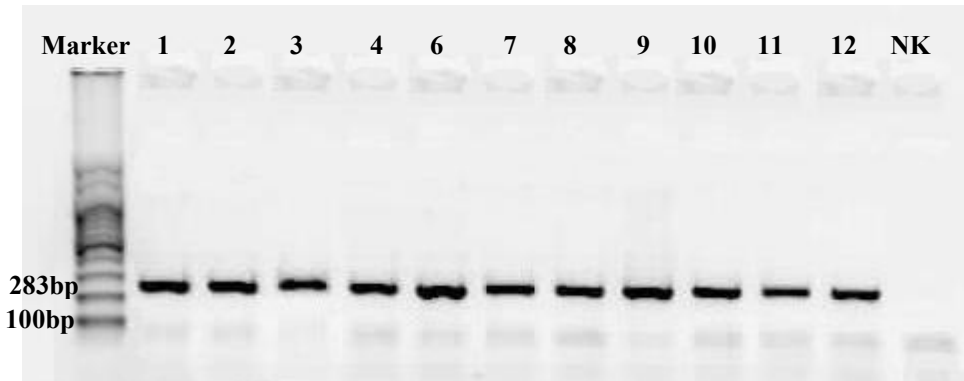
ALK geninin 259 bp'lik 24.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 23'de, 24. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 23: 24. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.5 ALK geninin 25. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

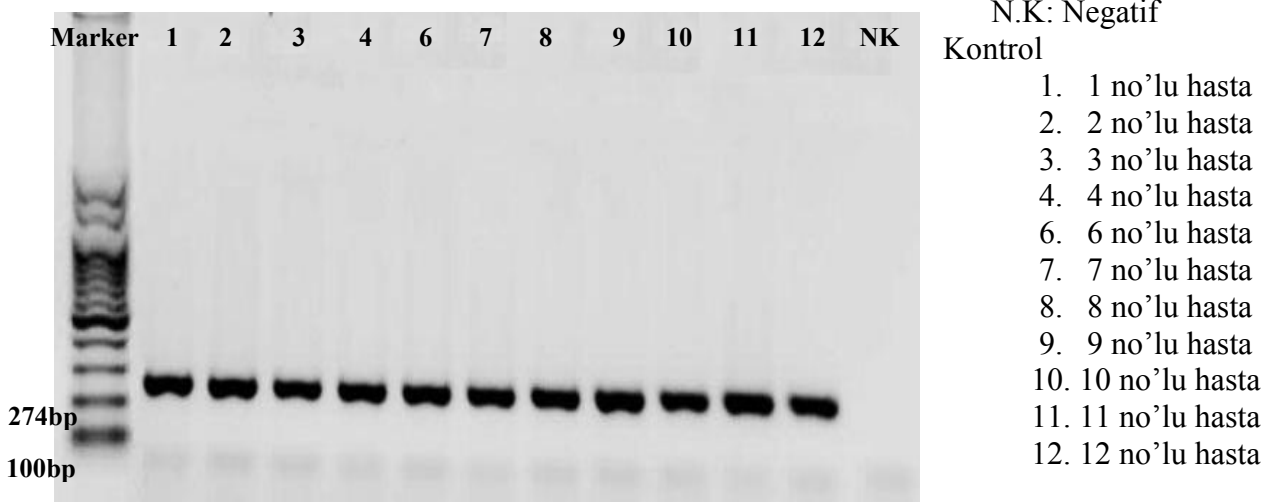
ALK geninin 283 bp'lik 25.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 24'de, 25. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 24: 25. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.6 ALK geninin 26. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

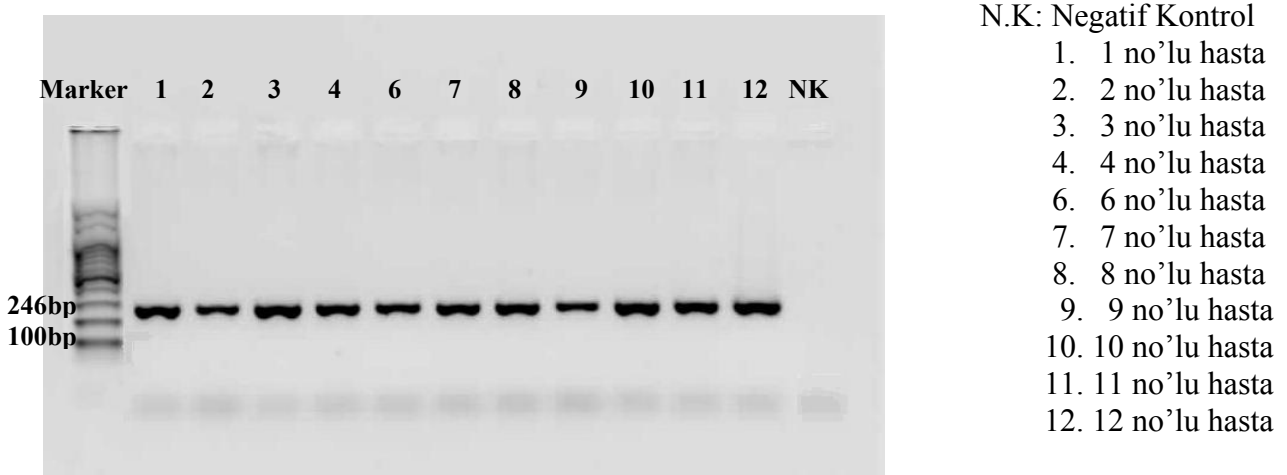
ALK geninin 274 bp'lik 26.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 25'de, 26. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 25: 26. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.7 ALK geninin 27. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

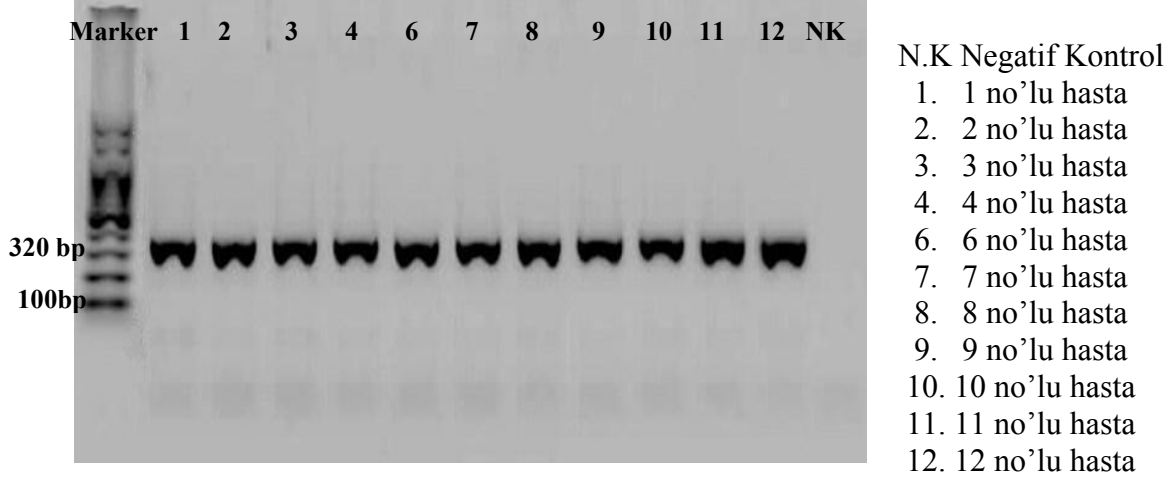
ALK geninin 246 bp'lik 27.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 26'da, 27. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 26: 27. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.3.8 ALK geninin 28. Ekzonunun Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saptanması

ALK geninin 320 bp'lik 28.ekzonu PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Şekil 27'de, 28. ekzonun hastalara ait PCR ürünlerinin % 2'lik (w/v) agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.



Şekil 27: 28. ekzon PCR amplifikasyonlarının elektroforez jel görüntüsü

4.4 Olguların ve Kontrollerin DNA Dizi Analizi Verileri

Ekzonların ileri primerler ile DNA dizi analizi değerlendirme sonuçlarında olgu grubuna ait 20.ekzonda 36 farklı nükleotit değişimi saptanmıştır.

İkinci aşamada; sonuçlara göre mutasyon veya SNP saptanan bireylerin tekrar amplifikasyonları yapılarak hem ileri hemde geri primerler ile dizi analizi yapıldı. Bununla birlikte ikinci aşamada kontrol grubu içinde ileri ve geri primerler ile dizi analizi yapıldı.

Sonuç olarak olgu grubunda edinsel mutasyon saptanmamıştır. 192 alleden oluşan kontrol grubunda da tek nükleotit polimorfizmi (SNP) ya da insersiyon/delesyon (INDEL) polimorfizmi gözlenmemiştir.

5.TARTIŞMA:

Nöroblastom çeşitli klinik ve biyolojik özellikler gösteren, çok sayıda bilinmeyen olan bir tümördür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon yada agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır [9-12].

Nöroblastom üzerinde, uzun yıllardır prognostik bir faktör belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Genetik parametreler kromozom düzeyindeki değişikliklerden oluşmaktadır. Bunlarda ploidy kaymaları ya da sayısal anomalilerdir. Sporadik NBL olgularının etiopatogenezinde rol oynadığı bilinen tek gen *MYCN*'dir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise *ALK* geni üzerinde odaklanmıştır. *ALK* geni ile nöroblastom arasındaki ilişkiyi ilk olarak; nöroblastom pedigrilerinde tüm genomun sekanslanmasını kullanarak 2. kromozomun p23-24 bandlarında önemli bir linkaj sinyalinin Mossé ve arkadaşları tanımlamıştır. Yapılan çalışmalarda *ALK*, nöroblastom için bir prognostik faktör olarak önerilmiştir. Nöroblastik tümörler sıklıkla sporadik olarak meydana gelmektedir. Ancak ailesel olgularda, *PHOX2B*'nin germline mutasyonlarıyla ilişkili olarak nöral krest'in konjenital malformasyonlarıyla ilişkili olarak meydana gelen olguların bir alt grubunda gözlenir [45].

Literatürde yapılan çalışmalar nöroblastomun ailesel olguları üzerinde yoğunlaşmış olup *ALK* geninin tirozin kinaz bölgesinde mutasyonlar tanımlanmıştır. Ailesel nöroblastom gözlenen 20 ailede yapılan çalışmada, sekizinde *ALK* geninin kinaz bölgesinde germline sessiz mutasyonlar saptanmıştır [40]. Başka çalışmada, ailesel nöroblastom gözlenen altı ailenin ikisinde mutasyonlar belirlenmiştir. Ailelerden birinde anneden kalıtıldığı saptanan iki olguda heterozigot mutasyon (R1275Q), diğer bir ailede ise farklı tipte bir heterozigot mutasyon (R1192P) saptanmıştır [45].

ALK geninde, sporadik nöroblastom olgularında yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak % 8 oranında mutasyon veya amplifikasyon saptanmıştır [46]. Bu çalışmalarda *ALK* geninin kopya sayısındaki değişimler de vurgulanmıştır. Sporadik 491 olguda kopya sayısı değişimlerini saptamak için SNP - temelli mikroarray çalışılmasında, olguların % 22.8'inde kısmi trizomi, % 3.3'ünde ise yüksek düzeyde *ALK* amplifikasyonu saptanmıştır. Sporadik olgularda saptanan *ALK* kopya sayısı değişimlerinin agresif klinik fenotiple ilişkili olduğu saptanmıştır [40].

79 sporadik nöroblastom olgusunda yaptığımız çalışmada, sporadik olgularda *ALK* gen mutasyonu olmadığı net olarak gösterilmiştir. Literatürde yer alan ailesel nöroblastom olgularında saptanan mutasyonların yanı sıra, yaptığımız çalışmada sporadik nöroblastom olgularını kapsadığından, literatürde ailesel nöroblastom olguları üzerinde yapılmış olan çalışmalardan farklılık göstermektedir. Literatürde sadece sporadik olguları kapsayan yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde bulunan bir eksikliği tamamlamış olacaktır. Aynı zamanda, hücrelerde mutant *ALK* ekspresyonunun, AKT, STAT3 ve ERK sinyal yollarının fosforilasyonunun artmasıyla aktive edilebileceği belirtilmiştir [43]. Ancak bu sinyal yollarından AKT hücre sağ kalımını ve apoptozu düzenleyen bir sinyal iletimi şeklinde işlev görmektedir.

6.SONUC ve ÖNERİLER:

Yaptığımız çalışma, Türkiye genelinde 35 merkezde yürütülen protokol çerçevesinde saptanan sporadik nöroblastom olgularını içermektedir. Bu olgularda *ALK* geninde mutasyon saptanmaması literatürde önerilen nöroblastomun sağaltım modeli için son derecede önemlidir.

Literatürde belirtildiği üzere nöroblastomun ailesel formları tüm olguların sadece %1'ini içermektedir [46]. Bu nedenle yapılan çalışmalarda henüz etkili bir tedavi yöntemi bulunmayan nöroblastom olguları için, *ALK* gen ürününün kinaz bölgesini baskılayan hedef ilaçların önerilmesi nöroblastomun sıklıkla meydana geldiği sporadik olgular için uygun bir önermenin olamayacağı düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak, literatürde ailesel nöroblastom olguları üzerinden *ALK* gen mutasyonları gösterilmiş olup, sporadik olgular üzerinden *ALK* gen mutasyonu ile ilgili yaptığımız çalışma dışında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Nöroblastom olgularının sıklıkla sporadik olarak meydana geldiği göz önüne alınırsa, yapılan çalışmalarda önerilen sağaltım yolu hastalığın tedavisi açısından büyük bir ilerleme kaydedeceği kanısında değiliz.

Yapmış olduğumuz çalışma Türkiye popülasyonunda sporadik olarak saptanmış nöroblastom olgularında *ALK* gen mutasyonunun olmadığını göstermiştir. Çalışmamızın ileriki aşamalarında, nöroblastomun sporadik olgularında *ALK* geninin ifade düzeyi ve *ALK* genindeki kopya sayısındaki değişimlerin araştırılması hedeflenmiştir. Buradan elde edeceğimizi veriler ışığında literatürde eksik olan ve nöroblastomun sıklıkla meydana geldiği sporadik olgular için önemli bir veri sunacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Evans, A., Neuroblastoma: Historical Perspective 1864 -1998, in : Brodeur G.M, Sawada T., Tsuchida Y., Voute P.A. Neuroblastoma, 1. Edition, Amsterdam, Elsevier, 2000, p: 1-8.
2. Olshan, A., Epidemiology, In: Nai-Kong V. Cheung, Susan L. Cohn, Neuroblastoma, 1. ed., Heidelberg, Springer, 2005, p: 1-5.
3. Powell JE, E.J., Mann JR, Parker L, Frappaz D, Michaelis J, Kerbl R, Mutz ID, Stiller CA *Neuroblastoma in Europe: differences in the pattern of disease in the UK. SENSE. Study group for the Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe.* Lancet 1998. **352**: p. 682-687.
4. 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 Paediatr Hematol Oncol 2007. **29**(14).
5. Eser, S., *Childhood Cancer Incidence in Izmir, Turkey.* J Paediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(6).
6. Kutluk, T., *First national pediatric cancer registry in Turkey: a Turkish pediatric oncology group study (abstract).* . Ped Blood & Cancer 2004. **43**: p. 452.
7. Kutluk, T., Yesilipek, A., *On behalf of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) and Turkish Pediatric Hematology Society (TPHD). Pediatric Tumor Registry for 2002-2005 in Turkey.* J Pediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(1): p. 12-13.
8. Maris, J.M., et al., *Neuroblastoma.* Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2106-20.
9. Mora, J., et al., *Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience.* Oncologist, 2001. **6**(3): p. 263-8.
10. Matthay, K.K., *Neuroblastoma: biology and therapy.* Oncology (Williston Park), 1997. **11**(12): p. 1857-66; discussion 1869-72, 1875.
11. Brodeur, G.M. and R.L. Saylor, 3rd, *Neuroblastoma, retinoblastoma, and brain tumors in children.* Curr Opin Oncol, 1991. **3**(3): p. 485-96.
12. Brodeur, G.M. and C.T. Fong, *Molecular biology and genetics of human neuroblastoma.* Cancer Genet Cytogenet, 1989. **41**(2): p. 153-74.
13. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report.* J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 298-303.
14. Maris, J.M., *The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification.* Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(1): p. 7-13.
15. Weiss, W.A., et al., *Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice.* EMBO J, 1997. **16**(11): p. 2985-95.
16. Brodeur, G.M. and A. Nakagawara, *Molecular basis of clinical heterogeneity in neuroblastoma.* Am J Pediatr Hematol Oncol, 1992. **14**(2): p. 111-6.
17. Brodeur, G.M., et al., *Biology and genetics of human neuroblastomas.* J Pediatr Hematol Oncol, 1997. **19**(2): p. 93-101.
18. Ambros IM, Z.A., Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF, *Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma.* N Engl J Med, 1996. **334**: p. 1505-1511.
19. Shuqing L, Y.T., Alexandre C, Qiwei Y, Peter Z, Helen R.S, Susan E.C, and Susan L.C., *Cross-Talk between Schwann Cells and Neuroblasts Influences the Biology of Neuroblastoma Xenografts.* . American Journal of Pathology, 2005. **166**: p. 891-899.
20. Park, J.R.E., A. Caron, H., *Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment.* Pediatr Clin North Am, 2008. **55**(1): p. 97-120.

21. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment*. Prog Clin Biol Res, 1994. **385**: p. 363-9.
22. Brodeur, G.M., et al., *Neuroblastoma. Effect of genetic factors on prognosis and treatment*. Cancer, 1992. **70**(6 Suppl): p. 1685-94.
23. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. Science, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
24. Brodeur, G.M., et al., *Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas*. Cancer, 1986. **58**(2 Suppl): p. 541-5.
25. Lukens, J.N., *Neuroblastoma in the neonate*. Semin Perinatol, 1999. **23**(4): p. 263-73.
26. Christiansen, H., et al., *Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma: a metaphase and interphase cytogenetic study*. Genes Chromosomes Cancer, 1992. **5**(2): p. 141-9.
27. Breen, C.J., et al., *Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **120**(1): p. 44-9.
28. Guo, C., et al., *Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas*. Med Pediatr Oncol, 2000. **35**(6): p. 544-6.
29. Plantaz, D., 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**(5): p. 680-6.
30. Spitz, R., et al., *Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 52-8.
31. Attiyeh, E.F., et al., *Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma*. N Engl J Med, 2005. **353**(21): p. 2243-53.
32. Iwahara T, F.J., Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T, *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Oncogene, 1997. **14**(4): p. 439-449.
33. Miller, R.T., *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)*. The Focus, Immunohistochemistry.
34. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ALK.html>.
35. http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id=427&id_type=hgnc&search=427. 2009.
36. Morris, S., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma* Science, 1994. **263**(5151): p. 1281 - 1284.
37. Lamant, L., Dastugue, N., Pulford, K., Delsol, G., Mariamé, B., *A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation*. Blood, 1999.
38. Touriol C, G.C., Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, Mason DY, Delsol G., *Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like)*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3204-3207.
39. Soda, M.C., Y. L.; Enomoto, M.; Takada, S.; Yamashita, Y.; Ishikawa, S.; Fujiwara, S.; Watanabe, H.; Kurashina, K.; Hatanaka, H.; Bando, M.; Ohno, S.; Ishikawa, Y.; Aburatani, H.; Niki, T.; Sohara, Y.; Sugiyama, Y.; Mano, H, *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature 2007. **448**: p. 561-566.
40. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 930-5.

41. Andre Oberthuer, J.T., Frank Westermann, Barbara Hero, Matthias Fischer, *Molecular Characterization and Classification of Neuroblastoma*. Future Oncology, 2009. **5**: p. 625-639.
42. Mario Capasso, C.H., Shahab Asgharzadeh, *Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma*. Nature Genetics, 2009. **41**(6): p. 718-723.
43. Chen, Y., et al., *Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 971-4.
44. George, R.E., et al., *Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 975-8.
45. Janoueix-Lerosey, I., et al., *Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 967-70.
46. Nadine Van Roy, K.D.P., Jasmien Hoebeeck, Tom Van Maerken, Filip Pattyn, and J.V. Pieter Mestdagh, Jo Vandesompele and Frank Speleman, *The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy*. Genome Medicine, 2009. **1**: p. 74-85.