

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NÖROBLASTOM MYCN
AMPLİFİKASYONUNDA C-MYB PROTEİN
KÜMESİ İLE
CDT1/GEMİNİN, P53, SİKLİN A/CDK2,
P21 VE P27' NİN ROLÜ**

NEVİM AYGÜN

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOM MYCN
AMPLİFİKASYONUNDA C-MYB PROTEİN
KÜMESİ İLE
CDT1/GEMİNİN, P53, SİKLİN A/CDK2,
P21 VE P27' NİN ROLÜ**

NEVİM AYGÜN

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. OĞUZ ALTUNGÖZ

*Bu araştırma
DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
tarafından 2005.KB. SAĞ.077 sayı ile desteklenmiştir.*

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı doktora programında öğrenci olan Araştırma Görevlisi Nevim Aygün'ün ‘‘NÖROBLASTOM MYCN AMPLİFİKASYONUNDA C-MYB PROTEİN KÜMESİ İLE CDT1/GEMİNİN, P53, SİKLİN A/CDK2, P21 VE P27' NİN ROLÜ’’ başlıklı doktora tezi başarılı/başarısız olarak değerlendirilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. Oğuz Altungöz
Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

Prof. Dr. Meral Sakızlı
Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

Prof. Dr. Nur Olgun
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Onkoloji ABD

Prof. Dr. Neşe Atabey
Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

Doç. Dr. Yusuf Baran
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yedek Jüri Üyeleri:

1-) Yard. Doç. Dr. Çiğdem Eresen Yazıcı
Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

2-) Yard. Doç. Dr. Çağlar Karakaya
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

İÇİNDEKİLER

Sayfa 1-2: Tablo Listesi

Sayfa 3-6: Şekil Listesi

Sayfa 7: Kısaltmalar

Sayfa8: Türkçe Özet

Sayfa9: İngilizce Özet

Sayfa10-13: 1- Giriş ve Amaç

Sayfa 14-18: 2- Genel Bilgiler

Sayfa 19-43: 3- Gereç ve Yöntemler

Sayfa 19-23: 3.1- DeneY Sistemlerinin Kurulduğu Hücre Hatları

Sayfa 23: 3.2- Bioinformatik Analiz

Sayfa 24-26: 3.3- Hücre Hatlarında MYCN Geni Amplifikasyonunun FISH ile Gösterilmesi

Sayfa 26-27: 3.4- Akış Sitometrisi

Sayfa 27-33: 3.5- Gerçek Zamanlı PCR Deneyleri ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Sayfa 34-40: 3.6-RNA Susturulması

Sayfa 40-43: 3.7-Kromatin İmmuno Presipitasyon (ChIP) Deneyleri

Sayfa 44-101:4- Bulgular

Sayfa 44-45: 4.1-*Drosophila* ACE3 dizisini içeren bölge ile MYCN geni 5'-upstream dizisini içeren bölge arasında özdeşlik bulundu.

Sayfa 46-47: 4.2-MYCN geni 5' bölgesi ile ACE3 arasında özdeşliğin görüldüğü bölgeyide içine alan 5000 bazlık alana bağlanan transkripsiyon faktörleri belirlendi.

Sayfa 47-49: 4.3-Tüm 5 hücre hattında MYCN geni kopya sayıları FISH yöntemi ile belirlendi.

Sayfa 50-52: 4.4- Akım sitometrisi ile hücre siklus analizleri gerçekleştirildi

Sayfa 52-75: 4.5-RNA susturulması öncesinde gerçek zamanlı PCR deneyleri ile gen

ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları belirlendi

Sayfa 76-101: 4.6-RNA Susturulması Sonrasında Gerçek Zamanlı PCR deneyleri ile yeniden

ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları araştırıldı

Sayfa 102-109: 5-Tartışma

Sayfa 110-111: 6-Sonuç ve Öneriler

Sayfa 112-114: 7-Kaynaklar

Sayfa 115: Etik kurul kararı

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1:** Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan Taqman prob ve primer dizileri.
- Tablo 2:** Beş hücre hattında akım sitometrisi sonuçlarının analizleri gerçekleştirildi. Hücre döngüsünde evrelerin yüzdeleri belirlendi.
- Tablo 3:** Beş hücre hattında susturma öncesinde A260_{nm} de absorpsiyonları, cDNA konsantrasyonları ve saflık değerleri ölçüldü.
- Tablo 4:** RNA susturulması öncesinde beş hücre hattında 15 gen ve kontrol HPRT1'e ait Cp, E ve R değerleri. Ayrıca MYCN/P53 genomik DNA kopya sayılarının oranı da verildi.
- Tablo 5:** RNA susturulması öncesinde Kelly hücre hattında DNA örneğinde iki kat seri dilüsyonların sonuçları.
- Tablo 6:** RNA susturulması öncesinde SIMA hücre hattına ait DNA örneğinde iki kat seri dilüsyonların sonuçları.
- Tablo 7:** RNA susturması sonrasında tüm hücre hatlarında cDNA konsantrasyon ölçümleri.
- Tablo 8:** RNA susturması sonrasında tüm hücre hatlarında DNA konsantrasyon ölçümleri.
- Tablo 9:** Kelly hücre hattında yedi genin susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo` da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDDT1 geninde shRNA dizisinin vektörü çalışmadı.
- Tablo 10:** Kelly`de RNA susturması önce ve sonrası mRNA ekspresyonunun ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri.
- Tablo 11:** RNA susturulması sonrasında Kelly hücre hattında DNA örneğinin iki kat seri dilüsyon sonuçları.
- Tablo12:** SIMA hücre hattında beş genin susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo` da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDDT1ve geminin geninde shRNA dizisinin vektörü çalışmadı.
- Tablo 13:** SIMA`da RNA susturması önce ve sonrası mRNA ekspresyonunun ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri.
- Tablo 14:** RNA susturulması sonrasında SIMA hücre hattında DNA örneğinin iki kat seri dilüsyon sonuçları.
- Tablo 15:** IMR32 hücre hattında dört genin susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo` da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDDT1ve geminin geninde shRNA dizisinin vektörü çalışmadı.
- Tablo 16:** IMR32`de RNA susturması önce ve sonrası mRNA ekspresyonunun ve MYCN/p53

DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri. X: p21 shRNA dizisi çalışmadı.

Tablo 17: MHH-NB-11 hücre hattında dört gen susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo` da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, nc satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDT1 ve geminin geninde shRNA dizisinin vektörü çalışmadı.

Tablo 18: MHH-NB-11`de RNA susturması önce ve sonrası mRNA ekspresyonunun ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri. X: p21 shRNA dizisi çalışmadı.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Kelly hücre hattına ait bir fotoğraf.
- Şekil 2:** IMR32 hücre hattına ait bir fotoğraf.
- Şekil 3:** MHH-NB-11 hücre hattına ait bir fotoğraf.
- Şekil 4:** SIMA hücre hattına ait bir fotoğraf.
- Şekil 5:** SH-SY5Y hücre hattına ait bir fotoğraf.
- Şekil 6:** Drosophila chorion genlerinin amplifikasyonunun kontrol edilmesinde myb kümesinin bağlandığı ACE3 bölgesi.
- Şekil 7:** MYCN geninin 5' upstream bölgesinde yer alan (-2525-1647) baz dizisi.
- Şekil 8:** ACE3 ve MYCN 5'-upstream arasındaki özdeş bölge (-2525-1647).
- Şekil 9:** MYCN geninin ACE3 ile özdeşlik bulunan (-2525-1647) bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri.
- Şekil 10:** MYCN promoter bölgesinde c-myb ve E2F1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri.
- Şekil 11:** SH-SY5Y hücre hattına ait FISH görüntüsü.
- Şekil 12:** Kelly hücre hattına ait FISH görüntüsü.
- Şekil 13:** MHH-NB-11 hücre hattına ait FISH görüntüsü.
- Şekil 14:** SIMA hücre hattına ait FISH görüntüsü.
- Şekil 15:** IMR32 hücre hattına ait FISH görüntüsü.
- Şekil 16:** Kelly ve IMR32 hücre hatlarına ait hücre siklus grafikleri.
- Şekil 17:** SH-SY5Y, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarına ait hücre siklus grafikleri.
- Şekil 18:** SIMA hücre hattından shRNA öncesinde ve E2F1 shRNA sonrasında elde edilen cDNA görüntüsü. Marker yanındaki birinci ve ikinci kuyularda cDNA yayıntı (smear) şeklinde görülmektedir. Marker: Fermentas SM1203, 25 bp.
- Şekil 19:** RNA susturulmasından önce ve sonra hücre hatlarından elde edilen DNA' lara ait görüntü. Marker: Fermentas SMO653, 100 bp+500 bp.
- Şekil 20:** RNA susturulmasından önce SIMA ve Kelly` de gerçek zamanlı PCR ürünlerinin % 2` lik agaroz jelde yürütülmesinden sonra elde edilen jel görüntüsü. 1. kuyu: Marker, 2-7 kuyu: SIMA`ya ait p21, Geminin, HPRT1, HL3MBTL, b-myb, c-myb. 8-13 kuyu: Kelly` ye ait MYCN, HCDT1, p21, E2F1, Geminin, HPRT1. Marker: Fermentas SM 1203, 25 bp.
- Şekil 21:** RNA susturulmasından önce beş hücre hatlarına ait genomik DNA örneklerinin gerçek zamanlı PCR ürünlerinin % 2` lik agaroz jelde yürütülmesinden sonra elde edilen görüntü. 1. kuyu: Marker, 2-11 kuyu: Kelly, SIMA, IMR32, MHH-NB-11 ve SH-SY5Y` ye ait MYCN ve p53. Marker: Fermentas SM 1203, 25 bp.
- Şekil 22 :** Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y hücre hatlarında p27, E2F1, hCdt1, b-myb, Geminin, MYCN, c-myb, p21, HL3MBTL ile referans HPRT1 genlerine ait eks-

presyon katları.

Şekil 23: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN ekspresyonu.

Y ekseninde hücre hatlarının MYCN genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 24: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de c-myb ile E2F1 ekspresyonu.

Y ekseninde hücre hatlarının c-myb ve E2F1`e ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 25: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de HL3MBTL ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının HL3MBTL genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 26: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de HL3MBTL ile c-myb ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının HL3MBTL ve c-myb`ye ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 27: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de hCdt1 ile b-myb ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının hCdt1 ve b-myb genlerine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 28 : Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de Geminin ekspresyonu.

Y ekseninde hücre hatlarının Geminin genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 29: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de p21 ile p27 ekspresyonu.

Y ekseninde hücre hatlarının p21 ve p27 genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 30: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN ile p27 ekspresyonu.

Y ekseninde hücre hatlarının MYCN ve p27 genlerine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 31: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN ile E2F1 ekspresyonu.

Y ekseninde hücre hatlarının MYCN ve E2F1 genlerine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 32: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları görülmektedir.

Şekil 33: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları ile MYCN ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları ve MYCN ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 34: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları ile E2F1 ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları ve E2F1 ekspresyon katları görülmektedir.

Şekil 35: Kelly hücre hattında shRNA öncesi çalışılmış genomik DNA örneklerinde iki kat dilüsyon serilerinde MYCN ve p53 genlerinin PCR amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterilmiştir.

- Şekil 36:** RNA susturulması öncesinde Kelly hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle Cp değerleri arasında çizilen grafik.
- Şekil 37:** SIMA hücre hattında shRNA öncesi çalışılmış genomik DNA örneklerinde iki kat dilüsyon serilerinde MYCN ve p53 genlerinin PCR amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterildi.
- Şekil 38:** RNA susturulması öncesinde SIMA hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle Cp değerleri arasında çizilen grafik.
- Şekil 39:** IMR32 RNA susturulması öncesinde MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri.
- Şekil 40:** MHH-NB-11 RNA susturulması öncesinde MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri.
- Şekil 41:** SH-SY5Y hücre hattında MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri.
- Şekil 42:** Kelly hücre hattında c-myb susturulduktan sonra MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneylerinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterildi.
- Şekil 43:** C-myb RNA susturulması sonrasında Kelly hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle MYCN ve p53 Cp değerleri arasında çizilen grafik.
- Şekil 44:** Kelly`de c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.
- Şekil 45:** SIMA hücre hattında c-myb susturulduktan sonra MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneylerinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterildi.
- Şekil 46:** C-myb RNA susturulması sonrasında SIMA hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle MYCN ve p53 Cp değerleri arasında çizilen grafik.
- Şekil 47:** SIMA`da c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.
- Şekil 48:** IMR32 c-myb RNA susturulması sonrasında MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden yinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri.
- Şekil 49:** IMR32`de c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.

Şekil 50: MHH-NB-11 c-myb RNA susturulması sonrasında MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri.

Şekil 51: MHH-NB-11`de c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.

Şekil 52: Kelly, SIMA, MHH-NB-11, IMR32`de c-myb shRNA öncesinde ve sonrasında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları ile MYCN ekspresyonları.

Şekil 53: MYCN amplifiye hücre hatlarında E2F1 shRNA uygulamasından sonra MYCN ekspresyonlarındaki değişimler.

Şekil 54: MYCN amplifiye hücre hatlarında b-myb shRNA uygulamasından sonra HCDT1 ekspresyonlarındaki değişimler.

KISALTMALAR

ACE3: Amplification control element 3

ChIP: Kromatin immüno presipitasyon

Cp: Cycle point

Dmin: Double minute

DUP: Double-parked

E: PCR efficiency

FISH: Floresan in situ Hibridizasyon

Hsr: Homojen boyanan bölgeler, homo-staining region

L(3)MBT: Lethal (3) malignant brain tumor

Myeloblastosis viral onkogen: v-myb

Pre-RC: Pre-replikatif kompleks

R: Ekspresyon katı

TB: Terrific Broth

NÖROBLASTOM MYCN AMPLİFİKASYONUNDA C-MYB PROTEİN KÜMESİ İLE CDT1/GEMİNİN, P53, SİKLİN A/CDK2, P21 VE P27' NİN ROLÜ

NEVİM AYGÜN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, İnciraltı/İzmir, Türkiye.

ÖZET

Nöroblastom, periferik sinir sisteminden köken alan çocukluk çağı solid tümörleri arasında en sık görülen tümördür. MYCN geni amplifikasyonu nöroblastom tümörünün prognozunu kötü yönde etkiler. MYCN amplifikasyonunun nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Gen amplifikasyonları insan kanserlerinde tümöral bir davranışın sonucu olarak oluşabilmektedir. Diğer organizmalarda da gen kopya sayısı artışı meydana gelebilir. *Drosophila melanogaster*'in, normal gelişimsel sürecinde chorion genlerinin kopya sayısı, amplifikasyon kontrol elemanı (ACE3) dizisine bağlanan myb protein kümesi ile düzenlenir. Chorion amplifikasyonunu indükleyen kümede myb ve E2F1, baskılayan kümede myb, E2F2 ve l(3)mbt proteinleri yer alır. *Drosophila*'da genel genomik amplifikasyonda ise DUP ve geminin rol alır. Bu tez çalışmasında da myb benzeri bir protein kümesinin MYCN geni amplifikasyonunu kontrol edebileceği öngörülerek MYCN amplifiye Nöroblastom hücre hatlarında, *Drosophila*'da tanımlanmış proteinlerin insan ortologları c-myb, b-myb, a-myb, E2F1, HL3MBTL ve hCdt1/gemininin rolleri araştırıldı. Kelly, IMR32, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarında; c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, geminin, b-myb ve kontrol olarak EGFP'ye özgül shRNA'ları içeren plazmid vektörlerle RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturma öncesinde ve sonrasında MYCN, c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, geminin, b-myb ve referans HPRT1'in mRNA düzeyleri ve MYCN ile referans p53 genleri DNA kopya sayısı oranları gerçek zamanlı PCR deneyleriyle belirlendi. Sonuçta; Kelly ve SIMA'da c-myb geni mRNA'sı baskılandığında; MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranında sırasıyla %21,09 ve %104,02 düzeyinde bir artma, IMR32 ve MHH-NB-11'de ise sırasıyla %54,11 ve %78,25 düzeyinde bir azalma görüldü. Ayrıca MYCN mRNA ekspresyon düzeyi MHH-NB-11 (%66,81), SIMA (%44,44) ve IMR32'de (%37,43) azalırken Kelly'de (%27,14) arttı. Bu durumda, c-myb MYCN geni kopya sayısını Kelly ve SIMA'da azaltma yönünde, IMR32 ve MHH-NB-11'de artırma yönünde etkilemiştir. Sonuç olarak; c-myb ile MYCN amplifikasyonunun ilişkili olduğu görülmektedir. Nöroblastom tedavisinde c-myb bir ilaç hedefi olarak seçilebilir.

Anahtar Kelimeler: MYCN amplifikasyonu, Nöroblastom, C-myb ekspresyonu

THE ROLES OF C-MYB PROTEIN COMPLEX AND CDT1/GEMININ, P53, CYCLINA/CDK2, P21, P27 FOR THE MYCN AMPLIFICATION IN NEUROBLASTOMA

NEVİM AYGÜN

Dokuz Eylül University, Medicine Faculty, Department of Medical Biology and Genetics, Inciralti/Izmir, Turkey.

ABSTRACT

Neuroblastoma is the most common tumor in pediatric solid tumors which derive from the peripheral nervous system. MYCN gene amplification give rise to the poor prognosis in neuroblastoma tumors. The mechanism of which the MYCN amplification is formed has been clearly unknown yet. Gene amplifications may form due to tumoral behaviour in human cancers. Increased gene copy numbers occur in also other organisms. Chorion gene copy numbers are regulated by the myb protein complex that bind to ACE3 during the normal developmental stage of *Drosophila melanogaster*. Myb and E2F1 take part in complex that induce chorion amplification and the myb, E2F2 and l(3)mbt proteins participate in the prevention complex. On the other hand, DUP and geminin play role in general genomic amplification of *Drosophila*. In this thesis study, myb-like protein complex was hypothesized that may control the MYCN gene amplification. And, the roles of human orthologs that are termed as c-myb, b-myb, a-myb, E2F1, HL3MBTL and hCdt1/geminin related to defined proteins in *Drosophila* were investigated in neuroblastoma cell lines. RNA interference was performed by using plasmid vectors that include shRNA sequences specific to c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, geminin, b-myb and control EGFP in Kelly, IMR32, MHH-NB-11 and SIMA cell lines. The mRNA levels of MYCN, c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, geminin, b-myb, reference HPRT1 genes and ratios of the DNA copy numbers of MYCN and reference p53 genes were determined by real time PCR assays during pre- and post-RNA interference. In conclusion, when the c-myb expression was interferenced through shRNA vector system in cell lines, the ratios of MYCN/p53 DNA copy number increased in Kelly (21.09%) and SIMA (104.02%) cell lines and decreased in IMR32 (54.11%) and MHH-NB-11 (78.25%) cell lines. In addition, MYCN gene expression decreased in MHH-NB-11 (66.81%), SIMA (44.44%) and IMR32 (37.43%) cell lines and increased in Kelly (27.14%) cell line. According to present findings, while c-myb acts to decrease the MYCN copy number in Kelly and SIMA, it acts to increase in the IMR32 and MHH-NB-11 cell lines. Consequently, it was seen that c-myb and MYCN amplification are related with each other. C-myb may select as a drug target in neuroblastoma therapy.

Key Words: MYCN amplification, Neuroblastoma, C-myb expression

1- GİRİŞ ve AMAÇ

Nöroblastom tümörü görülen hastaların önemli bir bölümünde MYCN geni kopya sayısının arttığı gözlenmektedir (1-3). Gen amplifikasyonu; memeli, bitki, hayvan ve mayaların üyesi olduğu ökaryotik organizmaların yanı sıra pek çok tek hücrelilerin üyesi bulunduğu prokaryotların genomunda da oluşabilmektedir (4,5). Gen amplifikasyonları kanserlerde tümöral bir davranışın sonucu olarak meydana gelebilmektedir (6). Ayrıca gen amplifikasyonlarının meyve sineği *Drosophila melanogaster*'in, normal gelişimsel süreci sırasında dış kabuğunun yapılandırılabilmesi için X ve 3. kromozomlarının chorion genlerinde de tetiklenebildiği rapor edilmiştir (7). Bu rapor edilen çalışmada, *Drosophila*' da chorion genlerinde amplifikasyon kontrol elemanı (Amplification control element 3, ACE3) adı verilen bir dizi tanımlanmıştır. Daha sonra ACE3'ün, myb protein kümesi ile etkileşerek gen kopya sayısı artışını düzenlediği gösterilmiştir (8). Bu çalışmada chorion amplifikasyonunu pozitif yönde indükleyen küme içinde myb ve E2F1'in bulunduğu, negatif yönde tetikleyen kümede yine myb ve ayrıca E2F2 ile lethal (3) malignant brain tumor (l(3)mbt) proteininin yer aldığı belirlenmiştir.

Diğer taraftan, *Drosophila*'da double-parked (DUP) adı verilen replikasyondan sorumlu bir proteinin genomik re-replikasyonu sağladığı gösterildi (9). Bu çalışmada DUP'un karboksi terminal kısmının, *Drosophila* chorion geninin amplifikasyonunda rol oynayan hiperaktif bir protein olduğu belirlendi. DUP, insanlarda bulunan yine replikasyonda görevli hCdt1'in ortoloğudur (10). Bu replikatif protein insanlar ve diğer organizmalarda korunmuştur (11). İnsanlardaki hCdt1 proteini, hücrelerin G1 evresinde oluşan pre-replikatif kompleksin (pre-RC) içinde yer almaktadır (10). Bu çalışmada, bir kez replikasyon orijininin DNA sentezi başladıktan sonra hücrede ipliğin tekrar sentez edilmesini önlemek üzere siklinA/cdk2 ile hCdt1'in N ucunun fosforillendiği belirtilmektedir. Ayrıca fosforile olduktan sonra hCdt1 yıkımının gerçekleştiği vurgulanmaktadır. Diğer taraftan insanlarda hCdt1 kontrolünün Geminin

ile de sağlandığı gösterilmiştir (12). Aynı çalışmada Gemininin, hCdt1'i baskılayan bir inhibitör olduğu belirtilmiştir. *Drosophila*'da da insan Geminin proteininin ortoloğu tanımlanmıştır (13). Bu çalışmada *Drosophila* Geminin proteininin DUP ile kompleks oluşturarak DNA replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Çeşitli kanser hücre hatlarında, hCdt1/Geminin protein ve mRNA ekspresyon oranları ile tümörün tipi, klinik davranışı ya da moleküler patolojisi ilişkilendirilmiştir (14). Ayrıca memeli kanser hücrelerinde, yüksek hCdt1-Geminin oranının re-replikasyona neden olduğu rapor edildi (15). Aynı çalışmada hCdt1'in memelilerde onkogen olarak fonksiyon gösterebileceği önerilmiştir. Diğer taraftan p53 ekspresyonu negatif olan H1299 akciğer kanser hücre hattında aşırı hCdt1 ekspresyonunun genomik re-replikasyona yol açtığı gösterildi (16). Bu çalışmada ayrıca p53 ekspresyonu pozitif olan A549 akciğer kanseri hücre hattında ise hCdt1 ekspresyonunun bazal düzeyde kaldığı ve genomik re-replikasyona yol açmadığı rapor edildi. Yine aynı çalışma da, p53 proteininin cdk2 inhibitörü p21 ve p27'yi indükleyerek hücre döngüsünün ilerlemesini G1'de durdurduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte *Drosophila* DUP proteininde olduğu gibi insan hCdt1 proteininin, herhangi bir genomik segmentin amplifikasyonunda rol oynadığı bilinmemektedir. *Drosophila* gen amplifikasyonunda rol oynayan myb ve ilgili protein kümesi elemanlarına benzer fonksiyonel ortologların insanlarda da bir genin veya lokusun amplifikasyonuna yol açabileceği düşünülebilir.

Bu yüzden ön çalışmada, ilk önce *Drosophila*'da amplifikasyonu kontrol eden ACE3 dizisini kapsayan bölgenin DNA dizisi ile insan tümörlerinde amplifiye olan pek çok onkogenin önünde yer alan 5'-upstream dizileri, LFASTAn programı kullanılarak karşılaştırıldı. Özellikle nöroblastom'da amplifiye olan MYCN onkogeni upstream dizisi ile *Drosophila* ACE3 dizisini içeren bölge arasında önemli oranda özdeşlik bulundu. Bu bölgede çakışan DNA dizilerinin özdeşlik oranı tam olarak % 43,545 idi. Bu sonuç, dizilerin evrimsel bir süreçte korunmuş

olabileceğini ve *Drosophila*'da chorion geni amplifikasyonunu regüle eden myb kümesine benzer bir protein grubunun insanlarda da MYCN amplifikasyonunu regüle edebileceğini düşündürmektedir.

Şimdiye kadar MYCN amplifikasyonunun nasıl oluştuğu konusunda ilgili olarak bazı hipotezler öne sürülmüştür (17). Bir hipoteze göre, MYCN'nin art arda replike olarak yeni bir kromozomal bölgeye yerleşim gösterebileceği dile getirilmiştir. Bir başka öngöründe ise; 2p24 lokusunda eşit olmayan kardeş kromatid değişimiyle, MYCN'in tandem gen artışının meydana gelebileceği ve daha sonraki gen amplifikasyonuna neden olabileceği öne sürülmüştür (1). Bununla birlikte amplifikasyon mekanizması bilinmemektedir.

Bu tezin amacı; MYCN geni amplifikasyonunun hangi düzenekle oluştuğunu ortaya koyabilmektir. *Drosophila* chorion geni amplifikasyonunu regüle eden myb kümesine fonksiyonel olarak benzer bir protein grubu MCYN geni amplifikasyonunda da etkin bir rol oynayabilir. Bu nedenle tezin ön çalışmasında TFSEARCH yazılımı ile ACE3 ile benzerliğin tanımlandığı MYCN geni 5'-upstream bölgesine hangi transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı araştırıldı. Buraya bağlanan transkripsiyon faktörleri arasında myeloblastosis viral onkogen (v-myb) homologu c-myb ve E2F1'in bulunması dikkati çekmektedir. Çünkü *Drosophila* chorion amplifikasyonunda pozitif yönde indüksiyonu sağlayan kümede myb ve E2F1 birlikte bulunmaktadır (8). İnsanda; a-myb, b-myb ve c-myb ile *Drosophila melanogaster*'in myb proteini aynı myeloblastosis viral onkogen ailesinin üyesidirler (18). E2F1 ise *Drosophila*, insan ve diğer pek çok organizmada bulunan ökaryotik bir transkripsiyon faktörüdür (19). Sonuç olarak; tezde yapılan bu bioinformatik ön çalışmalarının ve literatür bilgisinin ışığında, MYCN amplifiye olan nöroblastom hücre hatlarında genin amplifikasyonunun tetiklenip regüle edilmesinde, c-myb, b-myb, a-myb, E2F1, HL3MBTL, hCdt1/Geminin, SiklinA/cdk2, p53, p21 ve p27 moleküllerinin fonksiyonel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, MYCN

amplifikasyonunu tetikleyip regüle eden bir c-myb protein kümesi varsa bu kümede yer alan c-myb ve E2F1` in özgül olarak bağlandığı DNA bölgesinin nükleotid baz dizisinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

2- GENEL BİLGİLER

Gen amplifikasyonları; özellikle solid tümörlerde MYCN, MDM2, EGFR, ERBB2, C-MYC ve TYMS gibi pek çok protoonkogene görülebilen genomik değişikliklerdir (1). Amplifiye olan lokuslarda ilgili protoonkogenlerin kopya sayıları artış göstermektedir. Solid tümörler arasında yer alan nöroblastomaya tüm çocukluk çağı kanserleri arasında % 8-10 oranında rastlandığı bildirilmiştir (20). Bu çalışmada ayrıca nöroblastomanın santral sinir sistemi dışında tutulum gösteren çocukluk çağı solid tümörleri arasında en sık görülen tümör olduğu rapor edilmiştir.

Nöroblastoma tümörlerinin önemli bir bölümünde MYCN onkogeni amplifikasyonu gözlenebilmektedir (1-3). MYCN geni 2p24 kromozomal lokusunda yerleşim göstermektedir. MYCN amplifiye olduğu zaman ya bulunduğu lokusa ya da 17. kromozom gibi farklı kromozomlar içine yerleşerek homojen boyanan bölgeleri (homogenously staining region, hsr) oluşturabilirler. Ayrıca amplifiye olan MYCN geni kopyalarından oluşan küçük kromozom parçalarında (double minutes, dmins) herhangi bir kromozoma yerleşmeden nükleus içinde serbestçe bulunabilmektedir (1). MYCN genini amplifiye olmaya iten neden ya da nedenler konusu ile ilgili pek çok araştırma yapıldı (17). Ancak hala MYCN amplifikasyonunun neden ve nasıl oluştuğu konusunda hipotezler kanıtlanmış değildir. Bu hipotezlerden birine göre, replikasyon sırasında MYCN ard arda kopyalanma işlemi tekrarlanmakta ve yeni bir kromozomal bölgeye yerleşmektedir. Bir başka öngörüye göre; 2p24 lokusunda eşit olmayan kardeş kromatid değişiminin MYCN'in tandem gen artışına yol açtığı ve daha sonraki gen amplifikasyonunu tetiklediği öne sürülmüştür (1).

Farklı organizmalarda görülen gen amplifikasyonlarının mekanizmaları üzerine de çok sayıda çalışma bulunmaktadır (4,5). Özellikle *Drosophila melanogaster*'in gelişimi sırasında, X ve 3. kromozomlarının chorion genlerinde, çeşitli amfibi oositlerinin rRNA genlerinde ve avian

miyogenezi sırasında aktin genlerinde amplifikasyonun nasıl olduğu ile ilgili olarak araştırmalar gerçekleştirilmiştir (4). Bu araştırmalar arasında *Drosophila* chorion geni amplifikasyonu ile ilgili mekanizma *in vivo* ve *in vitro* deneylerle önemli oranda açıklığa kavuşturulmuştur (7,8). Bu alışmalar incelendiğinde, chorion genlerinin amplifikasyonunda, ACE3 adı verilen dizilerin bir kontrol merkezi gibi çalıştığının rapor edilmesi dikkati çekmektedir. Chorion genleri önünde yeralan DNA bölgesinde ACE3 dizisi amplifikasyon kontrolünü myb adı verilen bir transkripsiyon faktörünün devreye girmesiyle sağlamaktadır (8). Aynı çalışmada myb`in ACE3 amplifikasyon kontrol merkezine özgül olarak bağlandıktan sonra ilgili başka proteinlerle birlikte küme halinde chorion geninin kopya sayısı artışını düzenlediği belirlendi. Bu küme içinde yeralan tüm proteinler henüz tanımlanamamıştır. Ancak chorion amplifikasyonunu pozitif yönde indükleyen küme içinde myb ve E2F1`in bulunduğu, negatif yönde etkileyen kümede yine myb ve ayrıca E2F2 ile l(3)mbt`nin yer aldığı belirtilmektedir (8). Görüldüğü gibi myb kümenin her iki etkisi içinde ACE3`te bağlı bulunmaktadır.

Drosophila` da chorion geni amplifikasyonu dışında genel genomik amplifikasyonda görülebilmektedir. DUP adı verilen replikasyondan sorumlu bir protein genomik re-replikasyona yol açtığı rapor edilmiştir (9). DUP`un kontrolüde siklinE/CDK2 ile sağlanır. SiklinE/CDK2 hücrelerin re-replikasyonunu önleyebilmek için DUP`un amino ucunu fosforiller. Fosforilasyonla S fazında DUP degrade edilir (9). Aynı çalışmada, ayrıca DUP`un karboksi terminal kısmının genomik re-replikasyondan ziyade *Drosophila* chorion geninin amplifikasyonunda rol oynayan hiperaktif bir protein olduğu da gösterildi. İnsanlarda da replikasyonda görevli olan hCdt1, DUP`un ortoloğudur (10). Ayrıca bu replikatif protein diğer bazı organizmalarda da korunmuştur (9,11).

HCdt1 proteini, hücrelerin G1 evresinde oluşan pre-replikatif kompleksin (pre-RC) bir üyesidir. Bir kez replikasyon orijinininden DNA sentezi başlarsa hücrede ipliğin tekrar sentez

edilmesini önlemek üzere DUP'ta olduğu gibi siklinA/cdk2 kompleksi ile hCdt1'in N ucu fosforillenir. Fosforilasyondan sonra hCdt1 degrade olur (10,12). Bununla birlikte, hCdt1'in *Drosophila* DUP' ta olduğu gibi, C ucunun herhangi bir genomik segmentin amplifikasyonunda etkili olduğu konusunda bir yayın bulunmamaktadır. İnsanlarda hCdt1 kontrolü Geminin ile de sağlanmaktadır. Geminin, hCdt1'i baskılayan bir inhibitördür (13). *Drosophila* da da insan Geminin proteininin ortoloğu bulunmaktadır. *Drosophila* geminin proteini de DUP ile kompleks oluşturarak DNA replikasyonunu baskılar (9). Ayrıca memeli hücrelerinde ve *Drosophila*' da geminin eksikliğinin normale göre büyük bir çekirdeğin oluşmasına yol açtığı ve re-replikasyona sebep olduğu rapor edilmiştir (12).

Çeşitli kanser hücre hatlarında, hCdt1/Geminin ekspresyon oranları incelenmiştir. Bu konuda tümörjenik hücre hatları (Saos, MDAMB231, HeLa, MCF7, Lncap, HT1080 ve U2OS) ile bir primer hücre hattı (human foreskin fibroblasts, HFF) hCdt1 ve Geminin protein ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Tümörjenik hücre hatlarında, primer HFF hücre hatlarına göre hCdt1/Geminin ekspresyon oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. hCdt1/Geminin protein ve mRNA ekspresyon oranlarının tümörün tipi, agresif seyri ya da moleküler patolojisiyle ilgili olabileceği öngörülmüştür (14). Bir diğer çalışmada; memeli kanser hücrelerinde, yüksek hCdt1/Geminin oranının re-replikasyona neden olduğu rapor edilmiştir (15). Ayrıca hCdt1'in fare aday ortoloğu olan Ris-2 proteininin onkojenik potansiyel göstermesinden dolayı, hCdt1` in de memelilerde onkogen olarak fonksiyon gösterebileceği düşünülmektedir (16).

Bununla birlikte p53 ekspresyonu negatif olan H1299 akciğer kanseri hücre hattında hCdt1'in aşırı ekspresyonunun genomik re-replikasyonu tetiklediğide gösterilmiştir (16). Aynı çalışmada p53 ekspresyonu pozitif olan A549 akciğer kanseri hücre hattında ise hCdt1 ekspresyonunun bazal düzeyde kalıp genomik re-replikasyonun gerçekleşmediği rapor edilmiştir.

Diğer taraftan, MDM2 ekspresyonunun artması ile p53'ün baskılandığı ve hCdt1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu aşamada re-replikasyonun yeniden meydana geldiği belirlenmiştir (16). Yine aynı çalışmada, A549 kanser hücre hattında p53 eksprese olduğunda cdk2 inhibitörlerinden biri olan p21'in indüklendiği ve hücre döngüsünün G1'de durduğu gösterilmiştir. Aynı hücre hattında bir diğer cdk2 inhibitörü p27'nin de aşırı düzeyde eksprese olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte insanlarda veya hücre hatlarında hCdt1'in (*Drosophila* DUP' ta olduğu gibi) herhangi bir genin amplifikasyonunu tetiklediği ile ilgili deneysel bir veri rapor edilmemiştir.

Bu tezin çıkış kaynağını oluşturan ön çalışmasında, ilk önce *Drosophila`* da amplifikasyonu kontrol eden ACE3 dizisini kapsayan bölgenin DNA dizisi ile insan tümörlerinde amplifiye olan pek çok onkogenin upstream dizileri, LFASTAn programı ile karşılaştırıldı. Özellikle nöroblastom` da amplifiye olan MYCN onkogeni upstream dizisi ile *Drosophila* ACE3 dizisini içeren bölge arasında önemli oranda özdeşlik vardı. Bu bölgede özdeşlik oranı tam olarak % 43,545 idi ve baştan sona dizilerde bir çakışmanın olması dikkat çekiyordu. Acaba bu diziler evrimsel süreçte korunmuş olabilir mi?

Diğer bir ön çalışmada, TFSEARCH programı kullanılarak bu benzerliğin tanımlandığı bölgelere hangi transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı incelendi. Buraya bağlanan transkripsiyon faktörleri arasında v-myb myeloblastosis viral onkogen homologu c-myb' nin bulunması dikkati bu proteine yoğunlaştırmayı sağladı. İnsanda; myeloblastosis viral onkogen ailesinin diğer üyeleri b-myb ve a-myb ile birlikte bulunan c-myb; *Drosophila melanogaster`* in myb proteini ile ilişkilidir (18). İnsanda da *Drosophila* myb protein kümesinde yer alan bazı proteinlerin ortologları bulunmaktadır. Ancak insanlarda böyle bir myb protein kümesi tanımlanmış değildir. Özellikle c-myb`nin insanlarda hematopoetik sistemin immatür hücre

proliferasyonunda görev aldığı bilinmektedir (21). Matür hücrelerin terminal farklılaşması sırasında ekspresyonu azalmaktadır.

Ayrıca çok sayıda nöroblastom hücre hatlarında ve primer tümörlerde eksprese oldukları belirlenmiştir (21). Bir diğer myb ile ilişkili protein olan b-myb`nin ise proliferen olan pek çok hücre tipinde ekspresyon düzeyi artmaktadır. Nöroblastoma tümör dokusu örneklerinde, b-myb ekspresyonunun MYCN amplifikasyonundan bağımsız ancak tamamlayıcı olarak ölüm riski artmış ileri evre ile birliktelik gösteren kötü prognostik bir faktör olduğu rapor edilmiştir (21). B-myb protein düzeyi uzun yarı-ömürlerinden dolayı, hücrenin tüm evrelerinde sabit kalabilmektedir. Ancak erken G1 evresinde Siklin D1`in direkt bağlanmasıyla, b-myb transaktivasyonu engellenmektedir. Hücre döngüsünün G1/S geçişinde Siklin D1 mRNA düzeyi düşerken b-myb serbest kalmaktadır (22). B-myb`nin SiklinA/cdk2 kompleksi ile fosforillenmesiyle hedef genlerin S fazındaki transkripsiyonu gerçekleşmektedir (23-25). Ayrıca megakaryoblastlarda b-myb aşırı eksprese olduğunda hem S- fazına geçen hücre sayısı hem de endoreplikasyona uğrayan hücrelerin arttığı rapor edilmiştir (26). Megakaryoblastların terminal farklılaşmaları sırasında poliploidizasyona uğramaları olağan bir süreçtir. Bu hücrelerde b-myb baskılandığında ise S-fazına ilerleyen hücrelerde bir düşüş ile endoreplike olan DNA sentezinde bir azalma gözlenmektedir (26). Bu durumda mitozaya giren hücre sayısındaki artışla birlikte megakaryoblastlarda kromozomal instabilitede görülmektedir.

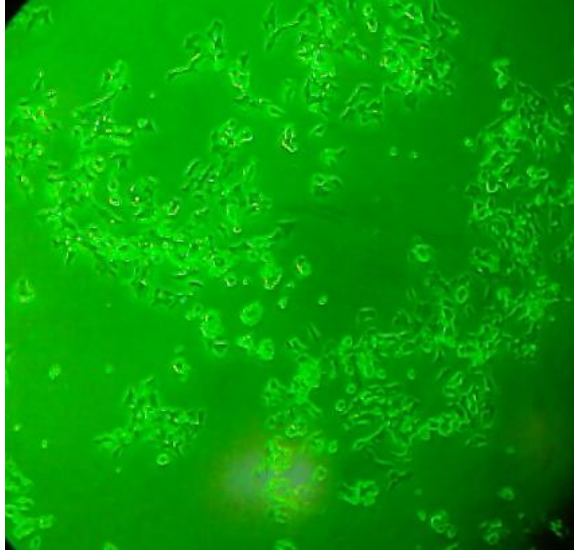
Sonuç olarak bu tez kapsamında, MYCN amplifiye olan ve olmayan nöroblastom hücre hatlarında negatif ve pozitif yönde amplifikasyonun düzenlenmesinde, c-myb protein kümesinin, ilgili diğer myb üyeleri b-myb, a-myb ile hCdt1/Geminin, SiklinA/cdk2, p53, p21 ve p27 moleküllerinin fonksiyonel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca eğer MYCN amplifikasyonunu kontrol eden böyle bir c-myb protein kümesi varsa bu kümenin özgül olarak bağlandığı DNA dizisinin (*Drosophila*-ACE3 gibi) belirlenmesi hedeflendi.

3- GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1- Deney Sistemlerinin Kurulduğu Hücre Hatları:

Tüm beş hücre hattı Almanya DSMZ kültür koleksiyonundan satın alındı. Tezde deneyler, Kelly (ACC 355), IMR32 (ACC 165), SIMA (ACC 164), MHH-NB-11 (ACC 157) ve SH-SY5Y (ACC 209) nöroblastoma hücre hatlarında gerçekleştirildi. SH-SY5Y hücre hattında MYCN geni kopya sayısı iki ya da üç kopyadır. Diğer dört hücre hattında ise MYCN geni kopya sayıları 10` dan yüksektir.

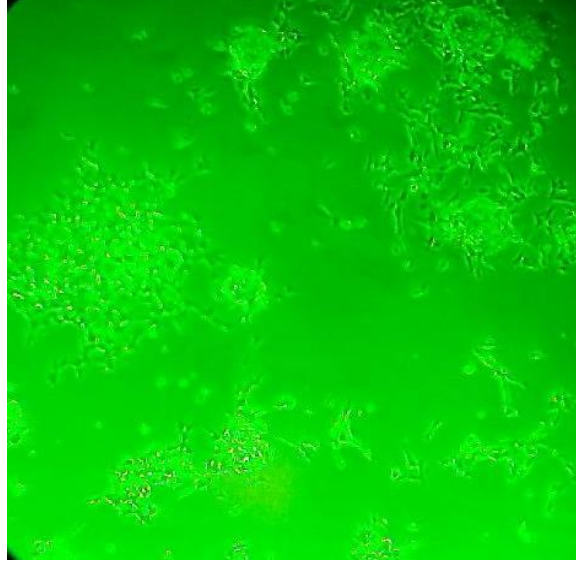
Kelly hücre hattında DSMZ` ye ait sitogenetik verilerde der(17) hsr ye neden olan 100 kat N-myc amplifikasyonunun görüldüğü rapor edilmektedir. Kelly, hücre kültürlerinde yapışarak tek tabaka ya da çok katmanlı halde üreyebilmektedir. Hücre sayılarını 30 ila 40 saatte iki katına çıkarabilme kapasitelerine sahiptir. DSMZ tarafından bildirilen sitogenetik karyotiplendirmede % 20 poliploidi ile near-diploidinin ve 2p24 hsr`nin bulunduğu görülmektedir. Hsr bölgeleri geç evre nöroblastom için tipiktir.



Şekil 1: Kelly hücre hattına ait bir fotoğraf.

Kelly karyotip: 46-47<2n>X, -7, -8, +16, +22, +2mar, del(1)(p34), t(2;7) (p12; q11), add(4)(p15.3), add(5)(p15), add(9) (q34), add(10)(q24), add(11)(q24), add(14) (q32), ins(17;2) (q21;p24 hsr)x2; del(1p34)

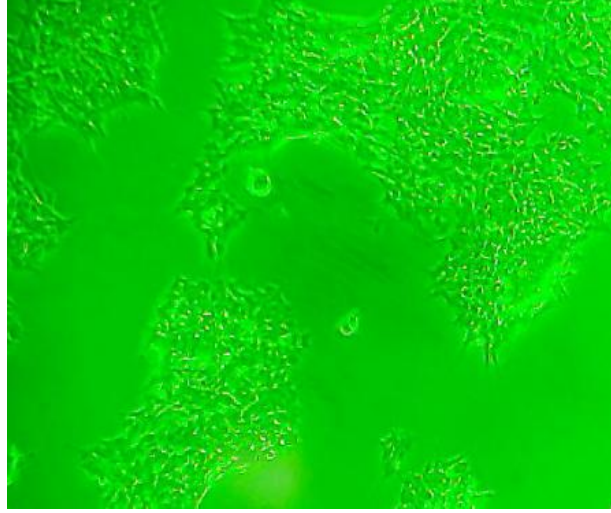
IMR32`de hücreler, tek tabaka halinde büyüyen fibroblast-benzeri yapışarak ürerler. DSMZ`nin karyotiplendirmesine göre hiperdiploid karyotip rapor edildi. Karyotipte N-myc geninin amplifiye olduğu hsr bölgesi ve dengesiz t(1;17) görülmektedir.



Şekil 2: IMR32 hücre hattına ait bir fotoğraf.

IMR32 karyotip: 49(44-51)<2n>XY, +1, +6, +12, der(1)t(1qter->1p34::hsr::17q22->qter) x2, add(16)(q24); del(3)(p14), add(7)(q35), del(9)(q34), add(19)(q13)

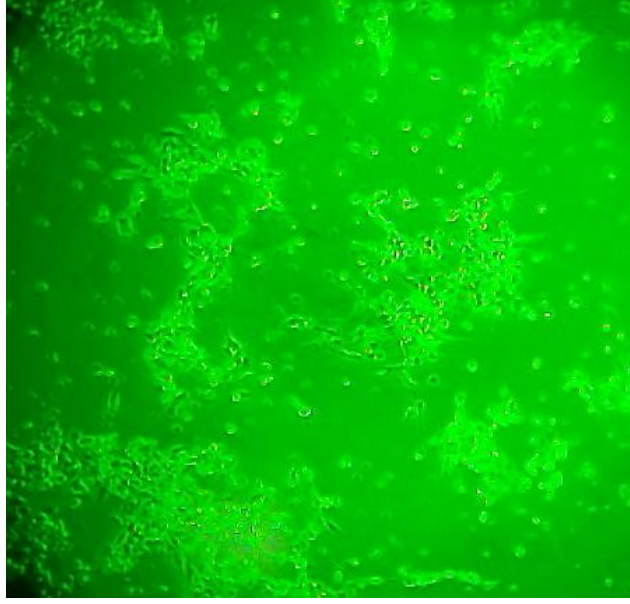
MHH-NB-11 hücre hattı metastaz yaptığı adrenal bölgeden kurulmuştur. DSMZ tarafından hücrelerin 20 kat N-myc amplifikasyonu taşıdığı rapor edilmektedir. MHH-NB-11`de, IMR32`de olduğu gibi tek tabaka olarak büyüyen fibroblast benzeri yapışan hücrelerden oluşmaktadır.



Şekil 3: MHH-NB-11 hücre hattına ait bir fotoğraf.

MHH-NB-11 karyotip: Bimodal hyper-, diploid/ tetra-ploid; 54(48-54)<2n>XY,+1, +1, +2, +6, +7, +8, +13, +20, der(1)t(1;?)(p32;?)x2,der(13) t(13;?2HSR)(q33;?2p23)

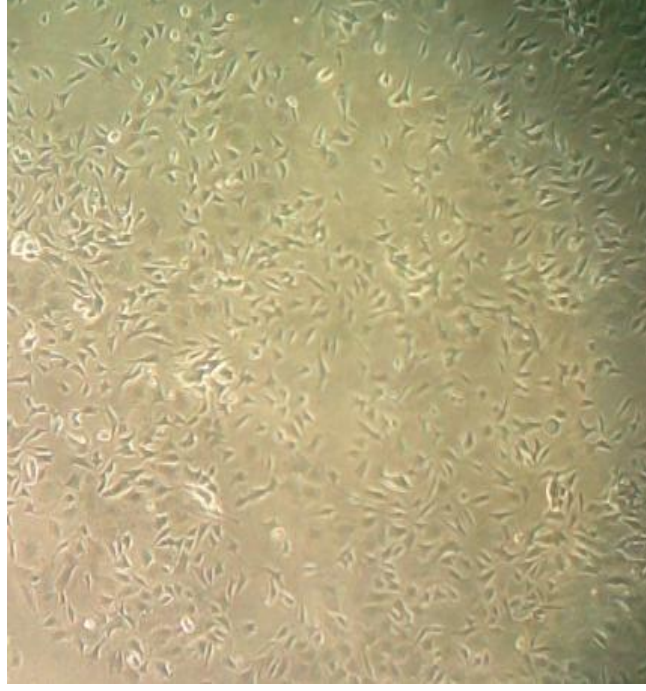
SIMA hücre hattı, nöroblastom evre-3 olarak derecelendirilmiş, tedavi sonrası cerrahi olarak çıkarılmış adrenal tümör dokusundaki hücrelerden kurulmuştur. Hücre şekilleri bipolar olarak görülmektedir. Tek tabaka halinde ya da odaklar oluşturarak büyüyen yapışan hücrelerden oluşmaktadır. DSMZ tarafından, % 3,5 poliploidi ile hipotetraploid karyotip bildirilmektedir. Ayrıca her bir hücrede t(1;17) ile birlikte 50-100 kopya NMYC amplifikasyonu ve dmin`lerin bulunduğu rapor edildi.



Şekil 4: SIMA hücre hattına ait bir fotoğraf.

SIMA karyotip: 88/89<4n>XXY/XXYY, -Y, -11, -17, -17, der(1qh++)t(1;17) (p34-35;q12)
x2,t(6;9)(p21;q33)x2, ?inv(12)(q21q24)x2, der(22)t(17;22)(q21;p12)x2

SH-SY5Y hücre hattı, metastatik nöroblastomlu bir hastanın kemik iliği biyopsisinden kurulmuş olan SK-N-SH nöroepitelyom hücre hattının klonal alt tipidir. Epitele benzer hücreler tek tabaka olarak ya da yüksek yoğunlukta kültürlendiğinde hücre kümeleri halinde büyürler. DSMZ tarafından % 1.8 poliploidi ile diploide yakın karyotip rapor edildi.



Şekil 5: SH-SY5Y hücre hattına ait bir fotoğraf.

SH-SY5Y karyotip: 46/47(42-48)<2n>X/XX, +7, ins(1)(q32q11q43), add(9)(q34),
der(22)t(?17;22)(q22;q13)

3.2- Bioinformatik Analiz:

-*Drosophila* da amplifikasyonu kontrol eden ACE3 dizisini kapsayan bölgenin DNA dizisi ile insan tümörlerinde amplifiye olan MYCN onkogeni ile birlikte pek çok diğer onkogenin 5'-upstream dizileri, LFASTAn (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/lfastan_in.pl) programı kullanılarak karşılaştırıldı. Diziler arasındaki özdeşlik oranları ve benzerliğin görüldüğü bölgelerin lokasyonları belirlendi.

- Ayrıca TFSEARCH programı (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) kullanılarak özdeşliğin tanımlandığı bölgelere hangi transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı belirlendi.

3.3- Hücre Hatlarında MYCN Geni Amplifikasyonunun FISH ile Gösterilmesi (27):

Tüm beş hücre hattı 25 cm² flaskta büyütüldükten sonra hücreler HBSS ile yıkayıp tripsin-EDTA (IMR32`de tripsin-EDTA kullanmadan direk kaldırılıyor, kat:Biochrom L2143, lot:089B) ile kaldırılarak 5 ml ortamları içinde kırmızı kapaklı polisitiren steril tüplere aktarıldı.

-Hücrelere 80 µl kolsemid eklendi. Dikkatlice tüpler karıştırıldı. Daha sonra 30 dk 37° C`lik su banyosunda bekletildi. Bu aşamadan sonra 10 dk 300 g` de santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve sulu faz atıldı.

-Dipte kalan hücre çökeleğine karıştırıcı üzerinde 8 ml 0.075 M hipotonik çözeltisi (Biochrom cat:L6413) ilave edildi. Sonra 37 °C su banyosunda 30 dakika bekletildi. Bekledikten sonra 10 dakika 300 g` de santrifügasyonla üstteki sıvı faz atıldı.

-Hücre çökeleğinin üzerine taze hazırlanmış 5 ml fiksatif (3:1; metanol:glasiyel asetik asit) karışımı eklendi. Karıştırıcı üzerinde homojenize edildikten sonra yine 10 dakika 300 g`de santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra 4-5 kere daha, dipte kalan çökelek beyaz bir görünüm alıncaya dek fiksatif ile yıkandı.

-Son fiksatif taze hazırlanarak ilave edildikten sonra dipte kalan çökelek iyice homojenize edildi. Ve ince uçlu cam damlatma pipeti ile temiz bir lam üzerine hücreler damlatıldı. Damlatmadan sonra lamlar 15 dakika oda sıcaklığında kurutulduktan sonra FISH deneyi uygulanmaya başlandı.

-FISH analizi için önce lamlar incelenerek floresan işaretli MYCN geni lokusuna özgül prob ile hibridizasyonun gerçekleşeceği alanlar tarandı. Lamın hücre çekirdeği yoğunluğu açısından (Hücre çekirdekleri seyrek olmamakla beraber sıkışık da olmamalıdır) en uygun alanı olduğuna karar verilen bölgesinin sınırları cam çizer alet ile sınırlandı.

-Lamlar daha sonra bir cam şale içinde hazırlanan ön yıkama solüsyonu içine daldırıldı. Bu solüsyon 2xSSC ve % 0,5 NP40`dan oluşmaktadır. Önce 5 ml 20xSSC stok çözeltiden alınarak

45 ml distillenmiş su ile karıştırıldı. Karışıma 250 µl NP40 eklendi. Bu şale 37 °C su banyosuna konuldu. Şalenin içindeki sıcaklık 37 °C` ye geldikten sonra lamalar içine yerleştirildi. Bu şale içine lamalar 30 dakika bekletildi.

-Daha sonra lamalar % 70, % 85 ve absölu olarak hazırlanmış etanol çözeltilerinde oda sıcaklığında sırasıyla ikişer dakika bekletildi.

-Bu aşamadan sonra lamaların üzerindeki nükleuslar içinde DNA ipliklerinin denatüre edilmesi işlemi gerçekleştirildi. Denatürasyon için şale içinde % 70 formamid/2xSSC solüsyon karışımı hazırlandı. Bunun için 35 ml formamid alınıp 5 ml 20xSSC ile karıştırıldıktan sonra 10 ml distile su eklendi. Çözeltinin pH` sı 25 µl HCl eklenerek 7-8`e ayarlandı. Denatürasyon çözeltilisinin şalesinin su banyosunda sıcaklığı 70 °C` ye getirildi.

-Sonra alkol serilerinden geçirilerek kuruması beklenen lamalar şale içine aktarılarak iki dakika nükleus içindeki DNA` nın denatürasyonu gerçekleştirildi.

-Lamlar -20 °C` de soğutulmuş alkol serilerinde (%70, %85 ve absölu etanol) ikişer dakika bekletildi.

-Daha sonra MYCN probu denatürasyonu gerçekleştirildi. Bunun için 2 ml`lik ependorf tüpünde MYCN probu (Qbiogen, kat: PONC0224, lot: 77280000) buz içine alındı. Proben içinde bulunduğu ependorf tüpünün ağzı parafinlenerek otoklav bandıyla sıkıca kapatıldı. Ependorf tüpü içindeki prob, 96 °C`lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek denatüre edildi.

-Su banyosundan çıkarıldıktan sonra prob 8-10 sn çevrildi. Temiz bir lamel üzerine 10 µl prob eklendi. Bu lamel, denatüre durumda bulunan hücrelerin üzerinde bulunduğu lamaların hibridizasyon alanı olarak işaretlenen bölgesine kapatıldı. Lamel kapatıldıktan sonra kenarları hava girmemesi için yapıştırıcı (fixo gum) ile kapatıldı.

-Bir beherin etrafı alüminyum folyoyla kapatılarak içerisine 20-30 ml distile su konuldu. Lamlar bir taşıyıcı vasıtasıyla içine yerleştirildi. Beher bir gece 37 °C`de CO₂` siz inkübatörde bekletildi.

-Ertesi gün hibridizasyon sonrası yıkamalar yapıldı. Bunun için önce 0,5xSSC ve % 0,1 SDS karışımı hazırlandı. Önce iki ml 20xSSC distile su ile 50 ml`ye tamamlandı. Sonra üzerine 100 µl % 10` luk SDS`den eklendi.

-Ayrıca ikinci yıkama solüsyonu da hazırlandı. Bir başka şale içinde 45 ml distile su ile 5 ml 10xPBS karıştırılarak 1xPBD solüsyonu hazırlandı. Üzerine 100 µl NP40 ve 200 µl Tween 20 eklendi. Karıştırıldıktan sonra lamaların yıkamaları gerçekleştirildi. Bu amaçla 0,5x SSC/% 0,1 SDS solüsyonu şalesi 37 °C`ye konuldu. Lamaların etrafındaki yapıştırıcı çıkarılıp 0,5x SSC/% 0,1 SDS şalesi içinde 1-2 dakika bekletildi.

-Sonra lamalar karanlık bir ortamda bekletilirken, şale 65 °C`ye konuldu. Şale içindeki sıcaklık 65 °C`ye geldikten sonra lamalar 5 dk inkübe edildi.

-Sonra oda sıcaklığında 1x PBD içinde de 5 dk bekletildi.

-En son % 70` lik etanolde 1 dk beklettikten sonra karanlıkta kurumaya bırakıldı.

-Hibridizasyon sonrasında preparatlar kurduktan sonra, lamalar üzerinde hücre çekirdekleri 10 µl DAPI Antifade ile boyandı. On dakika beklemeden sonra FISH analizi için lamalar incelendi.

-FISH analizi MACprobe programı ile floresan mikroskopobunda (Nikon E600 Mac 7600) gerçekleştirildi. Her hücre hattı için 500 çekirdek analiz edildi. Her bir çekirdekte 2 sinyal normal olarak kabul edildi. İki den büyük sayıda sinyaller MYCN geni kopya sayısı artışı göstermektedir. Kopya sayısı 10` dan büyük olduğunda yüksek kopya sayılı MYCN geni amplifikasyonu olarak değerlendirildi.

3.4- Akış Sitometrisi (28):

Beş hücre hattında RNA susturulması öncesinde hücre siklus analizleri Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Hematoloji Laboratuvarında Uzm. Halil Ateş tarafından gerçekleştirildi.

-% 80 oranında 25 cm² flaskları kaplayan hücreler HBSS ile yıkanıp tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Sonra kendi ortamı içinde soğutucu blokta Hematoloji Laboratuvarına götürüldü.

-Beckman Coulter kitinin 100 µl LPR reaktifi ile karıştırıldı. Üzerine 2 ml Propidiyum iodide eklenip yarım saat karanlıkta +4 °C`de inkübe edildi. Cihaza yüklenip her bir hücre hattında siklus analizleri gerçekleştirildi.

3.5- Gerçek Zamanlı PCR Deneyleri ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi (29):

-cDNA Elde Edilmesi: Hücre hatlarında genlerin mRNA düzeylerinin ölçülebilmesi için önce FastLane kiti (Qiagene kat:215011, lot:127131311) ile cDNA` lar elde edildi. Bunun için sıvı nitrojendeki hücre hatlarından birer tüpü çözüp 24 kuyulu steril kaplarda uygun ortamları içinde büyümeleri sağlandıktan sonra DNA, RNA ve proteinlerin bir arada bulunduğu FastLane lizatları elde edildi.

-Bunun için önce 24 kuyulu kaplardan ortam uzaklaştırılıp yüzeyde yapışmış hücrelerin üzerine 500 mikrolitre Fast Lane tamponu FCW eklenip 2 dakika oda sıcaklığında beklendi.

-Daha sonra tampon uzaklaştırılıp 200 µl bir diğer Fast Lane tamponu FCP eklendi. FCP hücrelerin parçalanması ve RNA` ların stabilize edilmesi için kullanıldı. Hücreler bu tampon içinde 7 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

-Bu FCP tamponu içinde bulunan hücre lizatı DNaz, RNaz bulunmayan tüplere alınarak buz içine konuldu. Sonra lizattan genomik DNA eliminasyonu gerçekleştirildi. Bunun için önce DNaz, RNaz içermeyen tüpe Fast Lane genomik DNA eliminasyon tamponundan 2 µl konuldu. Üzerine FCP tamponu içindeki lizattan 4 µl eklendi. Daha sonra tüpe 8 µl RNaz içermeyen steril su eklenerek solüsyon pipetajla yavaşça karıştırıldı.

-Hemen 42 °C su banyosunda tüp beş dakika bekletildi. Bu aşamada lizat içindeki genomik DNA elimine edilir. Su banyosundan tüp çıkarıldıktan sonra hemen buza yerleştirildi.

-Bu sırada lizatın içindeki RNA` nın cDNA` ya çevrilmesi için gerekli ters (reverse) transkripsiyon karışımının hazırlanmasına geçildi. Bu aşamada önce 4 µl ters transkripsiyon tamponu yeni bir DNaz, RNaz içermeyen tüpe eklendi. Sonra birer mikrolitre primer karışımı ile

ters transkriptaz enzimi tüpe eklendi. En son buzda bekleyen genomik DNA` sı elimine edilmiş lizat bütünüyle ters transkripsiyon karışımına eklendi. Pipetajla yavaşça karıştırıldıktan sonra tüp tekrar 42 °C su banyosunda 35 dakika bekletildi.

-Bu aşamadan sonra revers transkriptaz enziminin inaktif hale gelmesi için tüp 95 °C su banyosunda üç dakika bekletildi. Bundan sonra tüp içinde cDNA elde edilmiş oldu. Elde edilen cDNA küçük miktarlarda ayrılarak saklandı.

-cDNA Konsantrasyon Ölçümü:

-Daha sonraki gerçek zamanlı PCR deneylerinde eklenecek cDNA miktarının belirlenebilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarında (ARLAB) Carry WinUV spektrofotometre cihazında Carry 50 DNA/RNA Conc programında 260 nm absorbansta konsantrasyon ölçümü yapıldı.

-Ayrıca cDNA % 2 `lik agaroz jelde 1xTAE tamponu içinde yürütülerek Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji elektroforez laboratuvarında görüntü alındı.

-DNA Elde Edilmesi:

Hücre hatlarında MYCN geni kopya sayısının referans gen p53`e göre rölatif olarak ölçülebilmesi için DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Hücreler 75 cm² flasklarda büyütüldü. Bu flasklardan direk DNA izolasyonu fenol:kloroform:izoamilkol (Appllichem cat:A0889.500, lot:7W009045) kullanılarak gerçekleştirildi.

-Önce 75 cm² flasktan yapışmış hücreler steril kazıyıcı yardımıyla içindeki ortamla birlikte mavi kapaklı steril DNaz, RNaz içermeyen polipropilen tüpe alındı.

-Sonra 300 g`de 10 °C` de 10 dakika santrifügasyonla hücre çökeleği oluşturuldu. Üstte kalan sıvı atıldıktan sonra çökeleğin üzerine 6 ml 1xPBS eklendi. Yine 300 g`de 10 °C` de on dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldıktan sonra bir kez daha 1xPBS ile hücre çökeleği yıkandı.

-Sonrasında hücre çökeleği üzerine 6 ml DNA tamponu eklendi. DNA tamponu; bir kısım 0,5 M EDTA, pH:8.0, bir kısım 1M Tris-HCL, pH: 8.0 ve 3 kısım apirojen steril suyun birbiriyle karıştırılmasıyla hazırlandı. Yine 300 g`de 10 °C`de on dakika santrifüjle üstteki sıvı atıldı.

-Hücre çökeleği üzerine tekrar DNA tamponundan 3 ml eklendi ve karıştırıcı kullanılarak süspanse edildi.

-Süspanسیونun üzerine 80 mikrolitre 20 mg/ml konsantrasyonda proteinaz K eklendi. Sonra da 400 µl % 10 SDS eklenerek karıştırıcıda tekrar dikkatlice süspanse edildi. Tüp bir gece 45 °C`de su banyosunda bekletildi.

-Ertesi gün hücre süspanسیونuna eşit hacimde 3,6 ml fenol: kloroform: izoamilalkol eklendi. Beş dakika oda sıcaklığında tüp yavaşça alt üst edilerek karışım homojenize edildi. Sonra 3200 g`de 10 °C`de 10 dakika santrifüjle süspanسیون fazlarına ayrıldı.

-Daha sonra üstteki sıvı faz yeni bir mavi kapaklı steril polipropilen tüpe aktarıldı. Yine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilkol ekleyip beş dakika oda sıcaklığında tüp alt üst edildi. Sonra 3200 g`de 10 °C`de on dakika santrifüj edildi.

-Yine üstteki sıvı yeni bir tüpe aktarılıp aynı işlem bir kere daha uygulandı. En son üstteki kısım yeni steril polipropilen tüpüne aktarıldı.

-Sıvının toplam hacminin 1/10` u kadar 3M, pH:5.2 Sodyum Acetat tüpe eklendi. Daha sonra bu sıvının toplam hacminin üç katı kadar 2-propanol tüpe eklendi. Bu aşamada tüp içinde dikkatlice alt üst edildiğinde jelimsi yapıda DNA çökelmeye başlar.

-DNA, %70 etanol içeren 50 ml lik steril DNaz, RNaz içermeyen polipropilen tüpe aktarıldı.

-2 saat süre ile DNA bu etanol tüpü içinde hibridizasyon fırını içinde oda ısısında döner vaziyette bekletildi.

-DNA steril DNaz, RNaz içermeyen 1.5 ml` lik tüpe steril cam pipet ile transfer edildi. 13000 g`de 20 dk +4 °C`de tüp santrifüj edildi.

- Tüpte DNA çökeleği kurutulularak üzerine yoğunluğa göre 300-750 µl steril su eklendi.
- Tüpteki DNA çökeleğinin çözünmesi için bir gece 37 °C` de su banyosunda bekletildi.
- Ertesi gün DNA küçük parçalara ayrılarak -20 °C` de saklanmaya başlandı. Ayrıca konsantrasyon ve jelde yürütmek için de bir tüpe 20 µl DNA ayrıldı.

-DNA Konsantrasyon Ölçümü:

- Daha sonraki gerçek zamanlı PCR deneylerinde eklenecek DNA miktarının belirlenebilmesi için Araştırma Laboratuvarında (ARLAB) Carry WinUV spektrofotometre cihazında Carry 50 DNA/RNA Conc programında 260 nm absorbansta konsantrasyon ölçümü yapıldı.
- Ayrıca DNA % 1`lik agaroz jelde 1xTAE tamponu içinde cybergreen ile birlikte yürütülerek Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji elektroforez laboratuvarında imaj görüntüsü alındı.

-Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR):

Tüm beş hücre hattında kontrol geni HPRT1 ile birlikte toplam 15 gen (c-myb, b-myb, a-myb, HI3mbl, MYCN, E2F1, E2F2, hCdt1, geminin, p21, p27, p53, siklinA, cdk2) ekspresyonu ve MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları ölçüldü. Gerçek zamanlı PCR deneyleri, universal probe library (Roche UPL, kat:04683633001, lot:78007500)-Taqman probe ve primer çiftleriyle gerçekleştirildi (Tablo 1). Probe ve primer dizilerinin dizaynı Roche` un internet sitesi üzerinden yapıldı. Gen ekspresyon düzeylerinin ölçülmesinde kullanılan primer ve proplar ekson - intron bağlantı noktalarına yakın pozisyonlarda bulunmaktadır.

-Önce Master 5x (Roche kat:04535286001, lot:13521920) hazırlandı. Bunun için kitin reaksiyon karışımını içeren kırmızı kapaklı 1b tüpüne enzim içeren 1a tüpünden 10 mikrolitre reaktif steril pipet ucu ile aktarıldı.

-DNaz, RNaz içermeyen tüpte 5xMaster ve steril su karıştırıldı. Karışım hazırlanırken 4 kısım 5x master, 1 kısım steril su tüpe eklendi. Bu karışımdan 5 mikrolitre her bir kapillere dağıtıldı.

-Üzerlerine 2.5` ar mikrolitre her bir genin 1.6 pmol konsantrasyonunda primer çifti eklendi.

Primer ve Prob Dizileri

NCBI NO ve GEN ADI	PROBve KATALOG NO	SAĞ PRİMER DİZİSİ	SOL PRİMER DİZİSİ
BC101186.1 A-MYB	probe #2 04684982001	5'-aagcaagtggctgggaca-3'(18 nt)	5'-ctcctttaagaatgcgcttg-3'(21 nt)
X13293.1 B-MYB	probe #26 04687574001	5'-gccagagactccggacttt-3'(20 nt)	5'-cccagaagcagaagagga-3'(19 nt)
M15024.1 C-MYB	probe #62 04688619001	5'-agctgcatgtgtggttctg-3' (20 nt)	5'-tgctcctaattgcaaccgaga-3'(21 nt)
BC002712.2 MYCN	probe #55 04688520001	5'-cctcttcatcatcttcatctg-3'(24 nt)	5'-ccacaaggccctcagttacc-3'(19 nt)
BC050369.2 E2F1	probe #5 04685024001	5'-ctgggtcaaccctcaag-3'(18 nt)	5'-tccaagaaccatccagtg-3'(20 nt)
BC053676.1 E2F2	probe #68 04688678001	5'-gccttgacggcaatcact-3' (18 nt)	5'-ggacaaggccaacaagagg-3'(19 nt)
BC003065.2 CDK2	probe #50 04688112001	5'-cagaatctccagggaatagg-3'(21 nt)	5'-cctcctgggctgcaaata-3'(18 nt)
AF067855.1 Geminin	probe #53 04688503001	5'-ccagaggttcaccattcagtc-3'(21 nt)	5'-aactggcagaagtgcagaaca-3'(22 nt)
AB053172.1 HCDT1	probe #10 04685091001	5'-agcaggtgcttctcatttc-3' (20 nt)	5'-gcggagcgtctttgtgc-3' (18 nt)
BC039820.1 HL3MBTL	probe#82 04689054001	5'-ttccttcttctgcttcca-3' (21 nt)	5'-agcgcagggaataccagag-3' (19 nt)
BC000275.1 P21	probe #70 04688937001	5'-agctgctcgctgtccact-3' (18 nt)	5'-ccgaggcactcagaggag-3' (18 nt)
AB082923.1 P53	probe#12 04685113001	5'-cccttttggaactcagtg-3' (20 nt)	5'-aggccttggaaactcaaggat-3' (20 nt)
BC104783.1 SIKLINA	probe#84 04689089001	5'-gaagatccttaaggggtgcaa-3' (21 nt)	5'-ggtactgaagtccgggaacc-3' (20 nt)
BC001971.1 P27	probe#1 04684974001	5'-cggttaactctctgtggtc-3' (20 nt)	5'-agatgtcaaacgtgcgagtg-3' (20 nt)
BC000578.2 HPRT1	probe#73 04688961001	5'-cgagcaagacgttcagtcct-3' (20 nt)	5'-tgaccttgatttttgcatacc-3' (24 nt)
Y00664.1 NMYC GEN	probe#36 04687949001	5'-ggcctttaggtcagacaga-3' (20 nt)	5'-tgaccagggtcatgcaacta-3'(20 nt)
U94788.1 P53 GEN	probe #23 04686977001	5'-ctctagccaagcttccatcc-3' (20 nt)	5'-ttcagctcgggaaaatcg-3' (18 nt)

Tablo 1: Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan Taqman probe ve primer dizileri.

-Daha sonra 5`er mikrolitre her bir genin 5x konsantrasyonundaki Taqman problemleri eklendi.

-Her bir kapillere çalışılacak hücre hattından elde edilmiş cDNA ya da DNA 5` er mikrolitre eklendi. Bu şekilde her bir kapillerde 20 mikrolitrelik reaksiyon kuruldu. RNA susturulması öncesi ve sonrası için her bir hücre hattında eşit konsantrasyonda DNA ve cDNA eklendi. cDNA konsantrasyonları; SIMA için 130 nanogram/5 mikrolitre, Kelly için 165 nanogram/5 mikrolitre, MHH-NB-11 için 148 nanogram/5 mikrolitre, IMR32 için 171 nanogram/5 mikrolitre, SH-SY5Y

için 145 nanogram/5 mikrolitre eklendi. DNA konsantrasyonları; SIMA ve Kelly için 18 nanogram/5 mikrolitre, MHH-NB-11 ve IMR32 için 5 nanogram/5 mikrolitre eklendi.

-Kapillerler masaüstü mikrosantrifüjde 700 g`de 5 sn santrifüj edilerek reaksiyon karışımı kapillerin alt ucuna indirildi.

-Herbir genin mRNA ekspresyonu ve MYCN/p53 genomik DNA kopya sayıları ölçülürken negatif kontroller için su kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılması için ise Kelly hücre hattının cDNA ve DNA örneklerinde HPRT1 ekspresyonu ile MYCN/p53 kopya sayısı oranı ölçüldü.

-Lightcycler 2.0 cihazına kapillerler yüklendi ve aşağıdaki profili yazılı şartlarda çalışma başlatıldı.

İnkübasyon öncesi (1 döngü) : 95 °C`de 10 dk

Kantifikasyon (45 döngü) : -Denatürasyon: 95 °C` de 10 sn

-Primerlerin ergimesi: 60 °C` de 30 sn

-Uzama: 72 °C` de 3 sn (tek okuma)

Soğutma (1 döngü) : 40 °C` de 30 sn

-40 dakika sonra çalışma sona ermektedir. Sonuçlar döngü sayısı (cycle point, cp) olarak verilmektedir. Her çalışma sonunda her bir genin eksprese olduğu döngüyü gösteren cp değerleri kaydedildi.

-Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Etkinlik (Efficiency) Değerlerinin Hesaplanması:

-Lightcycler 2.0 cihazında çalışılmış gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarının her birinden alınmış floresans ölçüm değerleri, LinRegPCR rölatif kantifikasyon efficiency programına yüklenildi.

Programda; eksponansiyel fazda okunan floresans değerleri kullanılarak çizilen grafiğin eğiminden E değeri hesaplanmaktadır.

-Bununla birlikte ayrıca CMYB geninin mRNA'sının susturulmasından sonra Kelly ve SIMA hücre hatlarından elde edilen DNA` lar için 2 kat dilüsyon serileri gerçekleştirildi. Seri dilüsyon deneylerinde başlangıç DNA miktarları 2, 4, 8, 16 ve 32 nanogram olarak seçildi. DNA miktarlarının logaritmik değerleri alınarak x eksenine ait değerler oluşturuldu. Bu değerlere karşılık gelen Cp değerleri ile y eksenini değerleri oluşturuldu. Log (Konsantrsyon) değerleri ile Cp değerleri arasında Microsoft Excel dosyasının programı kullanılarak bir grafik çizildi. Bu grafiğin eğimi Microsoft Excel` de istatistiksel işlevler kısmında yeralan "Eğim" fonksiyonu kullanılarak hesaplandı. Aşağıdaki formül yardımıyla grafiğin eğiminden pcr amplifikasyon etkinlik (E) değeri hesaplandı.

$$E= 10^{(-1/Eğim)}$$

-Ekspresyon Katlarının Hesaplanması:

- Her bir gen Cp değerlerinin ortalaması alınarak HPRT1 referans geni ortalama Cp değerine göre farkı hesaplandı. Benzer şekilde MYCN geninin Cp değeri ortalaması da p53 referans geninin ortalama Cp değerine göre farkı belirlendi. Daha sonra her bir genin ekspresyon katları (ratio, R) hesaplandı. Ekspresyon katları $R=E^{\Delta Cp}$ formülü kullanarak belirlendi. Burada Cp farkları; $\Delta Cp= Cp_{kontrol\ gen}-Cp_{hedef\ gen}$ formülünden hesaplanmaktadır. Sonra LinReg PCR programına, Lightcyler 2.0 ham eksponansiyel olarak artan floresan verileri yüklenip PCR etkinlik katsayıları belirlendi. Hem hedef genlerin hem de referans HPRT1 ve p53 genlerinin PCR etkinlik katsayılarında ortalaması alındı. Her bir hedef genin ekspresyon katları belirlenirken kullanılacak E değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$E=E_{hedef}/E_{kontrol\ gen} + 1$$

3.6-RNA Susturulması (30):

Dört Nöroblastoma hücre hattında (Kelly, IMR32, SIMA, MHH-NB-11) MYCN geninin amplifikasyonu ve ekspresyonu ile ilişkilerini belirlemek üzere yedi genin (C-myb, Hl3mbtl, E2F1, B-myb, Geminin, P21, HCDT1) ve bir kontrol geninin (EGFP) mRNA'ları üzerinde hazır plazmid DNA vektör sistemleri (Invivogen custom-made psirna) kullanılarak susturma yapıldı. Firmaya yedi genin mRNA'sına özgül olarak dizayn edilmiş saç tokası (hairpin) yapısındaki kısa oligonükleotidlerin dizileri bildirilmiştir. Firma bu dizilere göre plazmid DNA vektörlerine her bir gen için ayrı ayrı olarak saç tokası yapısındaki oligonükleotidleri ekledi. Sonra hazırlanan bu vektörler ile uygun bakteri suşları liyofilize halde kontrol vektörüyle birlikte firma tarafından teslim edildi.

-Vektörlerin bakteri suşu ile transformasyonu:

Vektörler teslim alındıktan sonra uygun GT116 bakteri suşu ile transforme edildi. GT116 suşu, sbcCD delesyon mutanı olduğu için saç tokası yapısında sekanslarla daha fazla uyumludur.

-E-coli GT116 bakterisi liyofilize kompetan hücredir. LyoComp GT116 olarak adlandırılmaktadır.

-Önce LyoComp GT116 tüpü 5 dakika buzda bekletildi.

-Sonra 1 ml soğuk çözücü (reconstitutive) solüsyon eklendi. Yine 5 dakika buzda bekletildi.

-Dikkatlice homojenize edilerek 25-30 dakika buzda tamamiyle çözünmesi sağlanır.

-Her bir genin ligasyon ürününden 10 mikrolitre önceden soğutulmuş 1.5 ml' lik tüpe konuldu.

Tüpler tekrar buza yerleştirdi.

-GT116 hücrelerinin 100 mikrolitresi her bir genin ligasyon ürününe eklendi.

-Parmak vuruşlarıyla tüpler dikkatlice karıştırılıp hemen buza yerleştirildi.

-Tüpler 30 dakika buzda bekletildi.

-Sonra 42 ° C` lik su banyosunda 30 sn bekletilerek tekrar 2 dakika buza yerleştirildi. Bu aşamada plazmid vektörünü bakteri hücrelerinin içine alması sağlanmaktadır.

-Her bir reaksiyona 900 mikrolitre antibiyotiksiz Terrific Broth (TB) ortamı eklendi.

-Tüpler 37 ° C` de 1 saat 30 dakika 110 rpm` de karıştırılarak inkübe edildi.

-Fast-Media kanamisinli agar plaklarına 300 er mikrolitre transformasyon reaksiyonu gerçekleşmiş ürünler steril pipet ucuyla yayıldı.

-Plaklar 37 ° C` de bir gece inkübe edildi.

-Bakteri Plaklarından plazmid DNA` ların elde edilmesi:

Daha sonra bakteri kültür plaklarından her bir genin plazmid DNA` ları izole edildi.

-Önce plaklardan tek koloniler steril pipet ucuyla 5 ml` lik Kanamisinli TB bakteri ortamı içine aktarıldı. 8 saat 37 ° C` de 110 rpm` de karıştırmalı inkübatörde bekletildikten sonra plazmid DNA speI enzim kesimi ve dizi analizinde kullanılması için izole edildi. Önce bu ortam içinden 1 ml alınıp 2 ayrı 50 ml` lik mavi kapaklı Dnase Rnase içermeyen steril tüplerde bulunan TB kanamisinli ortama 0.5` er ml olarak ekildi. Bu tüplerde 37 ° C` de 110 rpm` de karıştırmalı inkübatörde 16 saat bekletilmek üzere kaldırıldı. Bu tüplerden elde edilecek daha büyük miktardaki plazmid DNA hücreye transfeksiyon için kullanılacak.

-Highpure plazmid izolasyon kitinin uygulanma yöntemi (Roche kat:11754777001, lot:14056500):

-Sonra bağlanma tamponu buza yerleştirildi.

-Geriye kalan 4 ml TB ortamı içindeki GT116 hücreleri 4000 g`de 3 dakika santrifüj edildi.

-Üstteki sıvı atıldı. Hücre çökeleği üzerine 250 mikrolitre Rnase içeren süspansiyon tamponu eklendi. Bu karışım süspansiyon tamponunun 1ml`sinin liyofilize Rnase içeren tüpe aktarılmasıyla hazırlandı. Tüp alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra tamamıyla Rnase çözüldü. Bu sıvı tekrar süspansiyon tamponu şişesine aktarıldı.

- Hücre çökeleği iyice karıştırılıp homojenize edildi.
- Sonra 250 mikrolitre Lizis tamponu süspansiyona eklendi. 5-6 kere tüp dikkatlice alt üst edilerek oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- Daha sonra 350 mikrolitre soğuk bağlanma tamponu eklendi.
- Tekrar 5-6 kere tüp dikkatlice alt üst edilerek buzda 5 dakika bekletildi.
- 13000 g`de 10 dakika mikrosantrifüjde santrifüj edildi.
- High Pure filtre tüpünü bir toplayıcı tüpe yerleştirildi.
- Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı filtre tüpüne aktarıldı.
- Filtre tüpü toplayıcı tüple birlikte mikrosantrifüjde 1 dakika 14000 rpm` de santrifüj edildi.
- Sonra toplayıcı tüpteki sıvı atıldı. Filtre tüpü aynı toplayıcı tüpe yeniden yerleştirildi.
- Olası yüksek nükleaz aktivitesini inhibe etmek için 500 mikrolitre yıkama tamponu 1 filtre tüpüne eklendi. 1 dakika 14000 rpm` de santrifüjden sonra altta toplanan sıvı atıldı.
- Daha sonra 700 mikrolitre yıkama tamponu II filtreli tüpe eklendi. 14000 rpm`de 1.5 dakika santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.
- Tüm filtreli tüp ve toplayıcı tüp birlikte tekrar 1 dakika 14000 rpm` de santrifüj edildi. Alttaki toplayıcı tüp atıldı.
- Sonra filtreli tüpü steril 1.5 ml tüpüne yerleştirildi. 100 mikrolitre elüsyon tamponu eklendi.
- 14000 rpm` de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüp atıldı. 1.5 ml tüpte plazmid DNA elde edildi. + 4 ° C` ye plazmid DNA` lar kaldırıldı.
- Plamid DNA` ların SpeI restriksiyon enzimi ile kesilmesi:**

Plazmid DNA vektörleri SpeI restriksiyon enzimi kesim noktalarını içermektedir. DNA` ların içine saç tokası yapısındaki sessizleştirme yapan dizilerin doğru yerleştirilip yerleştirilmediğini anlamak üzere SpeI ile vektörler kesildi.

-Bu işlem için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Nükleaz içermeyen su: 16 µl

10x Tango tampon: 2 µl

DNA (0.5-1 µg/µl): 1 µl

BcuI (SpeI) : 0.5 µl

-Karışım dikkatlice pipet ucuyla karıştırılarak birkaç saniye santrifüjle kapaktaki kalan sıvı içerik aşağıya indirildi.

-37 °C` de 16 saat karışım inkübe edildi.

- SpeI enzimi 0.8 µl 0.5 M EDTA, pH: 8.0 ile inaktive edildi.

-Karıştırıldıktan sonra elektroforez yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jele yüklendi.

- Ayrıca plazmid DNA`lar dizi analizi için Güney Kore`de bulunan Macrogen firmasına gönderildi.

-Genopure Plazmid Midi kitin uygulanma yöntemi (Roche kat:03143414001, lot:15092300)

Düşük kopya sayılı plazmidler için kullanılan yöntem seçildi.

-Önce bir gece önceden karıştırmalı inkübatöre konulan iki adet 50 ml steril tüplerde üremelerini tamamlayan bakteriyel hücreler 4000 x g` de 15 dakika +4 °C` de santrifüjle çöktürüldü.

-Üstteki ortam atıldı.

-8 ml Rnase içeren süspansiyon tamponunda hücre çökeleği yeniden süspanse edildi. İyice karıştırıldı.

-Üzerine 8 ml Lizis tamponu eklendi ve dikkatlice 6-8 kere tüpler alt üst edilerek karıştırıldı.

Oda ısısında 3 dakika tüpler inkübe edildi.

-Daha sonra süspansiyona soğutulmuş 8 ml nötralizasyon tamponu eklendi. Tüpler 6-8 kere alt üst edilerek süspansiyon karıştırıldı. Homojen süspansiyon oluştu.

-Tüpler 5 dakika buzda inkübe edildi.

- Önce katlanmış filtre kağıdı silindir biçimli altı delik bir tüp içine yerleştirildi. Sonra 50 ml steril tüpün ağzına konuldu. Filtre birkaç damla dengeleyici tampon ile ıslatıldı.
- Homojen süspansiyonu ıslatılmış filtreye eklendi. Altta tüpte toplanan lizat saklandı.
- Bir kolon kağıt bir halka yardımıyla 50 ml steril polipropilen tüpün ağzında sabitlenir.
- Kolon 2.5 ml dengeleyici tampon ile yıkandı. Bu esnada kolondan tampon yavaşça damlayarak geçer. Altta toplanan tampon atılır.
- Önceki adımda saklanan lizat kolona yüklendi. Yavaşça kolondan süzüldü.
- Alta geçen lizat tekrar ikinci kez aynı kolona yüklendi.
- Bu sefer altta toplanan sıvı atıldı.
- Kolon 4 ml yıkama tamponu ile yıkandı. Altta toplanan tampon atıldı. Bu işlem iki kere daha uygulandı. Altta toplanan tampon içinde bulunduğu steril 50 ml tüple birlikte atıldı.
- Kolon yeni bir 50 ml tüpe yerleştirildi.
- 2.5 ml önceden 50 °C` ye ısıtılmış elüsyon tamponu ile kolondan geçirildi. Altta toplanan sıvı içinde plazmid elde edildi.
- İkinci kez 2.5ml elüsyon tamponu ile kolon muamele edildi. Altta toplanan sıvılar birleştirildi. Altta toplanan sıvı plazmid DNA`yı içermektedir.
- 3.6 ml isopropanol eklendikten sonra plazmid DNA çöktürüldü.
- Sıvı steril 1.5 ml Dnase Rnase içermeyen tüplere bölündü ve 15000 x g` de 30 dakika +4 °C` de santrifüj edildi. Üste kalan sıvı atıldı.
- Plazmid DNA 3 ml soğuk % 70 etanol ile yıkandı. 15000 x g` de 10 dakika +4 °C` de santrifüj edildi. Pipet ucuyla etanol uzaklaştırıldı.
- Plazmid DNA 10 dakika havada kurutuldu.
- Plazmid DNA üzerine 50 mikrolitre steril çift distile su eklenerek çözüldü. Plazmid DNA daha sonraki transfeksiyon deneylerinde kullanılmak üzere +4°C` ye kaldırıldı.

-Plazmid DNA` ların hücre hatlarıyla transfeksiyonu:

LyoVec reaktifi ile plazmid DNA`lar hücreye aktarıldılar. Bu reaktif fosfolipidlerin üyesi olan katyonik bir lipiddir.

-Liyofilize halde bulunan LyoVec önce 2 ml steril suda çözündü. Dikkatlice 30 saniye karıştırılarak homojenize edildi. En az 30 dakika +4 C` de bekletildi.

-Sonra transfeksiyondan hemen önce reaktif oda ısısına getirildi. Alt üst edilerek homojenize edildi.

-1.5 ml steril polipropilen tüpte 5 mikrogram plazmid DNA ile 100 mikrolitre LyoVec karıştırıldı. Bu tüpler oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Bu sırada DNA/Lipid kompleksleri oluşmaktadır.

-Bu esnada 6 kuyulu kültür kabına transfekte edilecek hücre hattının ortamından 2 ml eklendi.

-Hücre hatının ürediği flasklardan hücreler tripsin edta ile kaldırılıp 6 kuyulu kültür kaplarına 800 000 hücre ekildi.

-Sonra LyoVec/DNA kompleksleri kuyuya eklendi. Yavaşça sallayarak ortam içinde hücreler ve kompleksler homojenize edildi. 48 saat için 37 °C` de kültür inkübe edildikten sonra G418 kimyasalı ile neomisine dirençlilik geni içeren hücreler seçildi.

-Stabil Transfeksiyon:

Transfeksiyondan 48 saat sonra G418 ile hücreler muamele edildi.

G418 neomisin genini eksprese eden ökaryotik hücrelerin seçilmesi için kullanılan bir aminoglikozid antibiyotiktir. G418 ökaryotik hücrelerde 80S ribozomlara dönüşümsüz olarak bağlanıp polipeptid sentezini bloklar. Neomisin geni ise G418`e karşı hücrelerin dirençliliğini sağlar. Bu protein G418`in amino ya da gruplarına kovalent olarak bağlanıp modifiye ederler. Bu yolla G418`i inaktive ederler.

-G418 Kelly, SIMA hücre hatlarında 800 µg/ml, MHH-NB-11 ve IMR32 hücre hatlarında 500 µg/ml konsantrasyonda her bir kültür kabının kuyusuna uygulandı.

-Transfeksiyondan 48 saat sonra hücre ortamları yeniledikten sonra yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda G418 eklendi. Dikkatlice kültür kapları karıştırıldı. Her 3-4 gün de bir ortam değiştirilip aynı konsantrasyonlarda G418 eklenmeye devam edildi.

-3-4 hafta boyunca G418 eklendikten sonra stabil hücre klonları elde edildi. Bu aşamada gerçek zamanlı PCR deneyleriyle ilgili genin ekspresyon düzeyi ölçüldü. Bu şekilde RNA susturulmasının gerçekleşip gerçekleşmediği anlaşıldı. Susturulmanın gerçekleştiği hücre hatlarında yeniden cDNA ve DNA izolasyonları yapıldı. Susturmanın diğer genlerin ekspresyonu üzerine ve MYCN DNA amplifikasyonu üzerine olan etkileri incelendi.

3.7-Kromatin İmmüno Presipitasyon (ChIP) Deneyleri (31):

C-myb ve E2F1 transkripsiyon faktörlerinin DNA üzerinde hangi bölge ya da bölgelere bağlandığını belirleyebilmek için hücre hatlarında kromatin immünopresipitasyon deneyleri gerçekleştirildi.

-Önce 75 cm² flasklarda her bir hücre hattında yapışarak üreyen hücreler tam yüzeyi kaplayana kadar büyütüldü.

-Sonra her bir flask içinde bulunan 12 ml ortama % 1 son konsantrasyonda olacak şekilde 120 mikrolitre formaldehid eklendi.

Dikkatlice ortam karıştırılıp oda ısısında 10 dakika bekletildi.

-Formaldehidle gerçekleşen çapraz bağlanmayı durdurmak için ortama son konsantrasyonu 0,125 M olacak şekilde 750 mikrolitre glisin eklendi. Dikkatlice karıştırılıp 10 dakika oda ısısında beklendi.

-Flasktan ortam uzaklaştırıldı. Hala flaskın yüzeyinde yapışmış durumda bulunan hücreler 4 °C` de soğutulmuş 8 ml 1xPBS ile yıkandı.

-PBS uzaklaştırılıp 6 ml proteaz inhibitörü içeren Lizis tamponu eklendi. Tamponla birlikte hücre kazıyıcısı kullanılarak hücreler kaldırıldı. Hücreler tamponla birlikte 50 ml steril polipropilen tüplere alındı.

-1850 g` de 5 dakika 4°C` de santrifüjle hücreler çöktürüldü.

-Üstteki sıvı atıldıktan sonra tekrar soğuk 8 ml 1xPBS ile hücreler yıkandı.

-Üstteki sıvı atıldıktan sonra 1.9 ml yüksek tuz oranı ile yine proteaz inhibitörü içeren Lizis tamponu eklenip pipet ucu ile hücreler homojenize edildi. Hücreler sonikasyon adımı için 2 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı.

-Sonikasyon Adımı:

Sonikasyon işlemi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' nda Prof. Dr. Gülgün Oktay tarafından standardize edilerek yine kendisi tarafından SONICS VC cihazında uygulandı.

-Sonikasyon için 5 watt % 30 güç uygulaması yapılarak 30 saniye süreyle buz içinde mikrosantrifüjde bulunan hücre lizatlarına 4 kez atış (pulse) verildi. Her atış arasında da hücreler 30 saniye süresince buzda sonikasyon uygulanmadan bekletildi.

-Bu aşamadan sonra hücrelerde transkripsiyon faktörlerinin kromatin üzerinde bağlı olduğu DNA` nın 200-500 bp aralığında fragmente olması beklenmektedir.

-Sonikasyon adımından sonra 15 dakika 9500 g`de 4°C` de hücre ekstraktları santrifüj edildi. Üstteki sıvı yeni mikrofüj tüpüne aktarıldı. Bu sıvı fragmente edilmiş kromatini içermektedir.

-Üstteki sıvının protein konsantrasyonu belirlendi.

-Solüsyona daha sonra 50 mikrolitre Protein A/G PLUS-Agaroz (Santacruz, kat:Sc-2003) eklendi. 30 dakika 4° C` de bekletildi. Sonra 13 800 g` de 5 dakika 4 C` de santrifüj edildi.

-İmmünopresipitasyon adımı için 1 mikrolitre ayrı ayrı hazırlanmış kromatin içeriklerine c-myb ve E2F1 Transcruz CHIP antikorları eklendi. Bir gece 4° C` de inkübasyon gerçekleştirildi.

- Tekrar 50 mikrolitre Protein A/G PLUS-Agaroz (Sc-2003) eklendi. 4° C` de 2 saat inkübe edildi.
- 11 500 g` de 1 dakika santrifüjle üstteki sıvı atılıp dipte boncuklar elde edildi.
- Boncuklar 1 ml yüksek tuz konsantrasyonu olan Lizis tamponu (Sc-45001) ile 2 kez yıkandı.
- Daha sonra boncuklar yıkama tamponu (Sc-45002) ile 4 kez yıkandı.
- Boncuklar 400 mikrolitre elüsyon tamponunda (Sc-45003) süspanse edildi.
- Çapraz bağlanmaları tersine çevirmek için 67 °C` de su banyosunda 2.5 saat tüpler inkübe edildi. Bu esnada tüpler 15 dakikada bir karıştırıldı.
- Sonra 12000 rpm` de 1 dakika santrifüjle boncuklar üzerinde kalan sıvı yeni mikrofüj tüpüne aktarıldı. Fragmente kromatini içeren ekstrakt 67°C` de su banyosunda bir gece bekletildi.
- Ekstrakt 10000 rpm` de 3 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı yeni tüpe aktarıldı.
- DNA` yı izole etmek üzere 500 mikrolitre fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) süspansiyona eklendi. Elle tüpler alt üst edilerek karıştırıldı. 14000 rpm` de 3 dakika santrifüjle fazlar ayrıldı.
- Sulu faz yeni bir tüpe alındı. Geriye kalan organik faza bir kez 100 mikrolitre steril apirojen su eklenip yine 14000 rpm` de 3 dakika santrifüj edildi. Diğer sulu fazla bu tüpten elde edilen sulu faz birleştirildi.
- Tekrar 600 mikrolitre fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ile fazlara süspanسیون ayrıldı.
- Üstteki sıvı yeni tüpe aktarıldı. Sıvı hacminin 1/10 volümünde 3M NaOAc (pH:5.2) eklendi. Elde edilen süspanسیونun hacminin 3 katı kadar 2-propanol eklendi. Süspanسیون içindeki DNA yoğunlaştırılarak çöktürüldü.
- 14000 rpm` de 20 dakika santrifüjle DNA dipte elde edildi. Üstteki sıvı atılıp 1ml %70 etanol ile DNA yıkandı. Yine 14000 rpm` , de santrifüjden sonra etanolde uzaklaştırıldı.
- Fragmente DNA üzerine 50 mikrolitre steril apirojen su eklenip pipet ucuyla homojenize edildi.
- 20 °C` de saklanmaya başlandı.

Bu aşamadan sonra c-myb ve E2F1` in genomda DNA üzerinde hangi bölge ya da bölgelere bağlandığını gösterebilmek için ChIP`e özel İllumina dizilendirme yapılması gerçekleştirilecektir. Bu dizilendirmede; Almanya` da bulunan firma tarafından önce kütüphane oluşturulacak sonra dizilendirme ile bioinformatik olarak transkripsiyon faktörlerinin DNA üzerinde bağlandıkları bölgeler tespit edilecektir. Bir test başına bu tüm işlemler 2500 euro olarak İllumina şirketi tarafından bildirilmiştir. Bu tezin bütçesi tarafından bu ücret karşılanamamıştır. Ancak daha sonra yeni bir destek bulunması halinde 15 örnekte ChIP dizilendirilmesi yaptırılacaktır.

4- BULGULAR

4.1-Drosophila ACE3 dizisini içeren bölge ile MYCN geni 5'-upstream dizisini içeren bölge arasında özdeşlik bulundu.

Drosophila ACE3 dizisi NCBI sitesinden indirildi (Accession no: X02497.1 GI:7728) (Şekil 6).

MYCN gen kontiği dizisinde aynı siteden indirildi (NT_005334 REGION: 8446889..11088087).

ACE3 BÖLGESİ: 55-375 BP

```
1 aagcttagtg cggcagtttg gaaagtggaa cggttgtggt tataatntta ttgtaatntt
61 atctcaatntt tntttgctntt tgtatataaa ttctaccaac gcagcagaat tttcaggcca
121 ctgccttgac ttcaactgtgt cactgaaaaa tcggtgtcaa gctctcggca ccgtggggca
181 aagcaactgc aactactgatc gaaactatgc ggatccggag cacgaagagt catgcggtcg
241 gaactcttaog taatgggtct cgtctctggt agacgatggc gtaagcacag acgcctgcta
301 tctggaccgg cccgaattga gagccagcat tttggccagt gcggattcgg cctggctgca
361 cgtctcgggc ggcgctctcaa gattgctgga caaagaggcg aggcctggaa ctgcgtctcc
421 gggaaccgg agagccgaaa cttgcatcat attcgtcacg taagagttgg gcctctgcct
481 ggatctggta taaaaacaaa acattgcgc agataagac attagttacc ttgcacgca
541 tcaactaacc aactcagcct cagaatgatg aagtctatgg taagcttaag ttccaatatt
601 gtttcaacctc aacacctcaa ctgcgtccag tatgatcctt ttaataaaaat ataactacat
661 attataataa tttgaataa tatgattgga tctttctntt ctaatgcact tcaggctata
721 cccaattaa ttgaatntnt tcttgaatcc cttagtgcac ctgcctctgc gccatctctg
781 ccgnttcggc caactcctac ggacgtcccc gtggtggata ccggtggtgc ccagtcggtg
841 gctatgccta ccaggtgcag cctgccctga ccgtaaggc gatcgttccc tcatacggtg
901 gtggatcgg cggaaccat ggaggatatg gcggtgccta cgagtcggtg cctgtgcccg
961 tgtcctctgt ctacagcggg gccaatgtgg gatctcagta ctccggttcc ggctacggcg
```

Şekil 6: *Drosophila* chorion genlerinin amplifikasyonunun kontrol edilmesinde myb kümesinin bağlandığı ACE3 bölgesi.

MYCN GENİ 5'-UPSTREAM: 2466909-2467787 BP

```
ca gtttggatc aagctgtttg agccgaggct ggttctcagg aggtgtggac
2466961 agcaactcca tctcggtaaa tcagattcgc ctgcccataa ctggggagaa tgggtggctnt
2467021 gaaaaggnta acttgggagc cctggggagc gctgcaggga acgtacgcc attcccccta
2467081 ggaagcagag ccaggccgcc tctcctcccg cagtgggtgag gacgcgtgga cagtcccgcg
2467141 ggggcggcgg gagacctgcg gactggccgc actccaggtc cgcgccaagg ccgggcagct
2467201 ccgctntctg ctcaagtctcc gcgaggtgtc gccttcggcc gaagaaacca ccgcggcgcc
2467261 accctcgtag ctgcactta tttatnttatt tnttttcaaa caaggggggc gccctctctc
2467321 tttcaatntg aaactggaaa catccagagg tcttgntcct aagggggcgc gtcctctccc
2467381 tgctatnttg caccttcgga ctacccttct ttcgtaatta cacaggagca acctccctgc
2467441 aaggccttgc tcaacgttgg cctcgcgctc agctgcacaa cacgcagtca aagcgggggc
2467501 tgggttagaa gcatcggctc cccctccccca acacacacc ccggagccct ccgtaatntt
2467561 tntttctntt aatgacaagc aattgccagg ctgcgagggt ggtgctgca ttgcaccgct
2467621 ccgcgcgcag ctggttctca gactgcagcc ggtgcaagcc cgggggtcca aaagggcggg
2467681 aggagcacac cctgggcttc ccagctnttc agccttctct ctgcaaaaga aagcaagtgg
2467741 cttttggcgc gaaagccttg gcgcctcccc tgatntntat ggaaatc
```

Şekil 7: MYCN geninin 5' upstream bölgesinde yeralan (-2525-1647. baz) dizisi.

ACE3` ün içinde bulunduğu 1-1020. baz arası bölgenin DNA dizisi ile MYCN geni 5` upstream ` de yeralan 2416201-2481180 arası bölgenin DNA dizisi LFASTAn dizilendirme programı ile karşılaştırıldı. Aşağıda görülen ACE3`ün 14-884 bölgesi ile MYCN`nin 2466909-2467787 DNA dizisi arasında % 43.545 oranında özdeşlik ile 914 nükleotidlik bir çakışan bölge saptandı.

Résultats de LFASTA

Comparaison de deux séquences nucléiques :
Sequence 1 : Sequence personnelle : ACE3 1-1020 baz
Sequence 2 : Sequence personnelle : MYCN 2466909-2467787 baz

LFASTA compares two sequences
v2.1u00 Mar, 2001
Please cite:
W.R. Pearson & D.J. Lipman PNAS (1988) 85:2444-2448
searching /tmp/tmpweb/analseq/al630528/s2 library
Comparison of:
(A) QUERY
(B) QUERY
using matrix file DNA

43.545% identity in 914 nt overlap; init: 50, opt: 64

```

Query 20 30 40 50 60 70 470 480 490 500 510 520
Query CAGTTTGGAAAGTGAACCGTGTGTTTATAATTTTATTGTAATTTTATCTCAATTTTTT
X:::::::::X : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query CAGTTTGGAA--TCAAGCTGTT-TGAGCCGAGGCTGGGTCTCAGGAGGTGGACAGCAC
50710 50720 50730 50740 50750 50760 Query 51180 51190 51200 51210 51220 51230
Query 80 90 100 110 120 130
Query TTGCTTTT--GTATATAAATTCACCAACGACGAGCAATTTTCAGGCCATCGCTTGACT
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query TTCCATCTCGGTAATCAGATTCGCCTGCCCA--TAAGTGGGGAATGGTGGCTT---T
50770 50780 50790 50800 50810 50820 Query 530 540 550 560 570 580
Query ACCTTCGCATCGATCAACTACCAAC-TCAGCCTCAGAATGATGAAGTTCATGGTAAGC-
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query ACC-TCCCTGCAAGGCCTTGCTCAACGTTGGCCTC---GCGCTCAGCTGCACAACACGCA
51240 51250 51260 51270 51280
Query 590 600 610 620 630 640
Query -TTAAGTCCAATATTGTTTACCTCAAC-ACCTCAACTGCGTCCAGTA-TGATCCTTTT
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query GTCAAAGCGGGGCTGGTTAGAAGCATCGTCTCCCCCTCC--CCAACACACACCCCGG
51290 51300 51310 51320 51330 51340
Query 650 660 670 680 690 700
Query AATAAAATATAACTACATATTATAATAATTTGAAATAATATGATGGATC-TTCTTTTC
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query AGCCCTCCGTAATTTTTTTTCTTTTAAATGACAAAGCAAT-TGCCAGGCTCCGAGGTGGG
51350 51360 51370 51380 51390 51400
Query 710 720 730 740 750 760
Query TAATGCACTTCA-GGCTATACCAAATAATTAATTAATTTTTCTTGAATCCCTTAGTGCA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query TGCTGCATGCAACCGCT---CCGCGCAGCTGGTCTCAGAGTGCAGCC---GGTGCA-
51410 51420 51430 51440 51450
Query 770 780 790 800 810 820
Query CTGCCCTCGGCCATCTCTGCCGTTTCGGCCAACCTCCTACGGACGTCGCCGTTGGTGGATA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query -AGCCCGGGGTCCAAAAGGCGGGAGGAGCACACCT--GGCCTTCCCAGCTTTCAGC
51460 51470 51480 51490 51500 51510
Query 830 840 850 860 870
Query CGGTGGTGCC---CAGTCGGTGGCTAT---GCCTACCAGGTGCAGCCTGCCCTGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query CTCTCTCTGCAAAAGAAAGCAAGTGGCTTTTGGCCGAAAGCCTTGGCGCCTCCCTGA
51520 51530 51540 51550 51560 51570
Query 420 430 440 450 460
Query CTGCGTCTCCGGGAACCCGGAGAGCCGAAACTTGATCATATTCGTACAGTAAGAGTTG-
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Query GCCCTTCTTTCAATTTGAAACTGGAAACATCCAGAGTCTTGTCTCCTAAGGGGGCC
51120 51130 51140 51150 51160 51170

```

Şekil 8:ACE3 ve MYCN 5`-upstream arasındaki özdeş bölge (-2525-1647. baz).

4.2-MYCN geni 5' bölgesi ile ACE3 arasında özdeşliğin görüldüğü bölgeye içine alan 5000 bazlık alana bağlanan transkripsiyon faktörleri belirlendi.

NCBI sitesinden indirilen (NT_005334 REGION: 8446889..11088087) MYCN Geni dizisinin -5000. nükleotidinden (2464434.baz) başlayarak +1. nükleotidine (2469434.baz) kadar olan bölgeye bağlanan transkripsiyon faktörleri belirlendi. Programdan alınan sonuca göre; ACE3 ile MYCN geni 5' bölgesi arasında özdeşliğin bulunduğu bölgede (-2525-1647. baz) c-myb ve E2F1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma konsensus dizilerini içerdiği görüldü.

TFSEARCH Search Result

** TFSEARCH ver.1.3 **

(c)1995 Yutaka Akiyama (Kyoto Univ.)

This simple routine searches highly correlated sequence fragments versus TFMATRIX transcription factor binding site profile database by E.Wingender, R.Knueppel, P.Dietze, H.Karas (GBF-Braunschweig).

<Warning> Scoring scheme is so straightforward in this version.
score = 100.0 * ('weighted sum' - min) / (max - min)

The score does not properly reflect statistical significance!

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998

Query: **MYCN Geni 2464434-2469434 (-5000)-(+1) bölge (5001 bases)**

Taxonomy: ALL

Threshold: 80.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

2451	CAGCAGCTTT CCTTTTTCCC TTCACAGTT TGGAAATCAAG CTGTTTGAGC	entry	score	2701	TCCCGGGGG GCGGGGGAG ACCTGCGGAG TGGCCGCACT CCAGGTCCGC	entry	score	
	<-----	M00120	dl	87.1	----->	M00048	ADR1	96.9
	<-----	M00028	HSF	85.9		M00048	ADR1	93.8
	<-----	M00062	IRF-1	85.9	<-----	M00033	p300	87.1
	<-----	M00183	c-Myb	83.5	<-----	M00050	E2F	86.2
	<-----	M00253	cap	83.4	----->	M00263	StuAp	86.2
	<-----	M00175	AP-4	83.3	----->	M00196	Sp1	86.1
	<-----	M00084	MZF1	83.1				
2551	GATTTCGCTG CCCATAACTG GGGAGAATGG TGGCTTTGAA AAGGTTAACT	entry	score	2751	GCCAAAGCCG GGCAGCTCCG CTTTCTGCTC AGTCTCCGCG AGGTGTCGCC	entry	score	
	<-----	M00029	HSF	95.4	<-----	M00028	HSF	100.0
	<-----	M00101	CdxA	87.9	----->	M00253	cap	99.5
	<-----	M00183	c-Myb	86.6	<-----	M00028	HSF	86.5
	<-----	M00028	HSF	85.4	----->	M00050	E2F	86.2
	<-----	M00159	C/EBP	84.6	---	M00263	StuAp	86.2
	<-----	M00183	c-Myb	84.5				
	<-----	M00028	HSF	84.4				
	<-----	M00100	CdxA	83.3				
2601	TGGGAGCCCT GGGACGGCT GCAGGGAACG TACGCCCAAT CCCCTAGGA	entry	score	3301	CAAGTGGCTT TTGGCGGGAA AGCCTTGGCG CCTCCCCTGA TTTTATGGA	entry	score	
	----->	M00048	ADR1	93.8	----->	M00050	E2F	100.0
	<-----	M00048	ADR1	93.8	<-----	M00050	E2F	100.0
	---	M00029	HSF	84.6	<-----	M00154	STRE	97.2
	---	M00183	c-Myb	84.5	----->	M00101	CdxA	92.1
	<-----	M00046	GCR1	84.1	----->	M00180	E2F	86.2
	----->	M00087	Ik-2	83.3	----->	M00050	E2F	86.2
	----->	M00141	Lyf-1	83.1	<-----	M00048	ADR1	86.2

Şekil 9: MYCN geninin ACE3 ile özdeşlik bulunan (-2525-1647) bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri. Kırmızı ile işaretli olanlar c-myb ve E2F1 transkripsiyon faktörleridir.

Özdeşliğin görüldüğü bölge dışında kalan bazı bölgelerde de c-myb ve E2F1'in bağlanma dizilerini içerdiği saptandı. Özellikle +1. Nükleotidden hemen önce yer alan promoter bölgesinde birbirine çok yakın E2F1 ve cmyb bağlanma dizileri içerilmektedir.

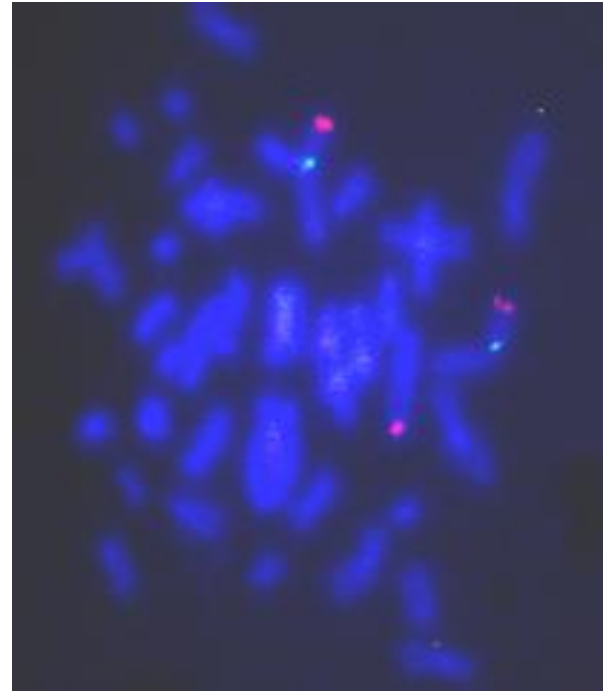
4801	ACCTGGTTAG	AGGGGGCGCC	CATTGCCTAT	CCCCTCGGTC	TGCCCCGTTT	entry	score
						M00076	GATA-2 95.7
						M00048	ADR1 93.8
						M00048	ADR1 93.8
						M00109	C/EBPb 81.8
						M00116	C/EBPa 81.5
						M00183	c-Myb 81.4
						M00083	MZF1 80.9
						M00127	GATA-1 80.7
						M00116	C/EBPa 80.7
4851	GCCCACCCTC	TCCGGTGTGT	CTGTCGGTGT	CAGTGTGGA	GGTCGGCGCC	entry	score
						M00048	ADR1 92.3
						M00048	ADR1 83.1
						M00227	v-Myb 82.9
						M00183	c-Myb 81.4
						M00227	v-Myb 81.3
						M00253	cap 81.3
						M00181	E2 81.2
4901	GGCCCCCGCC	TTCCGCGCCC	CCCACGGGAA	GGAAGCACCC	CCGGTATTAA	entry	score
						M00048	ADR1 98.5
						M00048	ADR1 89.2
						M00048	ADR1 89.2
						M00148	SRY 88.2
						M00008	Sp1 87.7
						M00050	E2F 86.2
						M00253	cap 85.3
						M00140	Bcd 84.8
						M00029	HSF 84.6
						M00029	HSF 84.6

Şekil 10: MYCN promoter bölgesinde c-myb ve E2F1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri.

4.3-Tüm 5 hücre hattında MYCN geni kopya sayıları FISH yöntemi ile belirlendi.

-SH-SY5Y hücre hattında MYCN kopya sayısı %93,1 oranında 3 kopya olarak analiz edildi.

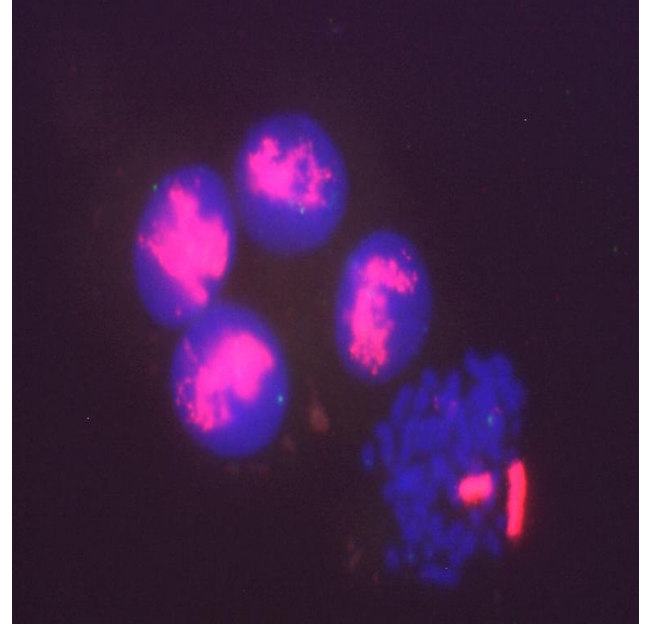
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemiyle MYCN lokusuna spesifik floresan işaretli prob kullanılarak SH-SY5Y hücre hattında kopya sayısı artışı incelendi. Floresan mikroskopta Macoprob programında analiz gerçekleştirildi. Analiz sonucunda; 260 hücre çekirdeğinin %93,1'in de 3 kopya MYCN genine spesifik sinyaller saptandı. Ayrıca % 3,8 oranında 2 kopya MYCN gözlenirken % 3,1 oranında 4 kopya MYCN analiz edildi.



Şekil 11: SH-SY5Y hücre hattına ait FISH görüntüsü.

-Kelly hücre hattında % 100 oranında 10`dan büyük yüksek kopya sayılı MYCN amplifikasyonu saptandı.

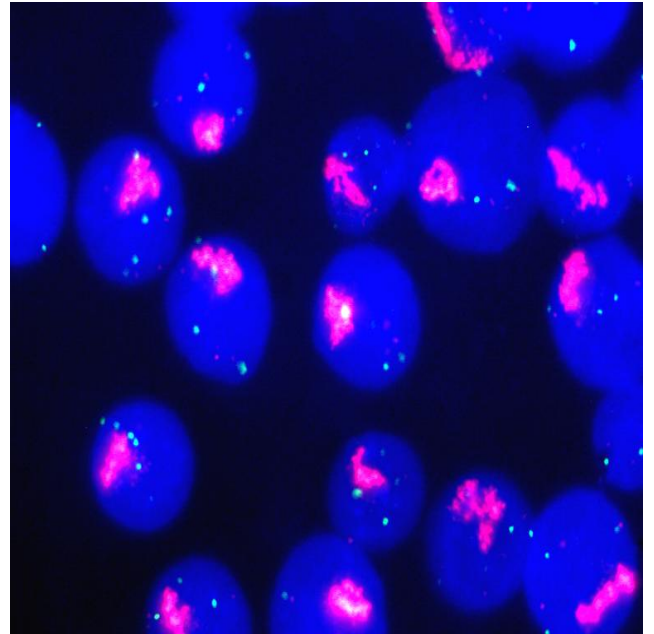
FISH yöntemiyle MYCN lokusuna spesifik floresan işaretli prob kullanılarak Kelly hücre hattında kopya sayısı artışı belirlendi. Floresan mikroskopta Macoprob programında analiz sonucunda; 260 hücre çekirdeğinin tamamında (%100)10`dan büyük yüksek kopya sayılı MYCN amplifikasyonu gözlemlendi.



Şekil 12: Kelly hücre hattına ait FISH görüntüsü.

-MHH-NB-11 hücre hattında nükleusların tümünde 10`dan büyük yüksek kopya sayılı MYCN amplifikasyonu saptandı.

FISH yöntemiyle MYCN lokusuna spesifik floresan işaretli prob kullanılarak MHH-NB-11 hücre hattında kopya sayısı artışı floresan mikroskop-ta Maco-prob programında analiz edildi. Analiz sonucunda; 260 hücre çekirdeğinin tamamında 10`dan büyük yüksek kopya sayılı MYCN amplifikasyonu gözlemlendi.

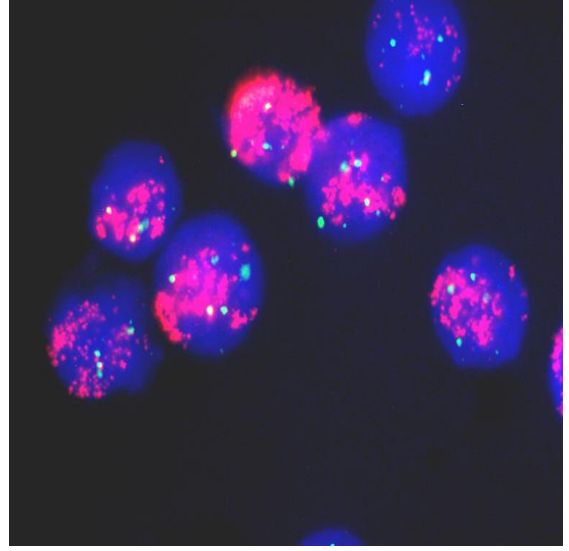


Şekil13:MHH-NB-11 hücre hattı FISH görüntü

-SIMA hücre hattında % 96,15 oranında 10`dan büyük kopya sayılı MYCN amplifikasyonu gözlemlendi.

FISH yöntemiyle MYCN lokusuna spesifik prob kullanılarak MHH-NB-11 hücre hattında kopya sayısı artışı floresan mikroskopta Macprob programında analiz edildi. Analiz sonucunda; 260 hücre çekirdeğinin % 96,15` in de 10` dan büyük yüksek kopya sayılı MYCN amplifikasyonu gözlemlendi. Nükleusların % 3,85`in de MYCN`nin 4-9 arasında kopya sayısının arttığı

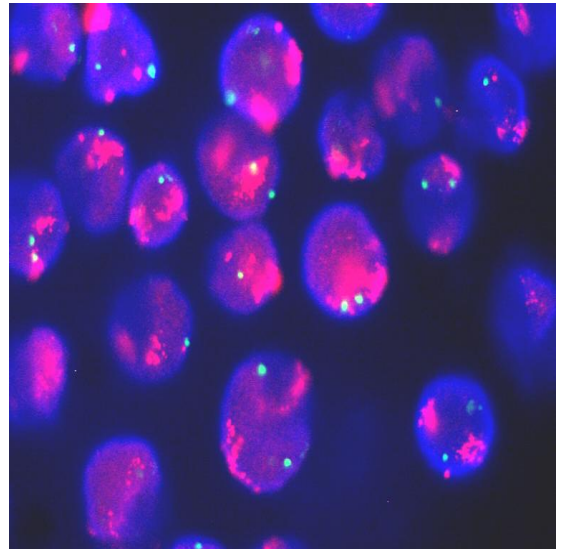
belirlendi.



Şekil 14: SIMA hücre hattına ait FISH görüntüsü.

-IMR32 hücre hattında hücre çekirdeklerinin tamamında 10`dan büyük kopya sayılı MYCN amplifikasyonu saptandı.

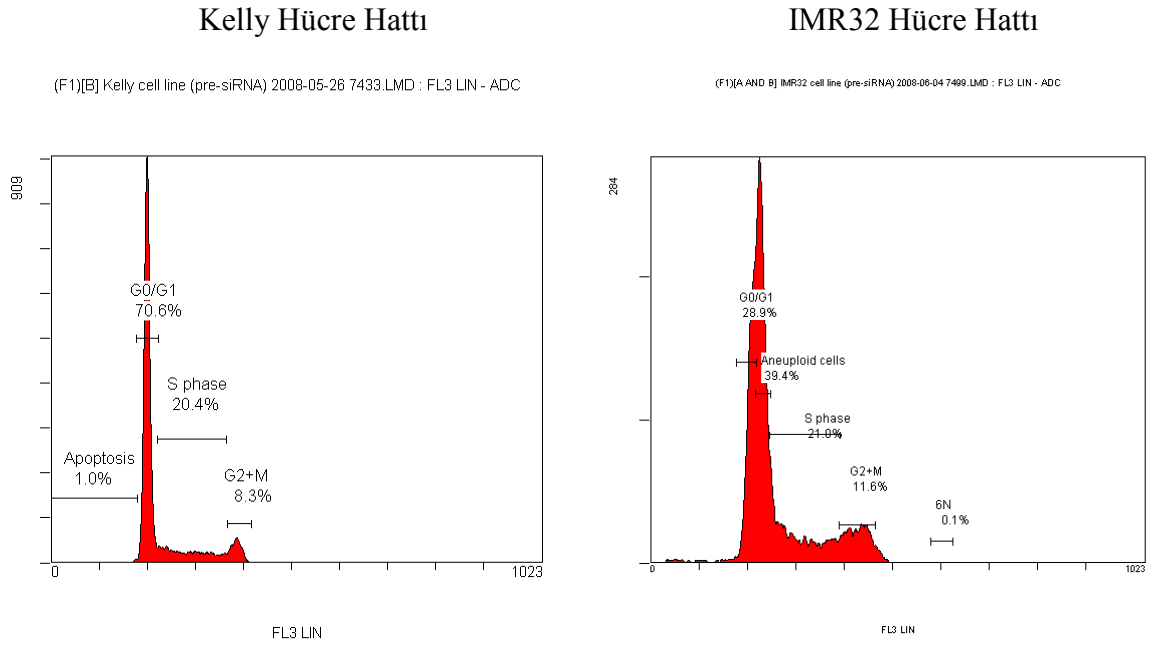
FISH yöntemiyle MYCN lokusuna spesifik floresan işaretli prob kullanılarak IMR32`de kopya sayısı artışı belirlendi. Floresan mikroskopta Macoprob programında analiz sonucunda; 260 hücre çekirdeğinin tamamında (%100)10`dan büyük yüksek kopya sayılı MYCN amplifikasyonu gözlemlendi.



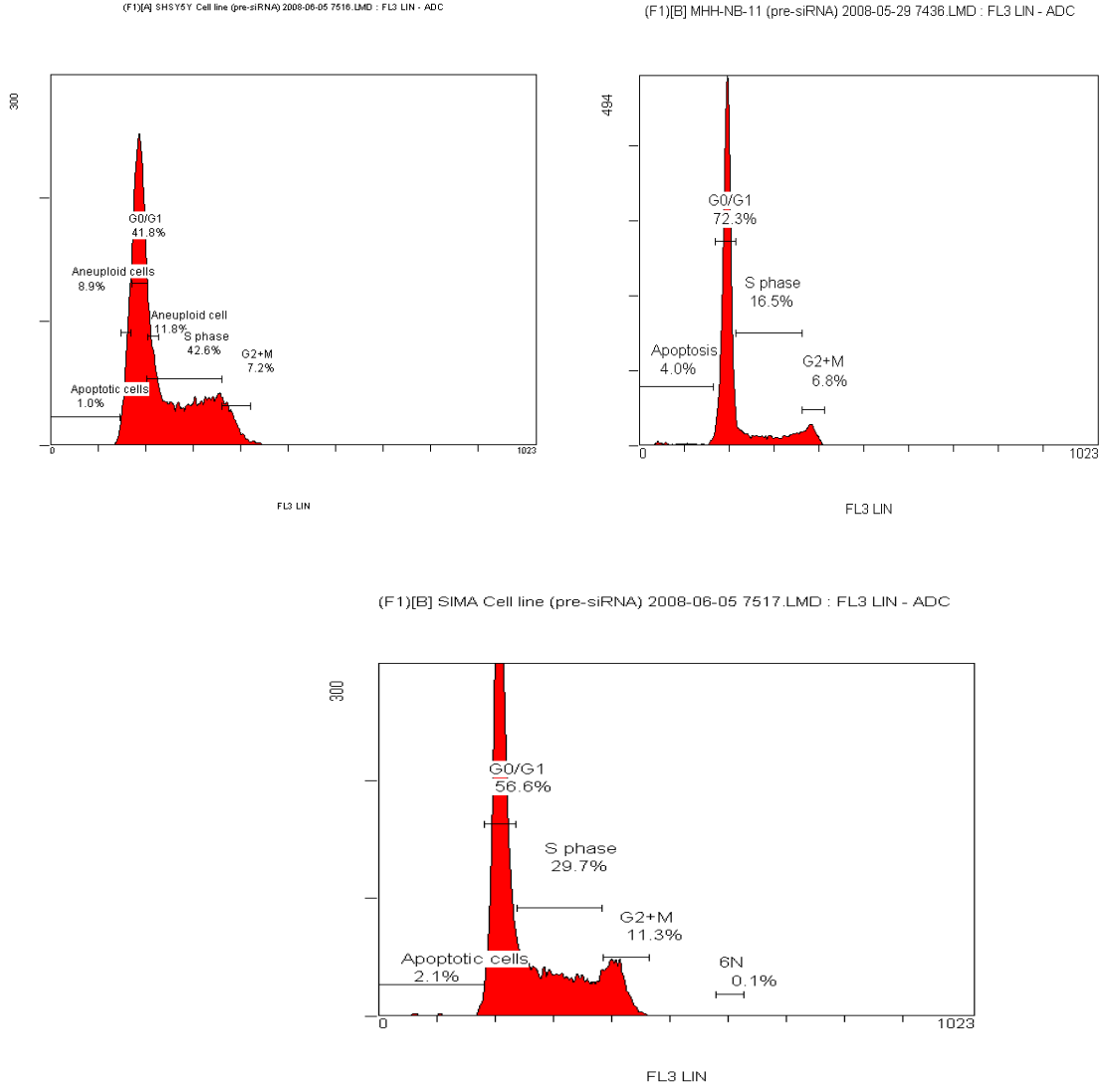
Şekil 15: IMR32 hücre hattına ait FISH görüntüsü.

4.4- Akım sitometrisi ile hücre siklus analizleri gerçekleştirildi.

Beş hücre hattında hücre siklus analizleri; Beckman Coulter kiti kullanılarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Laboratuvarında Uzm. Halil Ateş tarafından gerçekleştirildi. Şekil 16 ve 17` de beş hücre hattında belirli evrelerde bulunan hücrelerin yüzdeleri görülmektedir.



Şekil 16: Kelly ve IMR32 hücre hatlarına ait hücre siklus grafikleri.



Şekil 17: SH-SY5Y, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarına ait hücre siklus grafikleri.

Ayrıca tüm beş hücre hattına ait siklus grafiklerinde görülen evrelerin yüzdesel verileri Tablo 2`de de bir arada gösterildi.

Hücre Evreleri ve Yüzdeleri

Hücre Hatları	[G0/G1-Anöplöid]	S Faz	G2+M	6N	Apoptozis	
Kelly	%70,6	-	%20,4	%8,3	-	%1,0
IMR32	%28,9	%39,4	%21,0	%11,6	%0,1	%1,0
MHH-NB-11	%72,3	-	%16,5	%6,8	-	%4,0
SIMA	%56,6	-	%29,7	%11,3	%0,1	%2,1
SH-SY5Y	%41,8	%20,7	%42,6	%7,2	-	%1,0

Tablo2: Beş hücre hattında akım sitometrisi sonuçlarının analizleri gerçekleştirildi. Hücre döngüsünde evrelerin yüzdeleri belirlendi.

4.5-RNA susturulması öncesinde gerçek zamanlı PCR deneyleri ile gen ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları belirlendi.

-Beş nöroblastom hücre hattından cDNA` lar ve DNA` lar elde edildi.

Beş nöroblastom hücre hattında c-myb kümesinde yer alan transkripsiyon faktörlerinin ve diğer hCdt1, Geminin, SiklinA, Cdk2, p53, p21, p27'nin mRNA ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi için önce FastLane kiti ile cDNA` lar ekstrakte edildi. Bunun için sıvı nitrojendeki hücre hatlarından birer tüp yeniden çözülüp 24 kuyulu kültür plaklarına ekildi. Hücreler % 80 oranında plakları kapladığında cDNA` ları elde edildi. Her bir hücre hattından iki ayrı cDNA elde edildi. Bununla birlikte RNA susuturulması yapılan dört hücre hattında transfeksiyon öncesi bir kere daha yeniden cDNA` lar elde edildi. Ayrıca beş hücre hattından DNA` lar da ekstrakte edildi. DNA` lar gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi Fenol-Kloroform-İzoamilalkol kullanılarak hücre kültürlerinden elde edildi. Hücre hatları 75 cm² flasklarda % 80 oranında yüzeyi kapladığı zaman, DNA` lar elde edildi. ARLAB` da Carry WinUV spektrofotometre cihazında Carry 50

RNA Susturulması Öncesinde cDNA ve DNA Konsantrasyonları

cDNA									
HÜCRE HATTI ADI	A260 DEĞERİ			C (µg/ml)			SAFLIK DEĞERİ		
Kelly	1,8134	1,2765	1,8574	1450,72	1021,2	1485,92	1,7609	1,7295	1,7771
IMR32	1,4791	1,8845	1,9098	1183,28	1507,6	1527,84	1,7820	1,7634	1,7733
MHH	1,1968	1,7743	1,5576	957,44	1419,4	1246,08	1,8181	1,7639	1,7874
SIMA	1,7357	1,3331	2,0199	1388,56	1066,4	1615,92	1,7320	1,7350	1,7833
SHSY5Y	1,7099	1,5153	-	1367,92	1212,2	-	1,7564	1,7584	-
DNA									
Kelly	0,0333	0,4045	0,0540	49,95	202,25	81	1,9564	1,8270	1,7752
IMR32	0,0640	0,3238	0,0840	96	161,9	126	1,9536	1,8739	1,7616
MHH	0,0841	0,0527	0,0406	126,15	79,05	60,9	2,0135	1,7801	1,7875
SIMA	0,1999	0,0627	0,0623	199,9	94,05	93,45	1,7893	1,8232	1,7756
SHSY5Y	0,0573	0,0885	-	85,95	132,75	-	1,7185	1,7383	-

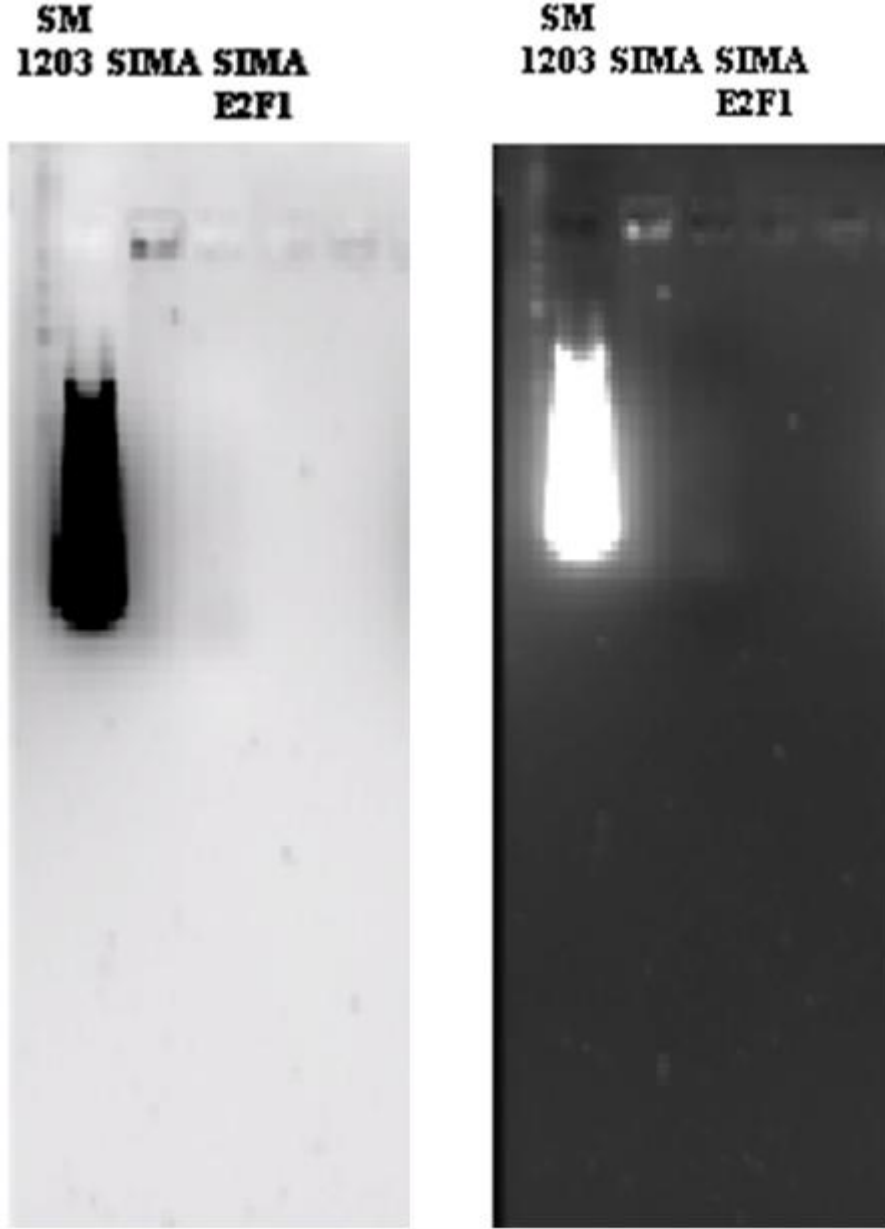
Tablo 3: Beş hücre hattında susturma öncesinde A260_{nm}'de absorbans, cDNA konsantrasyonları ve saflık değerleri ölçüldü.

DNA/RNA Conc programında 260 nm absorbansta konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Aynı örnekten üç ayrı ölçüm yapıldı. Üç ölçümün ortalaması alındı. Tablo 3` de tüm hücre hatlarına ait üç ayrı cDNA ve DNA`ların ortalama absorbans değerleri ve konsantrasyonları görülmektedir. Konsantrasyon değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

$$\text{cDNA için; } C (\mu\text{g/ml}) = \frac{A(260\text{nm})}{0,025} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

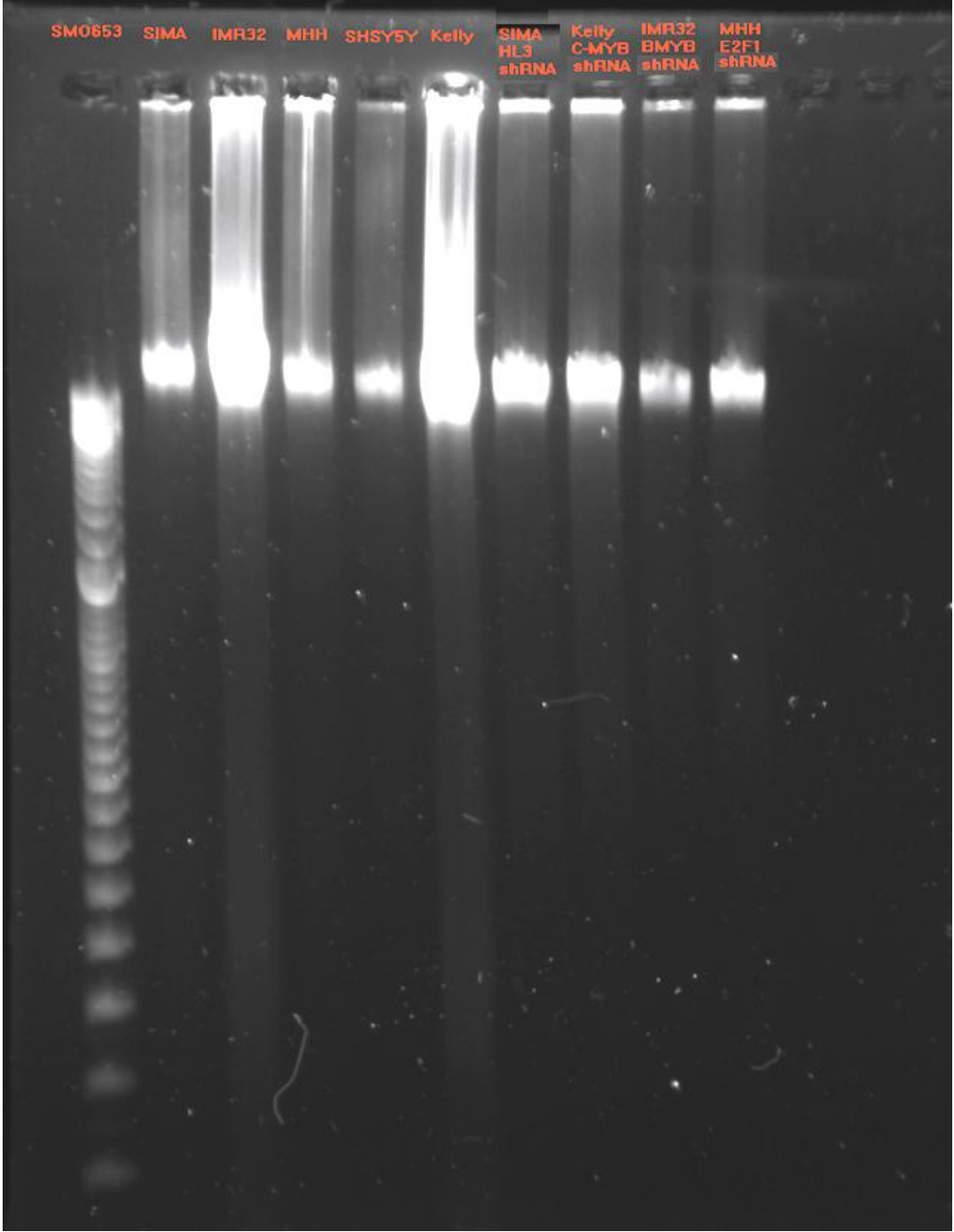
$$\text{DNA için; } C (\mu\text{g/ml}) = \frac{A(260\text{nm})}{0,020} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

-cDNA`lar % 2`lik agaroz jelde 50 Voltta 30 dakika yürütüldü (Şekil 18). 0,6 gram agaroz tartılarak 30 ml 1xTAE tamponu içinde mikrodalga fırında çözüldü. 2 µl sybergreen karışıma eklenerek karıştırıldı. Jel tankına döküldü.



Şekil 18: SIMA hücre hattından shRNA öncesinde ve E2F1 shRNA sonrasında elde edilen cDNA`ların negatif ve pozitif görüntüsü. Marker yanındaki 1 ve 2. kuyularda cDNA yayıntısı (smear) şeklinde görülmektedir. Marker: Fermentas SM1203, 25 bp.

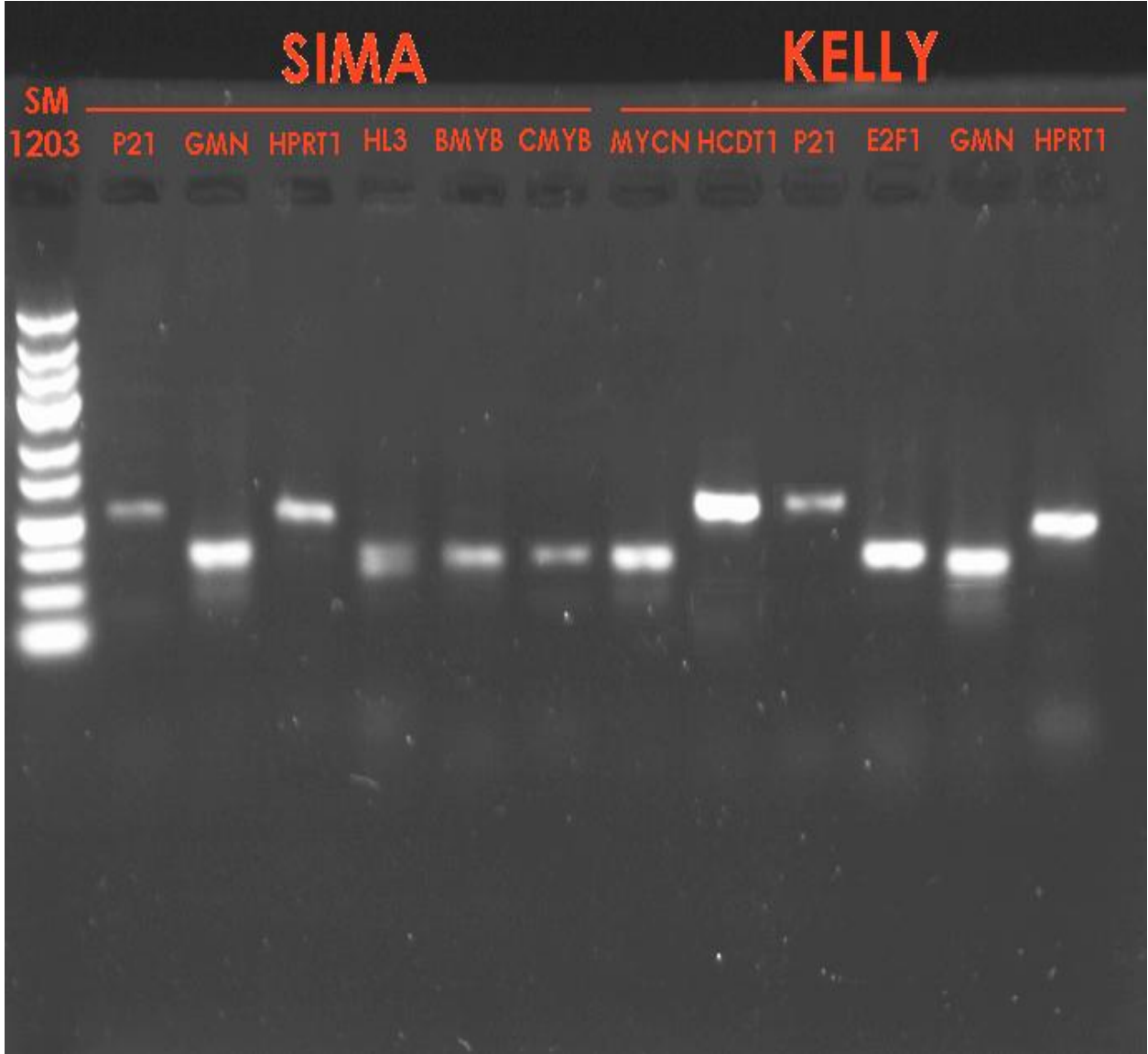
-DNA'lar %1` lik agaroz jelde 1 saat 80 voltta yürütüldü (Şekil 19). 0,3 gram agaroz tartılarak 30 ml 1xTAE tamponu içinde mikrodalga fırında çözüldü. Karışıma 2 mikrolitre sybergreen eklendi ve jel tankına döküldü.



Şekil 19: RNA susturulmasından önce ve sonra hücre hatlarından elde edilen DNA' lara ait görüntü. Marker: Fermentas SMO653, 100 bp+500 bp.

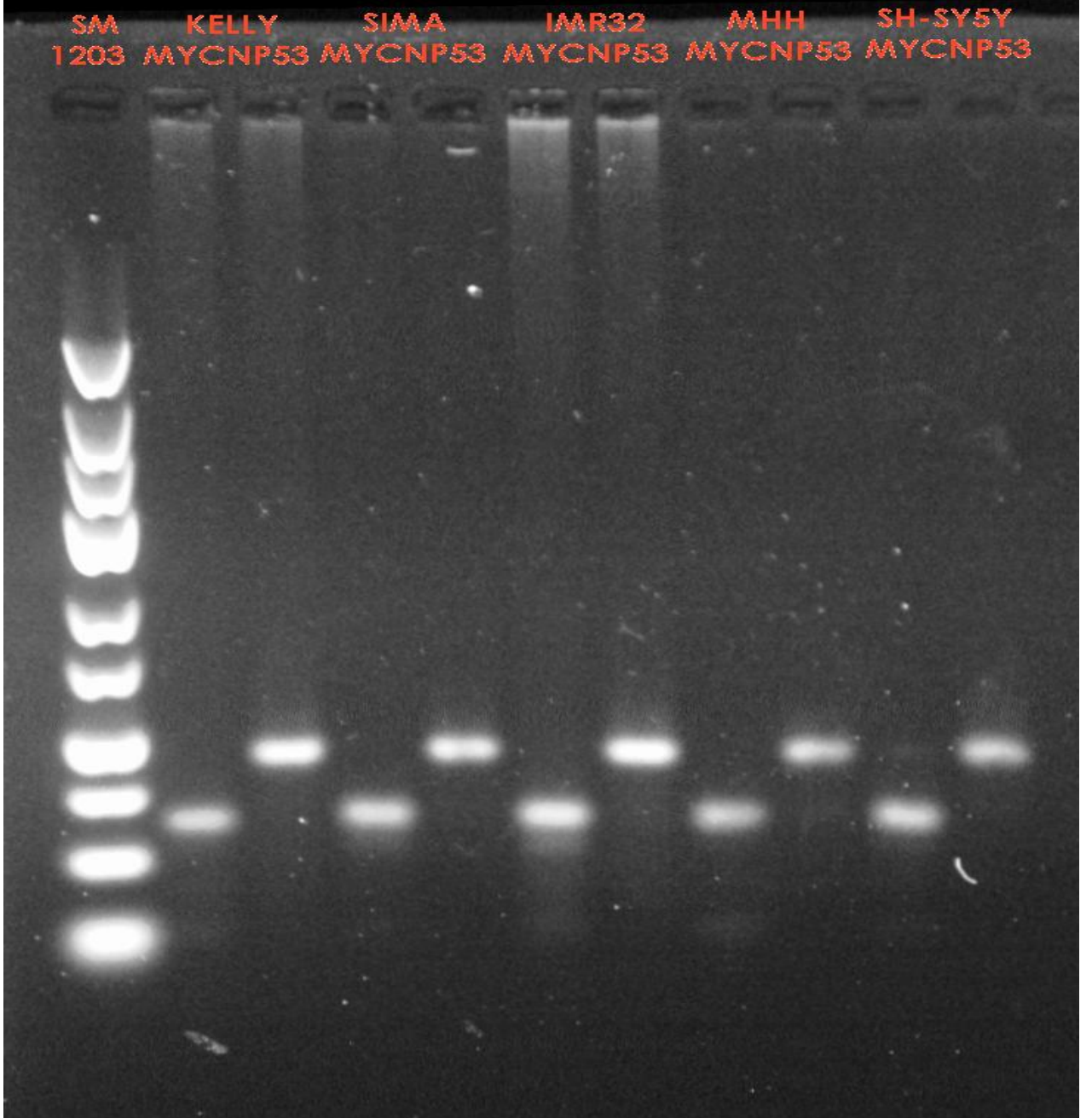
-Gerçek zamanlı PCR deneylerinde tüm genlere ait Cp ve PCR etkinlik katsayıları belirlendi.

Tüm hücre hatlarında kontrol geni ile birlikte toplam 16 genin ekspresyonuna bakıldı. Şekil 20`de SIMA ve Kelly hücre hatlarına ait cDNA örneklerinin gerçek zamanlı PCR ürünlerinin % 2`lik agaroz jelde yürütülmesinden sonra elde edilen görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 20: RNA susturulmasından önce SIMA ve Kelly` de gerçek zamanlı PCR ürünlerinin % 2`lik agaroz jelde yürütülmesinden sonra elde edilen jel görüntüsü. 1. kuyu: Marker, 2-7 kuyu: SIMA`ya ait p21, Geminin, HPRT1, HL3MBTL, b-myb, c-myb. 8-13 kuyu: Kelly` ye ait MYCN, HCDT1, p21, E2F1, Geminin, HPRT1. Marker: Fermentas SM 1203, 25 bp.

Ayrıca MYCN ile p53 DNA kopya sayıları da gerçek zamanlı PCR deneyleriyle saptandı. Şekil 21` de beş hücre hattına ait genomik DNA örneklerinin gerçek zamanlı PCR ürünlerinin % 2` lik agaroz jel de yürütülmesinden sonra elde edilen görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 21: RNA susturulmasından önce beş hücre hatlarına ait genomik DNA örneklerinin gerçek zamanlı PCR ürünlerinin % 2`lik agaroz jelde yürütülmesinden sonra elde edilen görüntü. 1. kuyu: Marker, 2-11 kuyu: Kelly, SIMA, IMR32, MHH-NB-11 ve SH-SY5Y` ye ait MYCN ve p53. Marker: Fermentas SM 1203, 25 bp.

Gerçek zamanlı PCR deneyleri Roche Universal Taqman probe ve primer çiftleriyle gerçekleştirildi. Universal probe library (UPL) problemlerinin ve o problemlere özgül primer çiftlerinin dizaynı Roche` un online web sayfası üzerinden yapıldı. Tablo 1` de dizayn edilen prob ve primer dizilerinin DNA baz sırası verildi.

Tüm beş hücre hattında gerçek zamanlı PCR deneylerinin ilk aşamasında Taqman kitinin hazır 5xMaster solüsyonu ile DNA polimeraz enzimi karıştırılıp PCR profilleri standardize edildi. Materyel metotta anlatıldığı gibi bu karışımların içine probe ve primer çiftleri ile birlikte kalıp (template) eklendi ve Lightcycler 2.0 cihazına yüklendi. Lightcycler 2.0 cihazından deney sonunda elde edilen floresan değerler LinReg PCR programına yüklendi. Bu program ile her bir gene ait PCR amplifikasyon etkinlik değerleri (E) hesaplandı. Tüm genler için elde edilen Cp değerleri ve PCR etkinlik katsayıları (E) Tablo 4` de gösterildi. Bu deneylerde tüm gerçek zamanlı PCR reaksiyonları üç kere tekrarlandı. Buna rağmen uyumsuz çıkan sonuçlar için deneyler yinelenildi.

HPRT1 referans geni dahil 16 genin ekspresyonlarının incelendiği cDNA ile MYCN/p53 genlerinin kopya sayısı oranının belirlendiği DNA örnekleri için elde edilen Cp ve E değerlerinin ortalamaları alındı. Tablo 4`de RNA susturulması öncesinde her bir hücre hattında mRNA ekspresyon düzeyi incelenen 16 gene ve genomik DNA kopya sayıları belirlenen MYCN ile p53 genlerine ait Cp, E ve R değerleri gösterildi. Her bir hedef genin ekspresyonunun referans HPRT1`e göre ve MYCN genomik DNA kopya sayısının referans p53`e göre katları (R) ortalama değerler üzerinden gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi hesaplandı. Her bir hücre hattı için MYCN geninin p53 referans genine göre DNA kopya sayısının kaç kat arttığı Tablo 4`de son sütunda verildi.

Hücre Hatlarında shRNA Öncesinde 15 Gen +HPRT1 Kontrol mRNA Ekspresyon ve MYCN/p53 Genomik DNA Kopya Sayısı Oranları

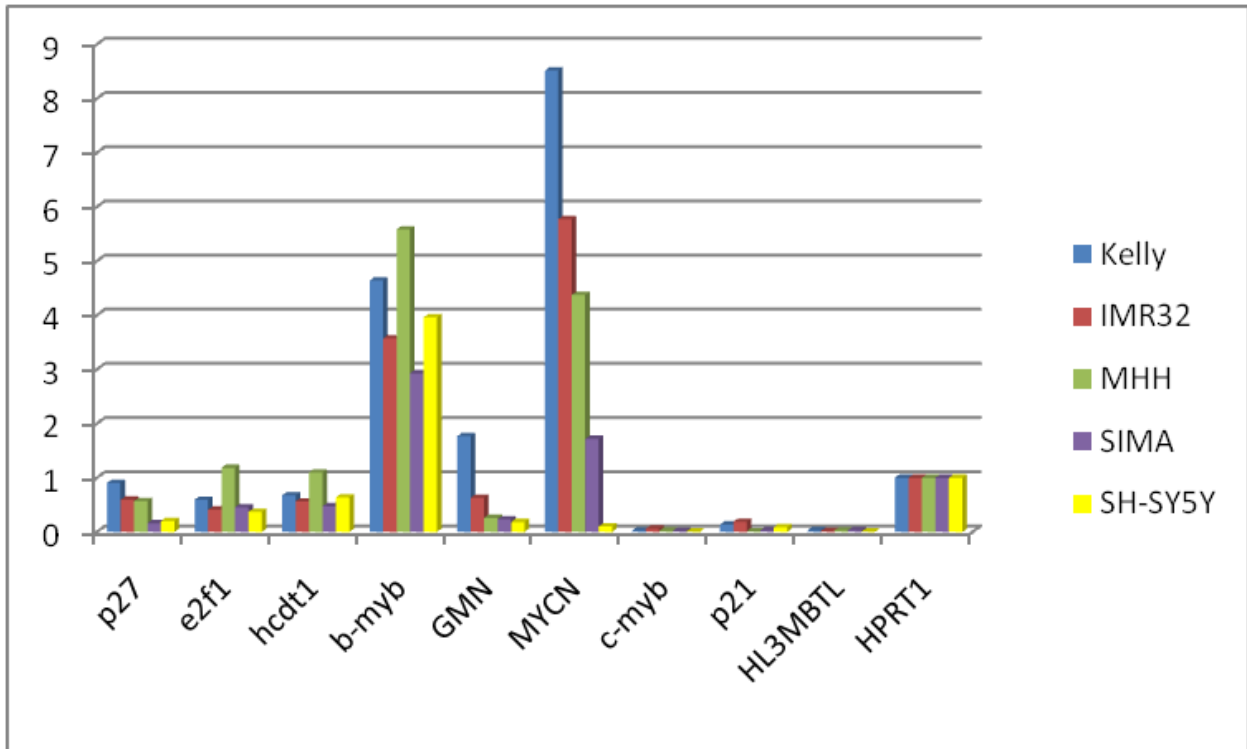
HHAT	P27	AMYB	E2F1	HCDT1	P53	BMYB	CDK2	GMN
KELLY	CP:29,96 E:1,481 R:0,9028	-	CP:30,62 E:1,478 R:0,5926	CP:30,37 E:1,634 R:0,6761	-	CP:27,4 E:1,483 R:4,6402	CP:31,15 E:1,428 R:0,4319	CP:28,94 E:1,559 R:1,7692
IMR32	CP:30,73 E:1,618 R:0,5938	-	CP:31,43 E:1,406 R:0,4100	CP:30,78 E:1,704 R:0,5622	CP:>40 E:1,218 R:0,0044	CP:27,82 E:1,392 R:3,5713	CP:31,12 E:1,7 R:0,4447	CP:30,84 E:1,152 R:0,6312
MHH-NB-11	CP:31,89 E:1,617 R:0,5695	-	CP:30,81 E:1,405 R:1,1844	CP:30,95 E:1,675 R:1,0970	-	CP:28,39 E:1,442 R:5,5817	CP:33,04 E:1,291 R:0,3155	CP:33,54 E:1,177 R:0,2594
SIMA	CP:32,39 E:1,611 R:0,1580	-	CP:31,05 E:1,329 R:0,4544	CP:30,83 E:1,588 R:0,4738	-	CP:28,07 E:1,426 R:2,9269	CP:32,77 E:1,444 R:0,1424	CP:31,88 E:1,578 R:0,2307
SH-SY5Y	CP:33,64 E:1,570 R:0,2020	-	CP:32,88 E:1,407 R:0,3684	CP:31,97 E:1,513 R:0,6372	-	CP:28,94 E:1,282 R:3,9603	CP:33,10 E:1,331 R:0,3360	CP:34,04 E:1,384 R:0,1815
HHAT	MYCN	CMYB	E2F2	P21	HL3MBTL	SİKLİNA	HPRT1	MYCN/ P53
KELLY	CP:26,77 E:1,702 R:8,5157	CP:35,59 E:1,442 R:0,0266	-	CP:33,27 E:1,292 R:0,1351	CP:35,62 E:1,382 R:0,0292	CP:37,84 E:1,314 R:0,0091	CP:29,8 E:1,656 R:1,00	CP:23,70/ 34,24 E:1,542/ 1,536 R:1519,75
IMR32	CP:27,41 E:1,692 R:5,7724	CP:34,61 E:1,427 R:0,0585	-	CP:32,71 E:1,429 R:0,1859	CP:36,76 E:1,389 R:0,0171	CP:33,19 E:1,134 R:0,1912	CP:29,95 E:1,702 R:1,00	CP:26,38/ 35,27 E:1,638/ 1,593 R:537,29
MHH-NB-11	CP:29,02 E:1,687 R:4,3746	CP:37,18 E:1,403 R:0,0219	-	CP:37,86 E:1,476 R:0,0121	CP:37,17 E:1,312 R:0,0265	CP:35,40 E:1,296 R:0,0780	CP:31,08 E:1,611 R:1,00	CP:25,67/ 36,61 E:1,608/ 1,575 R:2201,20
SIMA	CP:29,00 E:1,683 R:1,7172	CP:36,10 E:1,366 R:0,0196	-	CP:35,97 E:1,212 R:0,0296	CP:36,06 E:1,173 R:0,0307	-	CP:29,75 E:1,593 R:1,00	Cp:24,92/ 31,81 E:1,612/ 1,535 R:140,64
SH-SY5Y	CP:34,84 E:1,454 R:0,1018	CP:>40 E:1,234 R:0,0070	-	CP:35,45 E:1,296 R:0,0857	CP:>40 E:1,329 R:0,0052	-	CP:31,29 E:1,61 R:1,00	Cp:29,44/ 28,78 E:1,286/ 1,330 R:0,63

Tablo 4: RNA susturulması öncesinde beş hücre hattında 15 gen ve kontrol HPRT1' e ait Cp, E ve R değerleri. Ayrıca son sütunda MYCN/p53 genomik DNA kopya sayılarının oramda verildi. Negatif kontroller için su kullanıldı. Pozitif kontrol için Kelly hücre hattının cDNA ve DNA örneklerinde HPRT1 ekspresyonu ile MYCN/p53 kopya sayısı oranları belirlendi.

Sonuçlarda; tüm hücre hatlarında A-MYB ve E2F2 ekspresyonu gözlenmedi. P53 ise sadece IMR32 de Cp:>40 (R:0,0044) olarak düşük düzeyde belirlendi. Siklin A ekspresyonu SH-SY5Y ve SIMA` da gözlenmezken Kelly` de Cp:37.84 (R:0,0091), MHH-NB-11` de Cp:35.40 (R:0,0780), IMR32 ` de ise Cp:33.19 (R:0,1912) olarak saptandı.

Tüm hücre hatlarında, ekspresyonu gözlenen dokuz gen (p27, E2F1, hCdt1, b-myb, Geminin, MYCN, c-myb, p21, HL3MBTL) ve bir referans (HPRT1) genine ait ekspresyon katları birbiriyle karşılaştırılarak incelendi (Şekil 22).

Beş Hücre Hattında Gen Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması

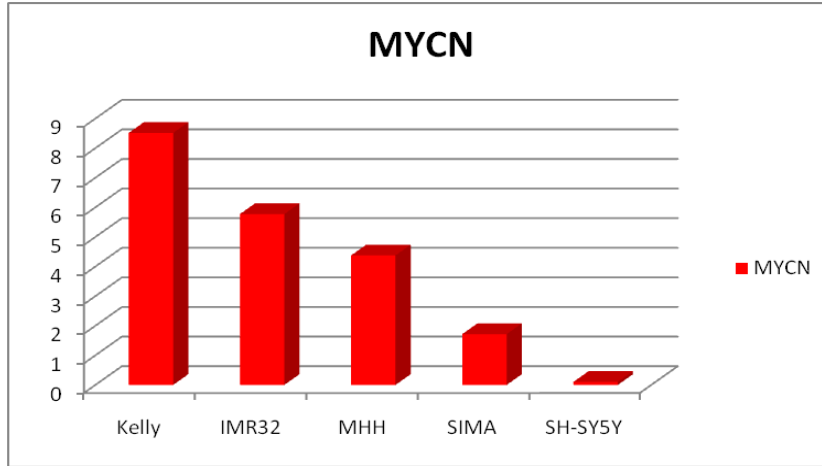


Şekil 22 : Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y hücre hatlarında p27, E2F1, hCdt1, b-myb, Geminin, MYCN, c-myb, p21, HL3MBTL ile referans HPRT1 genlerine ait ekspresyon katları.

Elde edilen gerçek zamanlı PCR deneylerinin sonucuna göre, MYCN geni amplifiye olan Kelly, IMR32, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarında en yüksek oranda eksprese olan genler, MYCN ve b-myb` dir. Ayrıca b-myb, MYCN kopya sayısı 2-3 olan SH-SY5Y için en yüksek

oranda eksprese olan genlerdir. SH-SY5Y` de MYCN ekspresyonu ise diğer hücre hatlarına göre daha düşük düzeyde bulundu (Şekil 23).

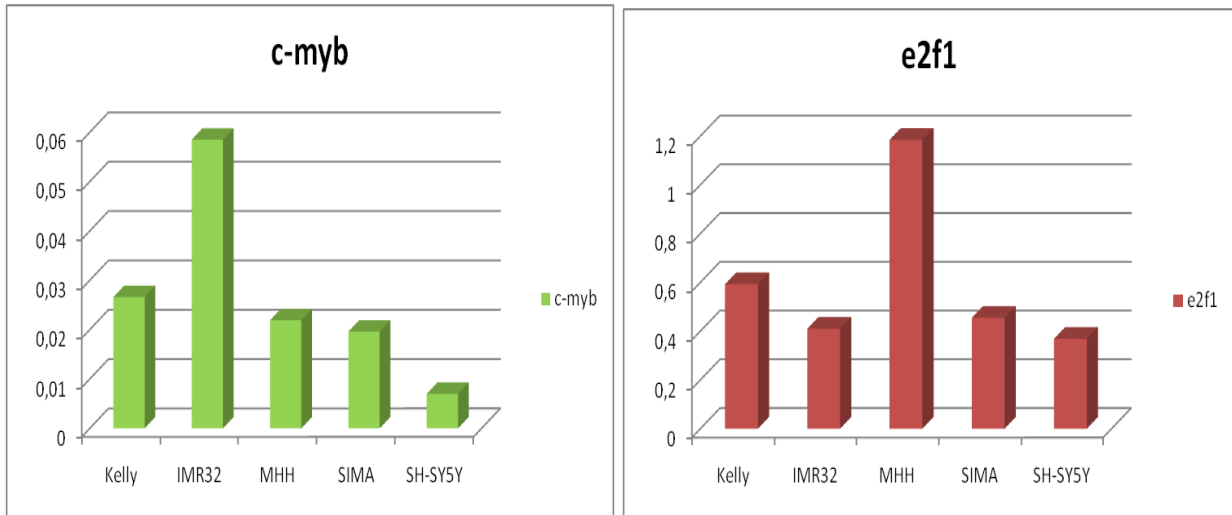
Beş Hücre Hattında MYCN Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



Şekil 23: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Diğer taraftan, Drosophila chorion amplifikasyonunu indükleyen kümede yer alan MYB ve E2F1 proteinlerinin insan ortoloğu olan diğer C-MYB ve E2F1 genlerinin tüm beş hücre hattında

Beş Hücre Hattında c-myb ve E2F1 Genlerinin Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



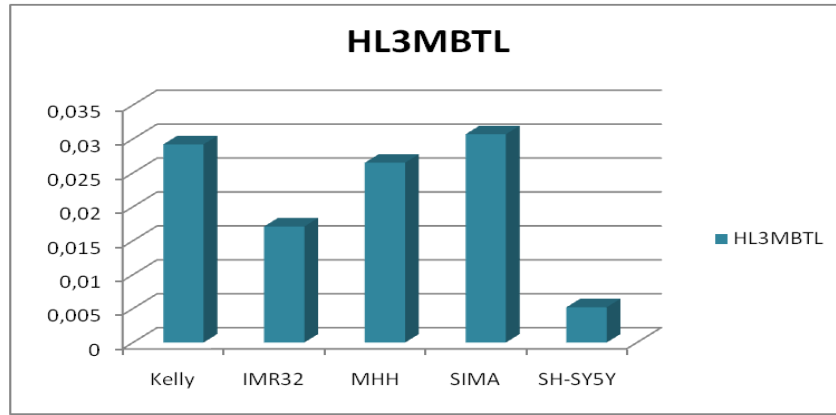
Şekil 24: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de c-myb ile E2F1 ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının c-myb ve E2F1`e ait ekspresyon katları görülmektedir.

da eksprese olduğu görüldü. Bununla birlikte SH-SY5Y` de hem c-myb (Cp:>40, R: 0,0070)

hem de E2F1 (Cp:32,88, R:0,3684) diğer dört hücre hattına göre daha düşük düzeyde eksprese oldular (Şekil 24).

Sonuçlarda beş nöroblastom hücre hattında, Drosophila chorion amplifikasyonunu baskılayan kümede yer alan L3MBTL geninin insan ortoloğu olan HL3MBTL`de de ekspresyon gözlemlendi. HL3MBTL SH-SY5Y (R:0,0052)` de daha düşük düzeyde eksprese oldu (Şekil 25).

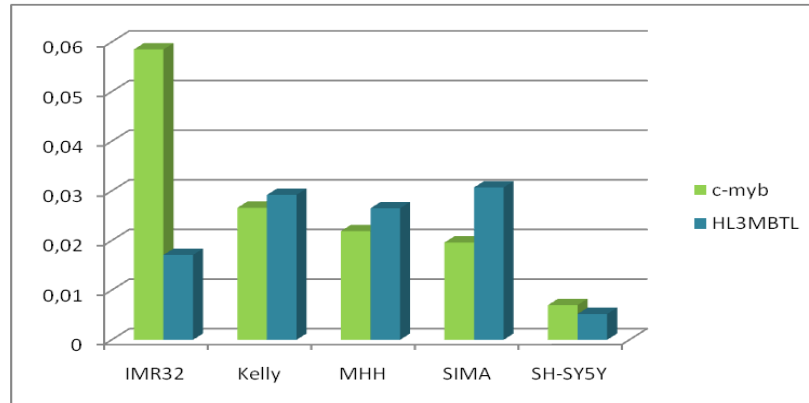
Beş Hücre Hattında HL3MBTL Geninin Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



Şekil 25: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de HL3MBTL ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının HL3MBTL genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

MYCN amplifiye hücre hatlarında MHH-NB-11 hariç, c-myb ekspresyonu azalırken HL3MBTL`de bir artış görüldü (Şekil 26).

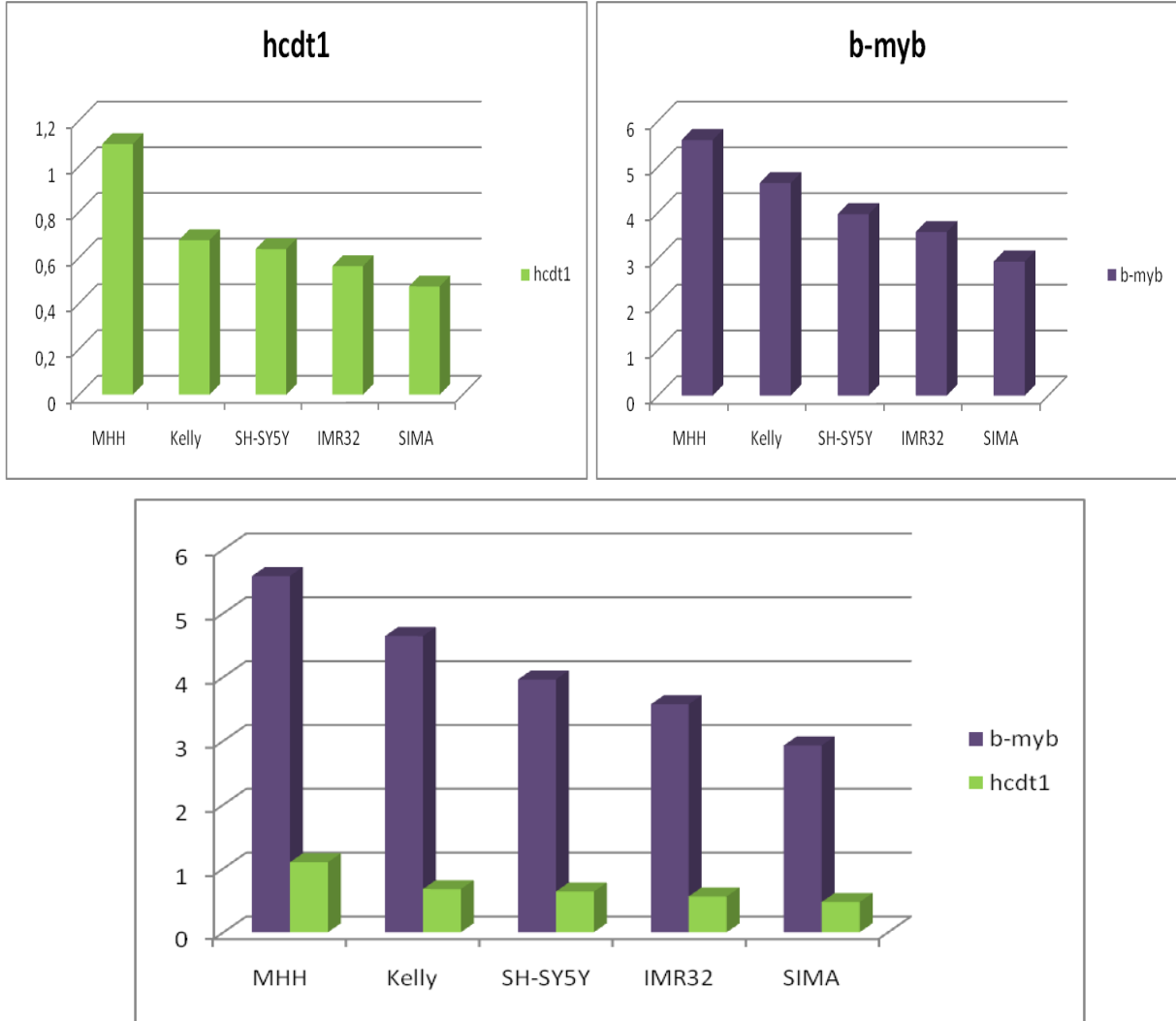
Beş Hücre Hattında HL3MBTL ve c-myb Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



Şekil 26: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de HL3MBTL ile c-myb ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının HL3MBTL ve c-myb`ye ait ekspresyon katları görülmektedir.

Ayrıca tüm beş hücre hattında hCdt1 geni ekspresyonunda saptandı. HCdt1 en yüksek MHH - NB-11 (R:1,0970) ` de eksprese olurken SIMA (R:0,4738) ` da en düşük düzeyde eksprese oldu. Diğer taraftan, beş hücre hattında hCdt1 ekspresyonu azalırken b-myb ekspresyonlarının da azaldığı görüldü (Şekil 27).

Beş Hücre Hattında hCdt1 ve b-myb Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması

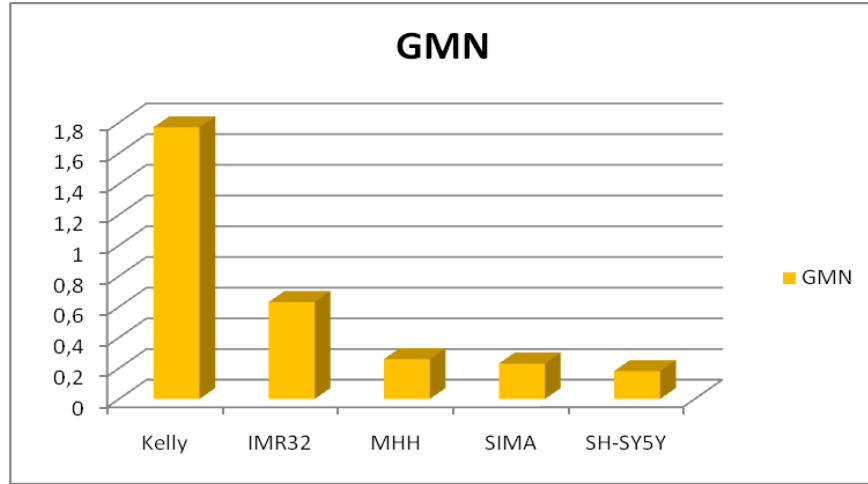


Şekil 27: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de hCdt1 ile b-myb ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının hCdt1 ve b-myb genlerine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Tüm beş hücre hattında CDK2 ekspresyonu gözlemlendi. CDK2`nin SIMA (R:0,1424) ` da en düşük düzeyde eksprese olduğu görüldü. Sonuçlara bakıldığında; beş hücre hattında geminin

ekspresyonunda görülmektedir (Şekil 28). Bununla birlikte SH-SY5Y (R:0,1815) de diğer hücre hatlarına göre Geminin ekspresyonu daha az düzeyde görüldü.

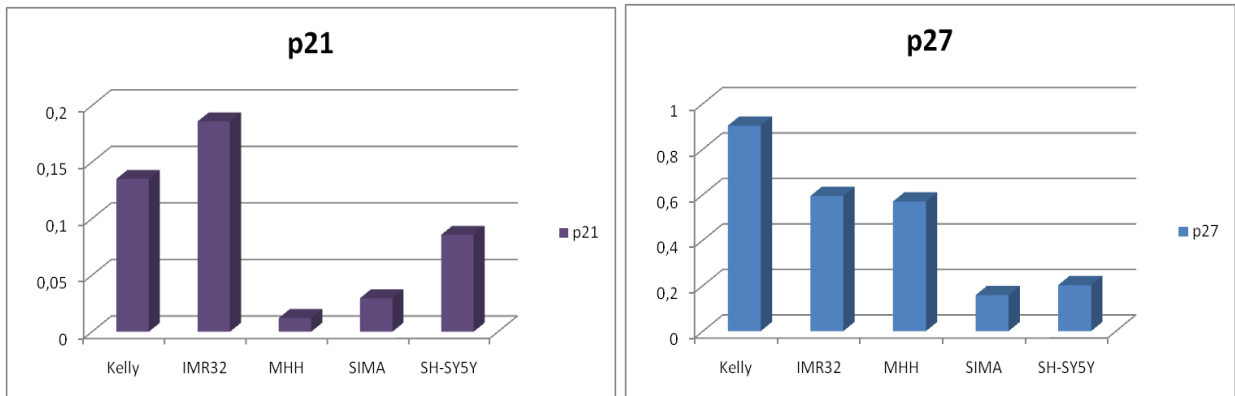
Beş Hücre Hattında Geminin Geninin Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



Şekil 28 : Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de Geminin ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının Geminin genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Ayrıca tüm beş hücre hattında p21 ve p27 ekspresyonlarında gözlenmektedir. MHH-NB-11 (R:0,0121) de p21 ekspresyon düzeyi en azdır. SIMA (R:0,1580) da ise p27 diğer hücre hatlarına göre daha az eksprese oldu (Şekil 29).

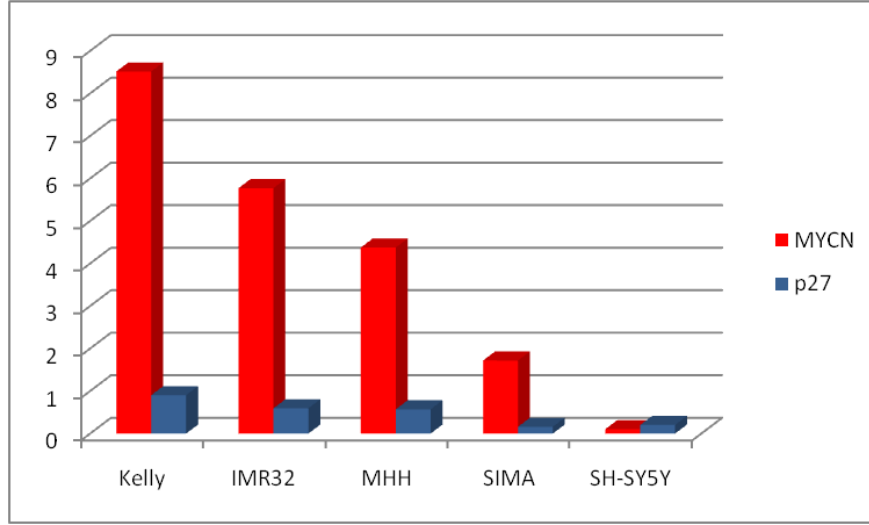
Beş Hücre Hattında p21 ve p27 Genlerinin Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



Şekil 29: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de p21 ile p27 ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının p21 ve p27 genine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Ayrıca, MYCN amplifiye hücre hatlarında MYCN ekspresyonu azalırken p27 ekspresyonları da azaldı (Şekil 30).

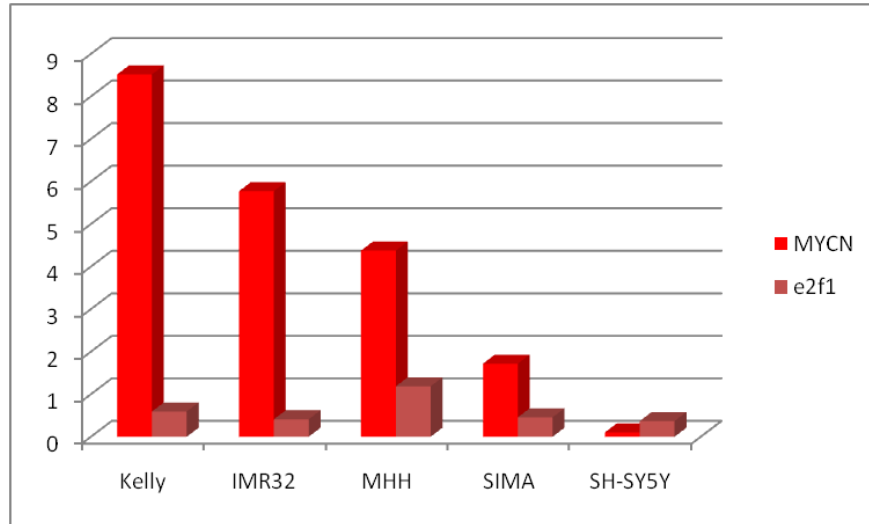
Beş Hücre Hattında MYCN ve p27 Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması



Şekil 30: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN ile p27 ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN ve p27 genlerine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Ayrıca, MHH-NB-11 ve SIMA hariç diğer üç hücre hattında E2F1 ve MYCN ekspresyonlarında da paralel bir düşüş gözlemlendi (Şekil 31).

Beş Hücre Hattında MYCN ve E2F1 Ekspresyon Katlarının Karşılaştırılması

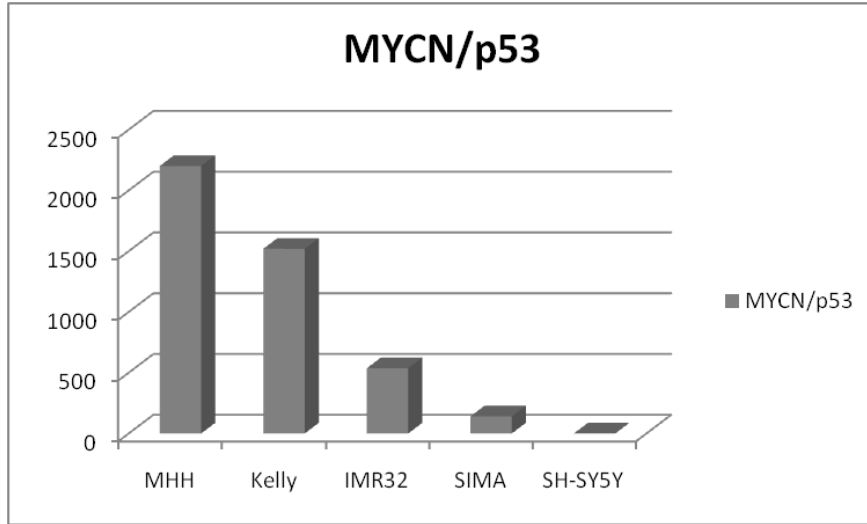


Şekil 31: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN ile E2F1 ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN ve E2F1 genlerine ait ekspresyon katları görülmektedir.

Tablo 4`de son sütunda görüldüğü gibi, tüm beş hücre hattında RNA susturulması öncesinde MYCN ve p53 genomik DNA kopya sayılarının birbirine göre oranları da verildi

(Şekil 32). SH-SY5Y`de MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranının diğer MYCN amplifiye hücre hatlarına göre daha az seviyede olduğu belirlendi.

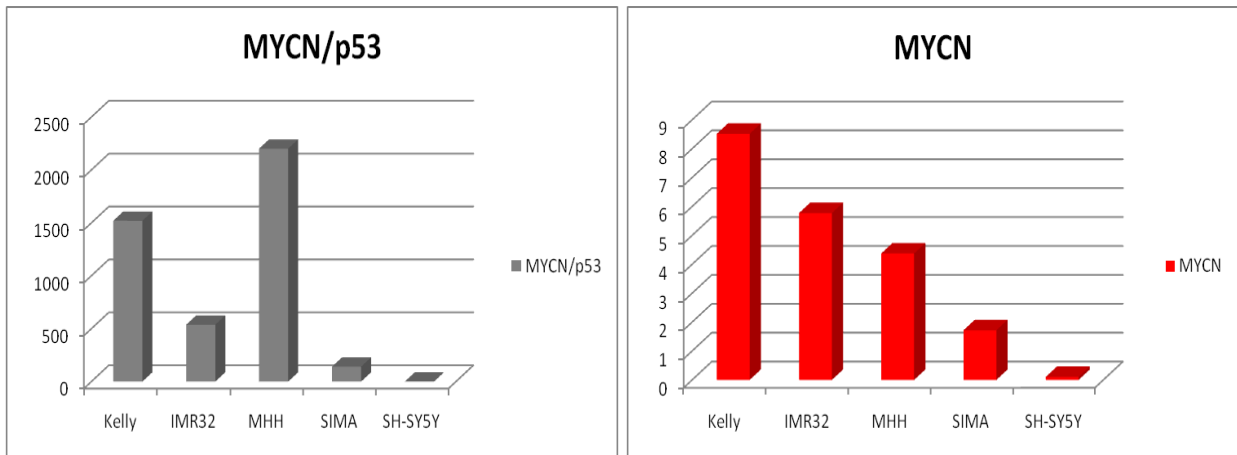
Beş Hücre Hattında MYCN/p53 DNA Kopya Sayısı Oranlarının Karşılaştırılması



Şekil 32: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları görülmektedir.

Sonuçlar dikkate alındığında; MHH-NB-11 hariç, MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı azalırken MYCN ekspresyonunda da bir azalma görüldü (Şekil 33).

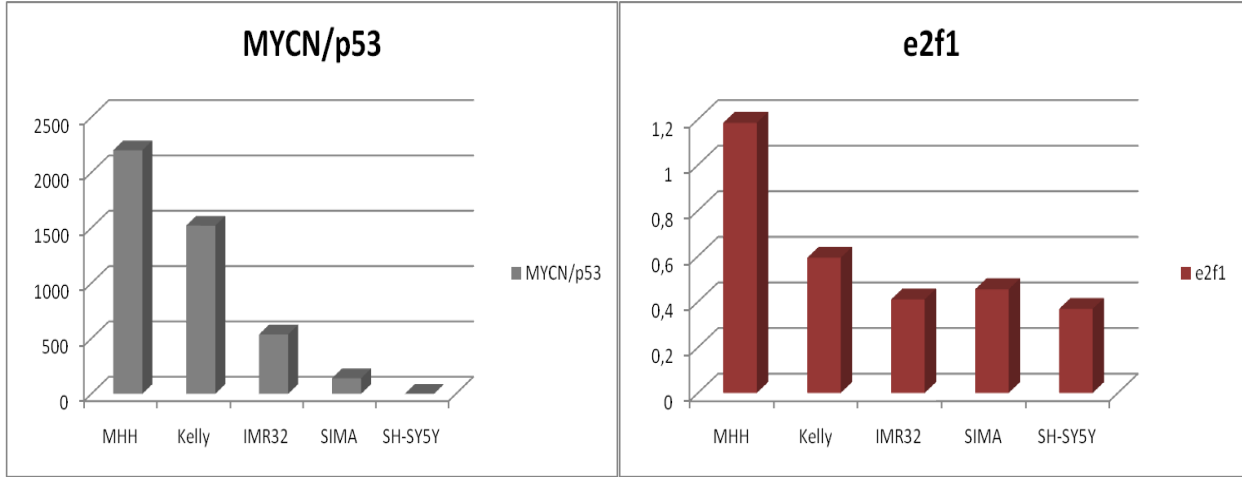
Beş Hücre Hattında MYCN/p53 Genomik DNA Kopya Sayısı Oranının ve MYCN Ekspresyonunun Karşılaştırılması



Şekil 33: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları ile MYCN ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları ve MYCN ekspresyon katları görülmektedir.

Bununla birlikte; SIMA hariç, MYCN DNA kopya sayısı azalırken E2F1 ekspresyonunda da bir azalma görüldü (Şekil 34).

Beş Hücre Hattında MYCN/p53 Genomik DNA Kopya Sayısı Oranının ve E2F1 Ekspresyonunun Karşılaştırılması



Şekil 34: Kelly, IMR32, MHH-NB-11, SIMA ve SH-SY5Y`de MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları ile E2F1 ekspresyonu. Y ekseninde hücre hatlarının MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları ve E2F1 ekspresyon katları görülmektedir.

Tüm beş hücre hattında MYCN/p53 DNA PCR amplifikasyon etkinlik (E) değerleri LinReg PCR programında hesaplandı. Kelly ve SIMA`da ayrıca iki kat başlangıç konsantrasyonları dilüe edilerek gerçek zamanlı PCR deneyleri kuruldu. Bunun için 2, 4, 8, 16

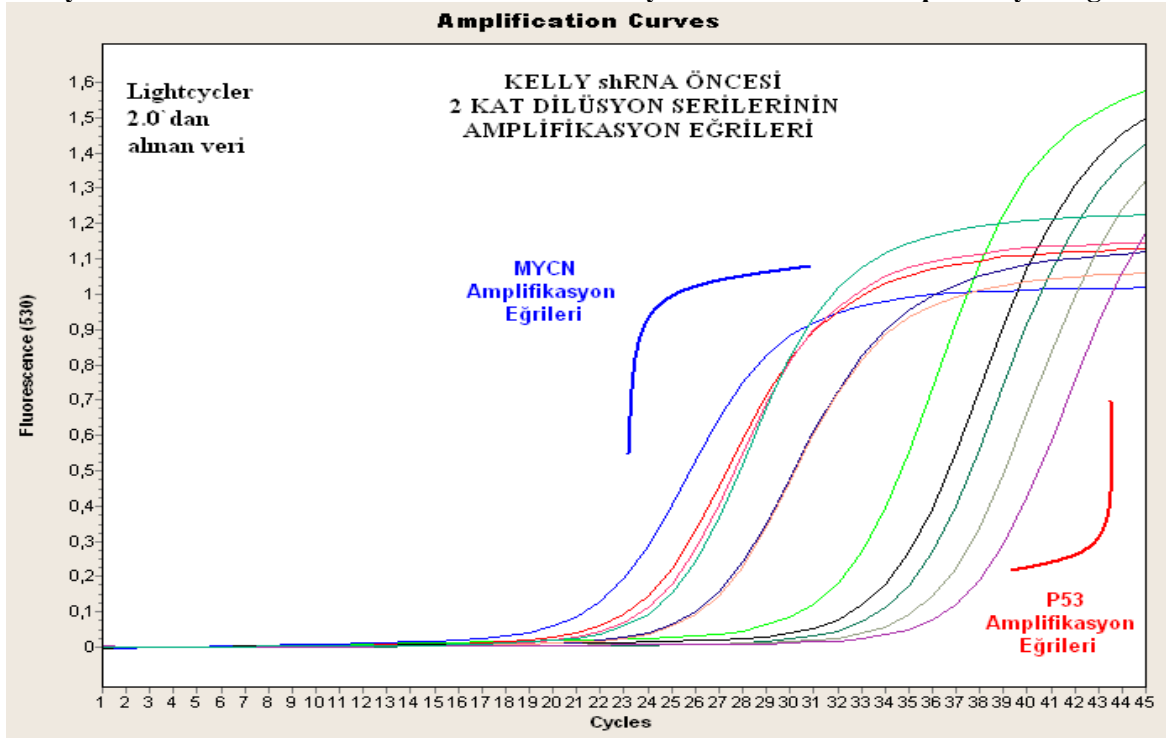
Kelly`de 2 kat seri dilüsyonlardan elde edilen Cp değerleri

Lightcycler 2.0- Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları				
İki Kat dilüsyon Serisi				
Sıra	Hücre hattı-Dönem	Baş. Kons.	Gen Adı	Cp
1	Kelly shRNA-Önce	DNA-32ng	MYCN	21,07
2	Kelly shRNA-Önce	DNA-32ng	p53	31,48
3	Kelly shRNA-Önce	DNA-16ng	MYCN	22,82
4	Kelly shRNA-Önce	DNA-16ng	p53	33,34
5	Kelly shRNA-Önce	DNA-8ng	MYCN	23,32
6	Kelly shRNA-Önce	DNA-8ng	p53	34,13
7	Kelly shRNA-Önce	DNA-4ng	MYCN	25,63
8	Kelly shRNA-Önce	DNA-4ng	p53	35,51
9	Kelly shRNA-Önce	DNA-2ng	MYCN	25,68
10	Kelly shRNA-Önce	DNA-2ng	p53	36,75

Tablo 5: RNA susturulması öncesinde Kelly hücre hattında DNA örneğinde iki kat seri dilüsyonların sonuçları.

ve 32 nanogram başlangıç konsantrasyonlarında DNA örnekleri Lightcycler 2.0 cihazına yüklen-
di. Tablo 5`de Lightcycler 2.0`dan alınan Cp değerleri gösterildi. Ayrıca Şekil 35`de Kelly hücre
hattına ait MYCN ve p53 DNA PCR amplifikasyon eğrileri görülmektedir.

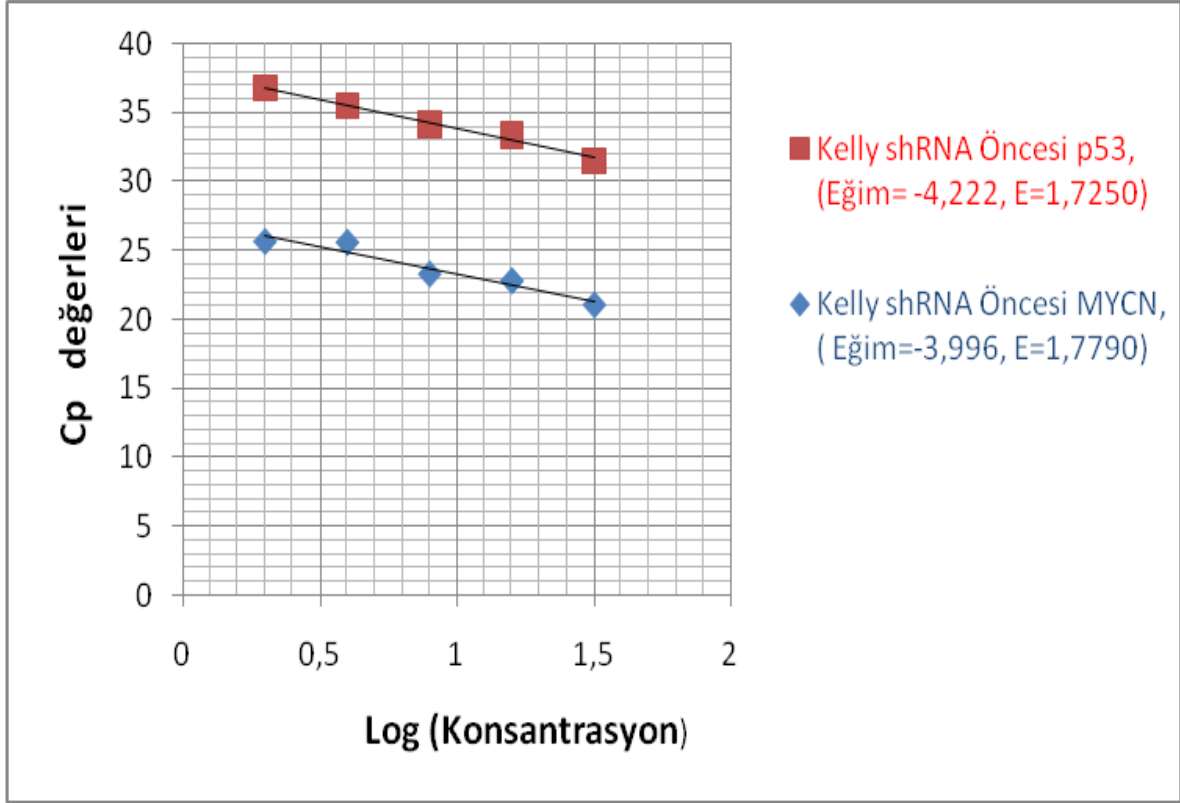
Kelly Hücre Hattında shRNA Öncesi İki Kat Dilüsyon Serilerine Ait Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 35: Kelly hücre hattında shRNA öncesi çalışılmış genomik DNA örneklerinde 2 kat dilüsyon serilerinde MYCN ve p53 genlerinin PCR amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterilmiştir.

Diğer taraftan dilüsyon serilerinin Cp değerleri elde edildikten sonra, DNA örneklerinin başlangıç konsantrasyon değerlerinin logaritmik verileri ile MYCN ve p53 genlerinin Cp değerleri arasında grafik çizildi (Şekil 36). Hem MYCN hem de p53 için grafiğin eğimi hesaplandı. MYCN için eğim= -3,996, p53 için eğim= -4,222 olarak ölçüldü. Gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi, $E = 10^{(-1/Eğim)}$ formülü kullanılarak Kelly ve SIMA`da MYCN ve p53 için PCR amplifikasyon etkinlikleri hesaplandı. Kelly sh-RNA öncesi MYCN için $E=1,7790$; p53 için $E=1,7250$ olarak belirlendi.

Kelly shRNA Öncesinde MYCN ve p53 DNA Verileri için Oluşturulan Doğrusal Grafik
R=1753,63 KAT



Şekil 36: RNA susturulması öncesinde Kelly hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle Cp değerleri arasında çizilen grafik.

Bu E değerleriyle Kelly hücre hattında, MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı yeniden hesaplandı. LinReg PCR programında R=1519,75 olarak hesaplanmıştı. Dilüsyon metodu kullanılarak hesaplanan E değeri formülde yerine konulduğunda;

$$R_{\text{MYCN/p53}} = E^{\Delta C_p} = (1,7790/1,7250+1)^{(34,24-23,70)} = 2,0313^{10,54} = 1753,63$$

değeri elde edildi. Bu sonuç LinReg PCR metoduyla elde edilen R değerinden % 15,38 daha yüksektir.

Kelly'de olduğu gibi SIMA hücre hattında da shRNA öncesinde iki kat dilüsyon serilerinde (2ng-4ng-8ng-16ng-32ng) DNA örneklerinde gerçek zamanlı PCR deneyleri

uygulandı. Tablo 6`da Lightcyler 2.0 cihazından alınan SIMA shRNA öncesi DNA örneklerine karşılık gelen Cp değerleri verildi.

SIMA`da iki kat seri dilüsyonlardan elde edilen Cp değerleri

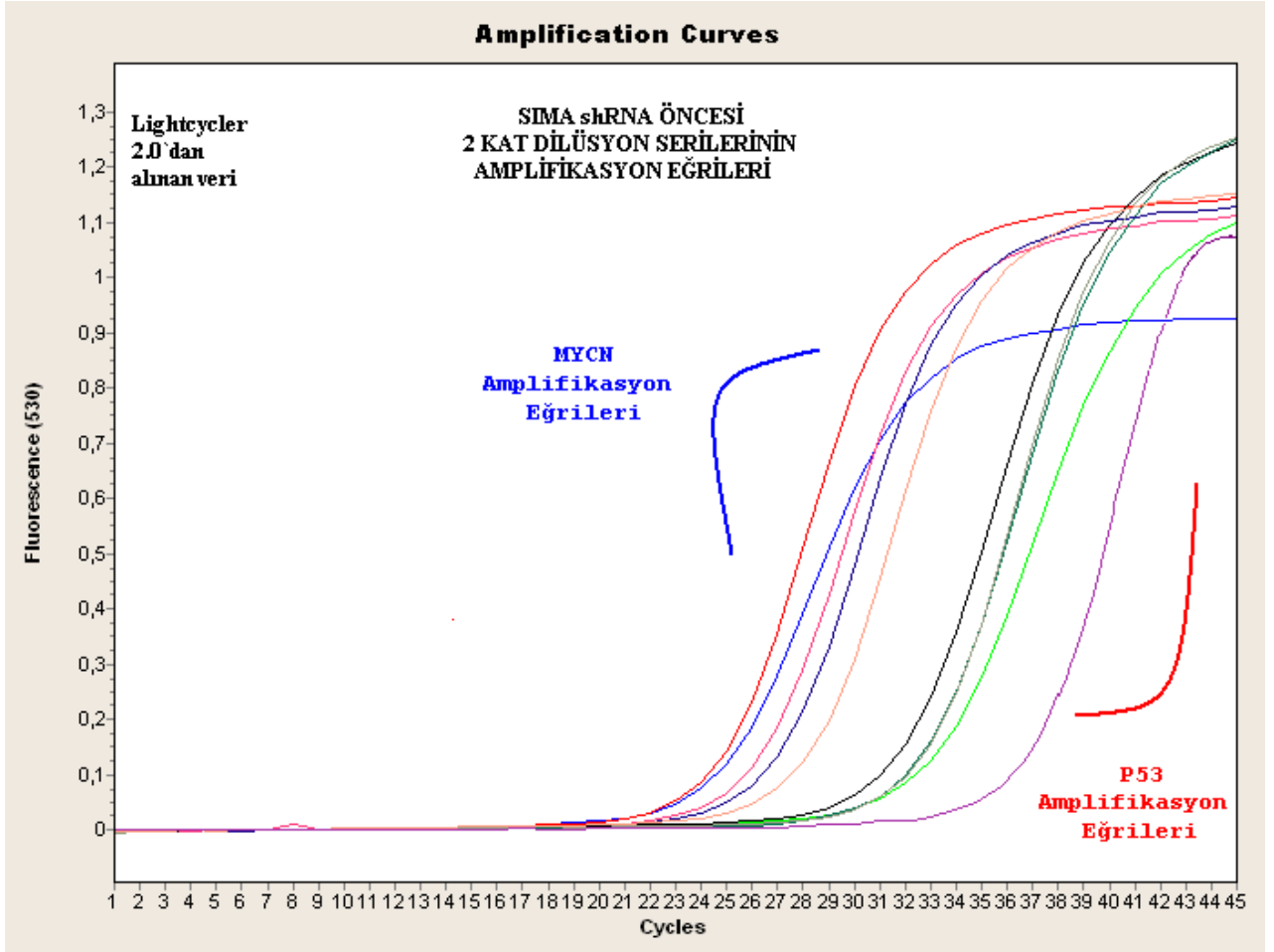
Lightcyler 2.0- Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları				
2,Kat dilüsyon Serisi				
Sıra	Hücre hattı-Dönem	Baş. Kons.	Gen Adı	Cp
1	Sima shRNA-Önce	DNA-32ng	MYCN	23,85
2	Sima shRNA-Önce	DNA-32ng	p53	29,87
3	Sima shRNA-Önce	DNA-16ng	MYCN	23,76
4	Sima shRNA-Önce	DNA-16ng	p53	30,97
5	Sima shRNA-Önce	DNA-8ng	MYCN	25,13
6	Sima shRNA-Önce	DNA-8ng	p53	31,88
7	Sima shRNA-Önce	DNA-4ng	MYCN	25,88
8	Sima shRNA-Önce	DNA-4ng	p53	31,90
9	Sima shRNA-Önce	DNA-2ng	MYCN	27,09
10	Sima shRNA-Önce	DNA-2ng	p53	33,50

Tablo 6: RNA susturulması öncesinde SIMA hücre hattına ait DNA örneğinde iki kat seri dilüsyonların sonuçları.

Bununla birlikte, Şekil 37`de Lightcyler 2.0`dan alınan SIMA hücre hattına ait MYCN ve p53 DNA PCR amplifikasyon eğrileri gösterildi. Bu aşamada, dilüsyon serilerinin Cp değerleri elde edildikten sonra, DNA örneklerinin başlangıç konsantrasyon değerlerinin logaritmik verileri ile MYCN ve p53 genlerinin Cp değerleri arasında grafik çizildi (Şekil 38). Hem MYCN hem de p53 için grafiğin eğimi hesaplandı. MYCN için eğim= -2,857, p53 için eğim= -2,7209 olarak ölçüldü.

SIMA hücre hattında shRNA öncesinde MYCN ve p53 için Cp ve log(K) değerleri arasında çizilen grafikten eğimler hesaplandıktan sonra, $E = 10^{(-1/Eğim)}$ formülü kullanılarak PCR amplifikasyon etkinlikleri saptandı. SIMA sh-RNA öncesinde MYCN için E=2,238; p53 için E=2,330 olarak belirlendi. Bu E değerlerinden SIMA hücre hattında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı yeniden hesaplandı. LinReg PCR programında R:140,64 olarak hesaplanmıştı. Dilüsyon metodu kullanılarak hesaplanan E değeri formülde yerine konulduğunda;

SIMA Hücre Hattında shRNA Öncesi İki Kat Dilüsyon Serilerine Ait Amplifikasyon Eğrileri

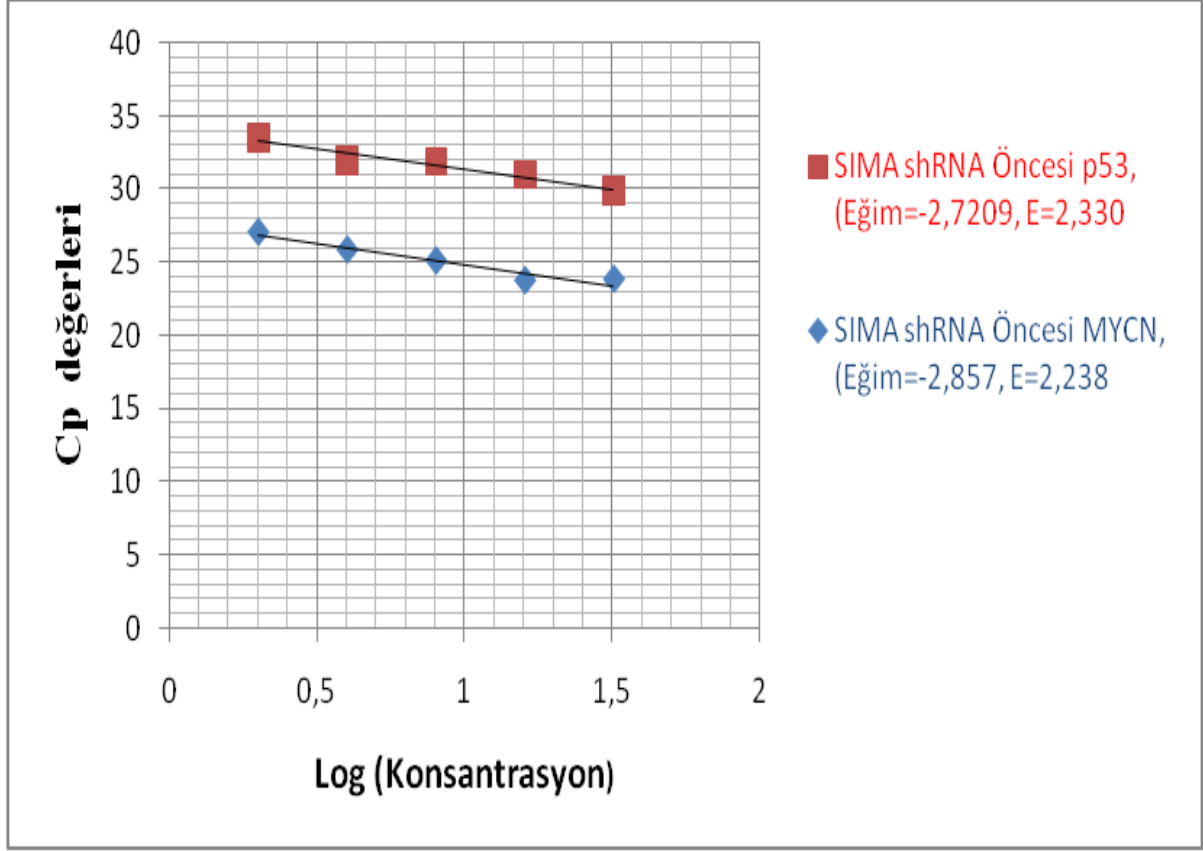


Şekil 37: SIMA hücre hattında shRNA öncesi çalışılmış genomik DNA örneklerinde iki kat dilüsyon serilerinde MYCN ve p53 genlerinin PCR amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterildi.

$$R_{MYCN/p53} = E^{\Delta C_p} = E (E_{MYCN}/E_{P53} + 1) = (2,238/2,330 + 1)^{(31,81 - 24,92)} = 1,9605^{6,89} = 103,37$$

değeri elde edildi. Bu sonuç LinReg PCR metoduyla elde edilen R değerinden % 26,50 daha düşüktür.

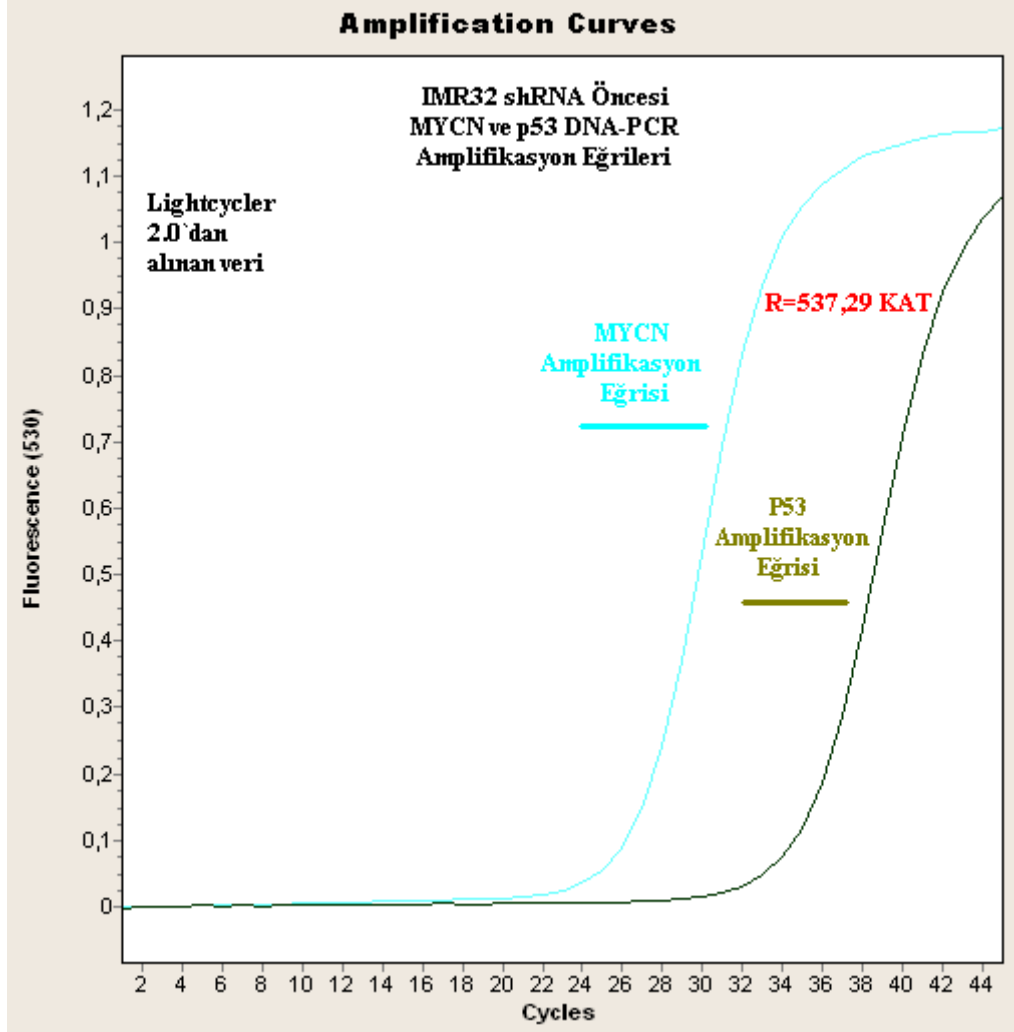
SIMA shRNA Öncesinde MYCN ve p53 DNA Verileri için Oluşturulan Doğrusal Grafik
R=103,37
KAT



Şekil 38: RNA susturulması öncesinde SIMA hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle Cp değerleri arasında çizilen grafik.

IMR32 hücre hattında shRNA öncesinde, MYCN ve p53 genomik DNA PCR amplifikasyon etkinlik değerleri (E) sadece LinReg PCR yöntemiyle hesaplandı. Çalışma üç kere tekrarlandı. Lightcycler 2.0`dan alınan Cp değerlerinin ortalamaları alındı. Şekil 39`da amplifikasyon eğrileri görülmektedir. MYCN için Cp= 26,38, p53 için Cp= 35,27 olarak saptandı. LinReg PCR programında MYCN için E=1,638, p53 için E=1,593 olarak hesaplandı. Bu E değerlerinden, IMR32 hücre hattında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı R=537,29 olarak bulundu.

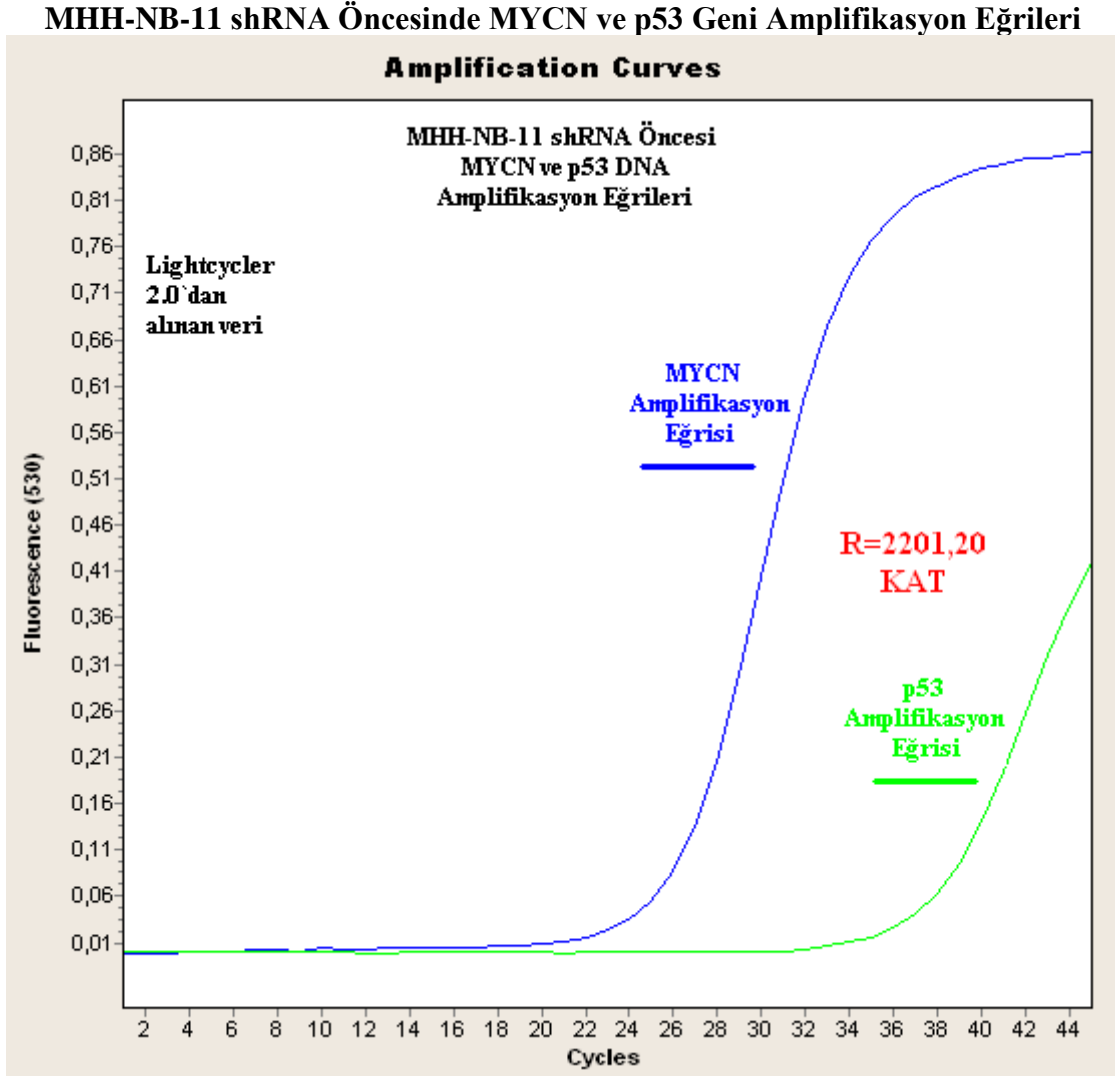
IMR32 shRNA Öncesinde MYCN ve p53 Geni Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 39: IMR32 RNA susturulması öncesinde MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 Amplifikasyon eğrileri.

MHH-NB-11 hücre hattında da shRNA öncesinde, MYCN ve p53 genomik DNA PCR amplifikasyon etkinlik değerleri (E) sadece LinReg PCR yöntemiyle hesaplandı. Çalışma üç kere tekrarlanarak Lightcycler 2.0'dan alınan Cp değerlerinin ortalamaları alındı. Şekil 40'da amplifikasyon eğrileri görülmektedir. MYCN için Cp= 25,67, p53 için Cp= 36,61 olarak saptandı. LinReg PCR programında MYCN için E=1,608, p53 için E=1,575 olarak hesaplandı. Bu E

değerlerinden, MHH-NB-11 hücre hattında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı $R= 2201,20$ olarak bulundu.

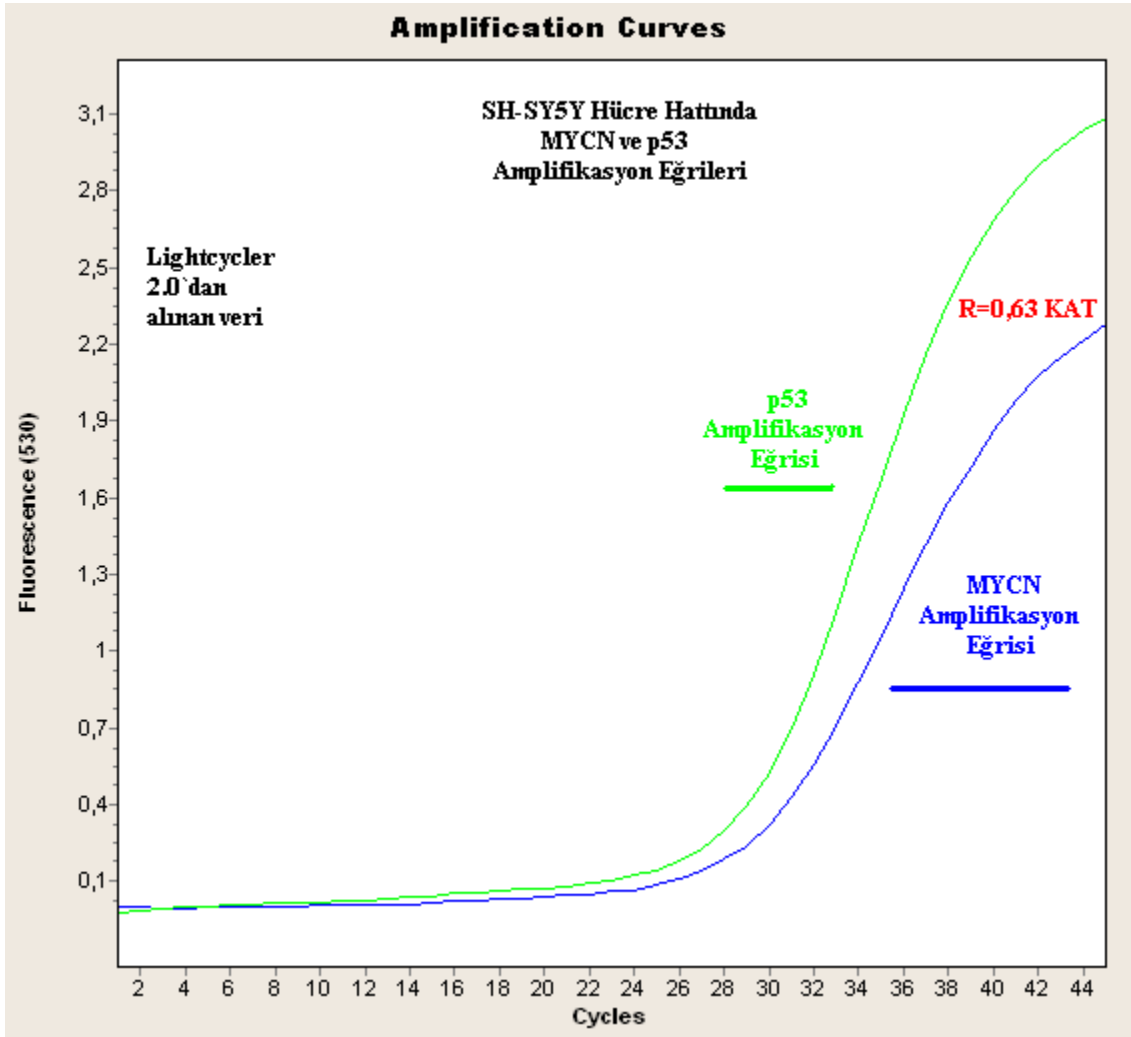


Şekil 40: MHH-NB-11 RNA susturulması öncesinde MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 Amplifikasyon eğrileri.

SH-SY5Y hücre hattının MYCN geni kopya sayısı FISH yöntemi ile 2-3 arasında olduğu saptanmıştı. MYCN ve p53 genomik DNA kopya sayılarının birbirine göre oranı gerçek zamanlı PCR deneyleri ile de elde edildi. Buna göre Lightcycler 2.0 cihazından alınan Cp değerlerinin ortalaması alındı. LinReg PCR yöntemiyle E değerleri hesaplandı. Yine bu E değerlerinin de

ortalaması alındı. Buna göre MYCN için Cp=29,44 bulundu. P53 için Cp=28,78 olarak saptandı. Şekil 41`de SH-SY5Y hücre hattında MYCN ve p53 için amplifikasyon eğrileri görülmektedir.

SH-SY5Y Hücre Hattında MYCN ve p53 Geni Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 41: SH-SY5Y hücre hattında MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 Amplifikasyon eğrileri.

LinReg PCR programında, MYCN için $E=1,286$, p53 için $E=1,330$ olarak saptandı. E değeri formülde yerine konulduğunda;

$$R_{MYCN/p53} = E^{\Delta C_p} = E (E_{MYCN}/E_{P53} + 1) = (1,286/1,330 + 1)^{(28,78-29,44)} = 1,9669^{-0,66} = 0,63$$

değeri elde edildi.

4.6-RNA Susturulması Sonrasında Gerçek Zamanlı PCR deneyleri ile yeniden ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları araştırıldı.

-Gen susturmalarının gerçekleştirildiği MYCN amplifiye Nöroblastoma hücre hatlarından cDNA` lar ve DNA` lar yeniden elde edildi.

MYCN onkogeninin amplifiye olduğu Kelly, IMR32, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarında c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve kontrol olarak EGFP`ye spesifik olarak dizayn edilmiş shRNA dizileri ile birleşik vektör sistemleriyle RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturmadan sonra bu dört hücre hattında, MYCN, c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve referans HPRT1 genlerinde mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR deneyleriyle yeniden ölçüldü. Ayrıca bu RNA susturulmaları gerçekleştirilmiş hücre hatlarından DNA` larda yeniden elde edildi.

Bunun için önce yine FastLane kiti ile cDNA`lar elde edildi. C-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve EGFP kontrolü ile ayrı ayrı transfekte edilmiş dört hücre hattından 24 kuyulu kültür plaklarına 40.000 hücre ekildi. RNA susturulması öncesinde olduğu gibi hücreler % 80 oranında plakları kapladığında cDNA` ları elde edildi. DNA`larda yine gereç ve yöntemde anlatıldığı gibi fenol:kloroform:izoamilalkol ile 75 cm² flasklardan ekstrakte edildi.

ARLAB`da Carry WinUV spektrofotometre cihazında Carry 50 DNA/RNA Conc programında 260 nm absorbansta konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Aynı örnekten üç ayrı ölçüm yapıldı. Bu üç ölçümün ortalaması alındı. Tablo 7 ve 8` de tüm yedi gen ve bir kontrol geni ile transfekte hücre hatlarına ait cDNA`ların ve DNA`ların ortalama absorban değerleri ve konsantrasyonları görülmektedir. Konsantrasyon değerleri yine aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

cDNA Konsantrasyonları

HÜCRE HATTI-GEN shRNA	A260 DEĞERİ			C (µg/ml)			SAFLIK DEĞERİ		
Kelly c-myb	1,5384	1,5622	0,6489	1538,4	1249,76	1946,7	1,7548	1,774	1,74
Kelly hl3mbtl	1,3901	0,6188	-	1390,1	1485,12	-	1,7534	1,761	-
Kelly p21	0,6666	-	-	1599,84	-	-	1,7558	-	-
Kelly geminin	0,6781	-	-	1627,44	-	-	1,7528	-	-
Kelly e2f1	0,5945	-	-	1783,5	-	-	1,7632	-	-
Kelly b-myb	0,9334	-	-	2240,16	-	-	1,7317	-	-
Kelly hCdt1	0,6944	-	-	1666,56	-	-	1,7547	-	-
Kelly egfp	0,8527	-	-	2046,48	-	-	1,7362	-	-
SIMA c-myb	1,1116	1,3327	0,5272	889,28	1332,7	1581,6	1,7676	1,761	1,75
SIMA hl3mbtl	1,4829	1,0637	0,5388	1186,32	1418,26	1293,12	1,7783	1,753	1,76
SIMA p21	0,6791	-	-	1629,84	-	-	1,7544	-	-
SIMA geminin	0,6062	-	-	1454,88	-	-	1,7803	-	-
SIMA e2f1	0,6035	-	-	1448,4	-	-	1,7698	-	-
SIMA b-myb	0,6904	-	-	1656,96	-	-	1,7598	-	-
SIMA hCdt1	0,5410	-	-	1623	-	-	1,7886	-	-
SIMA egfp	0,5052	-	-	1212,48	-	-	1,7318	-	-
MHH c-myb	0,5767	-	-	1384,08	-	-	1,7292	-	-
MHH hl3mbtl	0,5672	-	-	1361,28	-	-	1,7272	-	-
MHH p21	0,5193	-	-	1246,32	-	-	1,7391	-	-
MHH geminin	0,5284	-	-	1268,16	-	-	1,7431	-	-
MHH e2f1	0,5653	-	-	1356,72	-	-	1,7277	-	-
MHH b-myb	0,5625	-	-	1350	-	-	1,7399	-	-
MHH hCdt1	0,4402	-	-	1056,48	-	-	1,7857	-	-
MHH egfp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMR32 c-myb	0,5322	-	-	1596,6	-	-	1,7302	-	-
IMR32 hl3mbtl	0,6186	-	-	1484,64	-	-	1,7207	-	-
IMR32 p21	0,5203	-	-	1248,72	-	-	1,7374	-	-
IMR32 geminin	0,5217	-	-	1252,08	-	-	1,7478	-	-
IMR32 e2f1	0,6363	-	-	1527,12	-	-	1,7304	-	-
IMR32 b-myb	0,4908	-	-	1472,4	-	-	1,7285	-	-
IMR32 hCdt1	0,5311	-	-	1274,64	-	-	1,7871	-	-
IMR32 egfp	0,6020	-	-	1806	-	-	1,7296	-	-

Tablo 7: RNA susturması sonrasında tüm hücre hatlarında c DNA konsantrasyon ölçümleri.

$$C (\mu\text{g/ml}) = \frac{A(260\text{nm})}{0,025} \times \text{dilüsyon faktörü (cDNA için)}$$

$$C (\mu\text{g/ml}) = \frac{A(260\text{nm})}{0,020} \times \text{dilüsyon faktörü (DNA için)}$$

DNA Konsantrasyonları

HÜCRE HATTI-GEN shRNA	A260 DEĞERİ			C (µg/ml)			SAFLIK DEĞERİ		
Kelly c-myb	0,0604	0,0971	-	90,6	145,65		2,003	1,831	-
Kelly hl3mbtl	0,0313	0,0077	0,0501	46,95	19,25	75,15	1,968	2,464	2,024
Kelly p21	0,1424	-	-	213,6	-	-	1,669	-	-
Kelly geminin	0,2793	-	-	418,95	-	-	1,644	-	-
Kelly e2f1	0,0284	-	-	42,6	-	-	1,869	-	-
Kelly b-myb	0,0313	-	-	46,95	-	-	1,792	-	-
Kelly hCdt1	0,1992	-	-	298,8	-	-	1,695	-	-
Kelly egfp	0,0526	-	-	78,9	-	-	1,729	-	-
SIMA c-myb	0,2941	-	-	441,15	-	-	1,793	-	-
SIMA hl3mbtl	0,0291	0,1631	0,0541	43,65	244,65	81,15	1,989	1,836	1,838
SIMA p21	0,0465	-	-	69,75	-	-	1,867	-	-
SIMA geminin	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIMA e2f1	0,0260	-	-	39	-	-	1,806	-	-
SIMA b-myb	0,2004	-	-	300,6	-	-	1,718	-	-
SIMA hCdt1	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIMA egfp	0,2170	-	-	325,5	-	-	1,712	-	-
MHH c-myb	0,0467	-	-	70,05	-	-	1,984	-	-
MHH hl3mbtl	0,0147	-	-	22,05	-	-	2,149	-	-
MHH p21	0,1628	-	-	244,2	-	-	1,848	-	-
MHH geminin	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
MHH e2f1	0,0138	-	-	20,7	-	-	2,223	-	-
MHH b-myb	0,0219	-	-	32,85	-	-	2,021	-	-
MHH hCdt1	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
MHH egfp	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMR32 c-myb	0,0344	-	-	51,6	-	-	2,049	-	-
IMR32 hl3mbtl	0,0280	-	-	42	-	-	1,787	-	-
IMR32 p21	0,1744	-	-	261,6	-	-	1,779	-	-
IMR32 geminin	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMR32 e2f1	0,2797	-	-	419,55	-	-	1,75	-	-
IMR32 b-myb	0,0215	-	-	32,25	-	-	2,101	-	-
IMR32 hCdt1	shRNA-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMR32 egfp	0,2744	-	-	411,6	-	-	1,850	-	-

Tablo 8: RNA susturması sonrasında tüm hücre hatlarında DNA konsantrasyon ölçümleri.

Tabloda; Kelly ve SIMA, c-myb, HL3MBTL genleri ile ayrı ayrı iki kere transfekte edildi. Bu yüzden onlara ait cDNA iki kere elde edildi. Ayrıca, Kelly c-myb RNA susturması sonrasında ve SIMA c-myb ile HL3MBTL RNA susturmaları sonrasında üç kere cDNA elde edilip konsantrasyonları ölçüldü. Çünkü ilk seferde bu genlerdeki RNA baskılanma oranları düşüktü. Tekrar G418 muamelesine devam edildikten sonra cDNA`lar yeniden elde edildi.

-Gerçek zamanlı PCR deneylerinde RNA susturulması gerçekleştirilen hücre hatlarında dokuz genin ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Kelly, IMR32, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatları, c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve kontrol olarak EGFP`ye spesifik shRNA dizileri ile birleşik vektör sistemleriyle transfekte edildikten sonra RNA susturulmaları gerçekleştirildi. RNA susturulmasından sonra MYCN, c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve referans HPRT1 genlerin de mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR deneyleriyle yeniden ölçüldü. Ayrıca transfeksiyondan sonra susturulan genlerin hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinde MYCN/p53 kopya sayısı oranlarının saptanması için gerçek zamanlı PCR deneyleri uygulandı.

RNA susturulması öncesinde de kullanılan aynı prob ve primer dizileri ile deneyler gerçekleştirildi (Tablo 1). Taqman kitinin hazır 5xMaster solüsyonu ile DNA polimeraz enzimi karıştırıldı. Reaksiyona ilgili probe ve primer çiftleri ile birlikte cDNA ve DNA`lar eklendi. Kapiller içinde her bir örnek Lightcycler 2.0 cihazına yüklendi. Deney sonunda her bir gen için Cp değerleri elde edildi. Ayrıca bu genlere ait PCR etkinlik katsayıları (E) belirlendi. RNA susturması sonrasında da tüm gerçek zamanlı PCR reaksiyonları üç kere tekrarlandı. Uyumsuz çıkan sonuçlarda deneylere devam edildi.

Her bir hücre hattında ilgili genlerde gerçekleştirilen RNA susturulması öncesinde ve sonrasında elde edilen ortalama Cp, E ve R değerleri birbiriyle kıyaslandı. Tüm dört hücre hattında kontrol EGFP vektörüyle transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra bu kontrol vektörünün bulunduğu hücrelerde de ilgili genlerin referans genine göre ekspresyon katları (R) belirlendi. Tüm dört hücre hattında ilgili genlerin RNA susturulmaları öncesindeki R değerleri ile EGFP kontrol vektörlerinin transfekte olduğu hücrelerden elde edilen R değerleri beklenildiği gibi birbirine yakın sonuçlar verdi.

Kelly Hüce Hattı shRNA Sonrası Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

GENLER	KELLY RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER						
	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB	HCDT1	GEMİNİN	P21
MYCN	27,72 1,751 10,8244	28,15 1,719 7,3606	30,05 1,746 3,8014	30,23 1,733 18,3329	X	28,17 1,738 6,1038	28,43 1,717 4,7976
CMYB	>40 1,526 0,0031	>40 1,499 0,0025	>40 1,342 0,0091	>40 1,446 0,0248	X	Neg. 1,228 0,0000	Neg. 1,182 0,0000
HL3MBTL	Neg. 1,418 0,0000	38,51 1,435 0,0080	>40 1,527 0,0057	>40 1,577 0,0194	X	>40 1,538 0,0024	>40 1,537 0,0023
E2F1	32,43 1,500 0,4214	34,42 1,425 0,1091	36,29 1,465 0,0669	35,53 1,374 0,4464	X	34,30 1,462 0,1082	34,87 1,424 0,0756
BMYB	29,68 1,246 2,1547	30,97 1,420 0,9629	30,51 1,478 2,4464	33,64 1,409 1,4387	X	31,00 1,430 0,8475	30,50 1,401 1,1017
HCDT1	31,01 1,754 1,0436	30,89 1,754 1,0147	31,96 1,744 0,9859	31,47 1,801 7,8462	X	31,56 1,708 0,5603	31,67 1,699 0,4941
GMN	29,67 1,129 2,0467	29,63 1,150 1,9868	30,54 1,147 2,0583	30,34 1,177 8,3628	X	30,07 1,147 1,4071	30,00 1,145 1,4084
P21	>40 1,440 0,0040	>40 1,423 0,0032	>40 1,338 0,0092	>40 1,201 0,0402	X	>40 1,587 0,0021	>40 1,244 0,0056
HPRT1	31,07 1,690 1,0000	30,91 1,620 1,0000	31,94 1,700 1,0000	34,22 1,615 1,0000	X	30,73 1,692 1,0000	30,66 1,683 1,0000
MYCN/P53	21,60/ 33,22	24,68/ 35,38	24,44/ 34,94	24,50/ 34,43	X	22,78/ 32,76	21,28/ 31,12
	1,616/ 1,492	1,606/ 1,627	1,576/ 1,557	1,569/ 1,610	X	1,602/ 1,501	1,612/ 1,500
	5051,39	1551,37	1543,64	858,79	X	1404,48	1314,11

Tablo 9: Kelly hüce hattında altı gen susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo`da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCdt1 geninde shRNA dizisinin vektörü çalışmadı.

Kelly`de shRNA öncesi ve sonrası R değerlerinin karşılaştırılması

GEN ADI	SHRNA ÖNCESİ	KELLY RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER (R)					
	KELLY (R)	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB	GEMININ	P21
MYCN	8,5157	10,8244	7,3606	3,8014	18,3329	6,1038	4,7976
CMYB	0,0266	0,0031	0,0025	0,0091	0,0248	0,0000	0,0000
HL3MBTL	0,0292	0,0000	0,0080	0,0057	0,0194	0,0024	0,0023
E2F1	0,5926	0,4214	0,1091	0,0669	0,4464	0,1082	0,0756
BMYB	4,6402	2,1547	0,9629	2,4464	1,4387	0,8475	1,1017
HCDT1	0,6761	1,0436	1,0147	0,9859	7,8462	0,5603	0,4941
GEMININ	1,7692	2,0467	1,9868	2,0583	8,3628	1,4071	1,4084
P21	0,1351	0,0040	0,0032	0,0092	0,0402	0,0021	0,0056
HPRT1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MYCN/P53 DNA Kopya Sayısı (R)	1519,75	5051,39	1551,37	1543,64	858,79	1404,48	1314,11

Tablo 10: Kelly`de RNA susturması öncesinde ve sonrasında mRNA ekspresyonları ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri.

Kelly hücre hattında c-myb, HL3MBTL, E2F1, p21, Geminin ve b-myb dahil altı gene RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturmadan sonra yapılan gerçek zamanlı PCR deneylerinin sonuçları Tablo 9`da görülmektedir. Tablo` da altı genin susturulduğu hücre hattındaki mRNA ekspresyon düzeyleri ile MYCN/p53 kopya sayısı oranları verildi. Ayrıca Tablo 10`da Kelly`de susturma öncesi ve sonrasında, gen ekspresyonları ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları birbiriyle kıyaslanarak verildi.

Sonuçlarda MYCN ekspresyonu ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının üzerine diğer genlerin etkisi incelendi. Kelly hücre hattında c-myb geni mRNA`sı baskılandığı zaman, MYCN ekspresyonu % 27,14; MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 232,38 arttı. HL3MBTL geninin mRNA`sı baskılandığında ise, MYCN ekspresyonu % 13,52 azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 2,08 arttı. E2F1 geni mRNA`sı baskılanınca da MYCN mRNA`sının ekspresyon düzeyi % 55,34 azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 1,57 arttı. B-myb

baskılanması durumunda da c-myb shRNA sonrası durum gibi MYCN ekspresyon düzeyinde artış görüldü. Bu artış % 115,39 oranında gerçekleşti. B-myb baskılandığında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı ise % 43,49 azaldı. P21 gen mRNA'sı baskılandığında MYCN ekspresyonu % 43,72 oranında azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı da % 13,53 azaldı. Son olarak, Geminin mRNA'sı baskılanınca önceki durumuna göre MYCN mRNA'sı % 28,32 oranında azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı da % 7,58 azaldı.

Kelly`de c-myb geninin susturulmasından sonra MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranında % 232,38`lik önemli bir artışın meydana geldiği görülmektedir. Bu yüzden Kelly`de c-myb geni susturulduktan sonra MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı dilüsyon metoduyla da belirlendi. Bu amaçla, MYCN ve p53 için iki kat seri dilüsyonlar ile gerçek zamanlı PCR deneyleri uygulandı. Bu deneyler sonucunda elde edilen Cp değerleriyle konsantrasyonlar arasında çizilen grafiklerin eğiminden E değerleri hesaplandı. Kelly c-myb geninin susturulduğu DNA örneklerinde shRNA öncesinde yapıldığı gibi iki kat başlangıç konsantrasyonları dilüe edilerek gerçek zamanlı PCR deneyleri kuruldu. Bunun için 2, 4, 8, 16 ve 32 nanogram başlangıç konsantrasyonlarında DNA örnekleri Lightcycler 2.0 cihazına yüklendi.

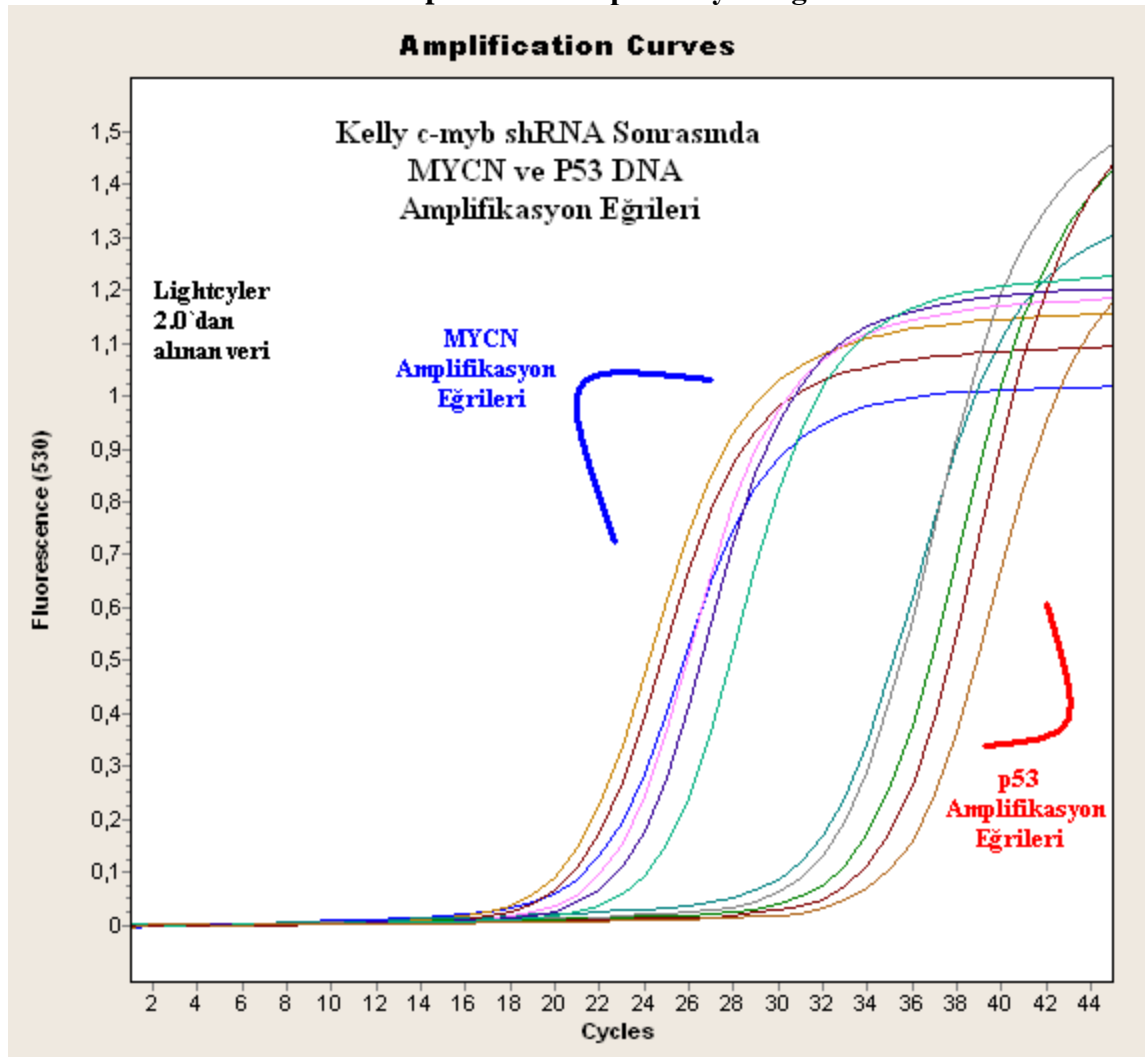
Kelly`de c-myb shRNA sonrasında iki kat seri dilüsyonlardan elde edilen Cp değerleri

Lightcycler 2.0- Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları				
İki Kat dilüsyon Serisi				
Sıra	Hücre hattı-Dönem	Baş. Kons.	Gen Adı	Cp
1	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-32ng	MYCN	19,80
2	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-32ng	p53	31,45
3	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-16ng	MYCN	20,26
4	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-16ng	p53	32,06
5	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-8ng	MYCN	21,67
6	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-8ng	p53	33,33
7	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-4ng	MYCN	22,48
8	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-4ng	p53	34,27
9	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-2ng	MYCN	23,82
10	Kelly c-myb shRNA-Sonra	DNA-2ng	p53	35,00

Tablo 11: RNA susturulması sonrasında Kelly hücre hattında DNA örneğinin iki kat seri dilüsyon sonuçları.

Tablo 11`de Lightcyler 2.0`dan alınan Cp değerleri gösterildi. Ayrıca Şekil 42`de Kelly c-myb shRNA sonrasında elde edilen MYCN ve p53 DNA PCR amplifikasyon eğrileri görülmektedir. Kelly shRNA öncesi iki kat dilüsyon serilerinde olduğu gibi c-myb shRNA sonrasında da MYCN ve p53 genlerinin Cp değerleri ile DNA örneklerinin başlangıç konsantrasyon değerlerinin logaritmik verileri arasında grafik çizildi (Şekil 43).

Kelly C-myb shRNA Sonrasında İki-kat Dilüe Örneklerin MYCN ve p53 DNA Amplifikasyon Eğrileri

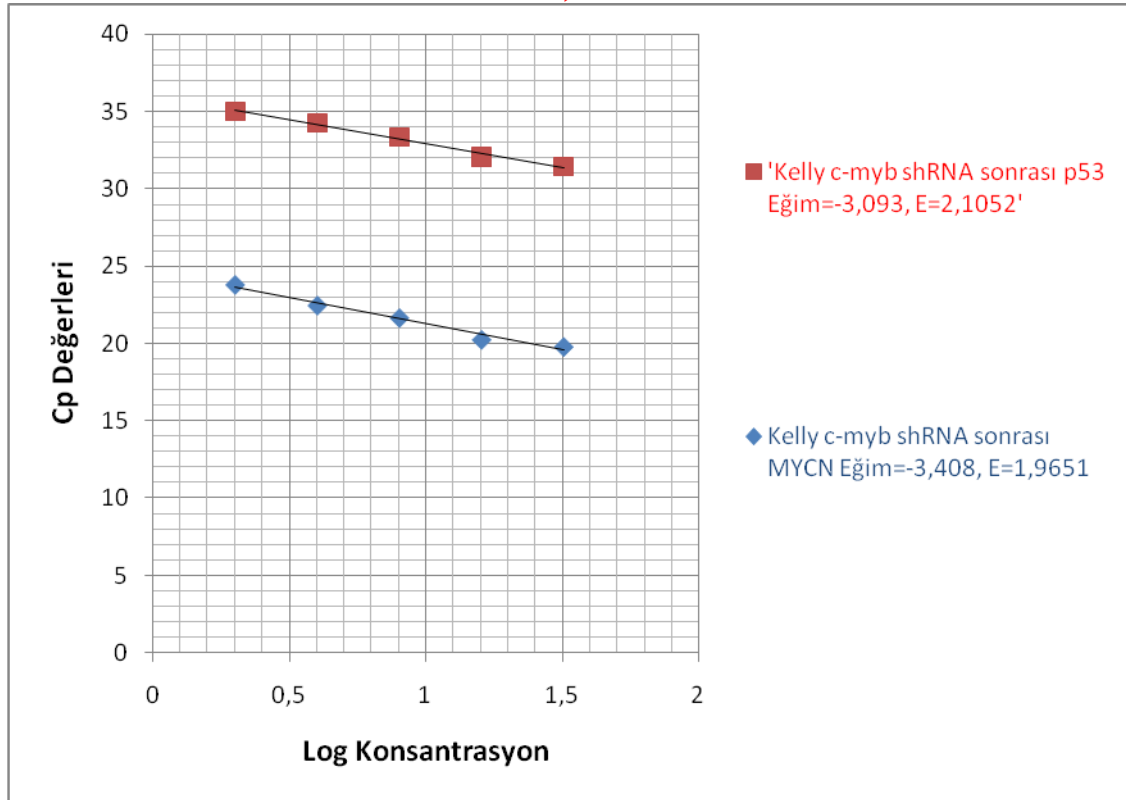


Şekil 42: Kelly hücre hattında c-myb susturulduktan sonra MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneylerinden elde edilen Lightcyler 2.0 amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterildi.

Hem MYCN hem de p53 için grafiğin eğimi hesaplandı. MYCN için eğim= -3,408, p53 için eğim= -3,093 olarak ölçüldü. Gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi, $E = 10^{(-1/Eğim)}$ formülü kullanılarak Kelly` de MYCN ve p53 için PCR amplifikasyon etkinlikleri hesaplandı.

Kelly c-myb shRNA sonrası MYCN için E=1,9651; p53 için E=2,1052 olarak belirlendi. Bu E değerleriyle Kelly hücre hattında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı yeniden hesaplandı. LinReg PCR programında R=5051,39 olarak belirlenmişti. Dilüsyon metodu kullanılarak hesaplanan E değeri formülde yerine konulduğunda;

**Kelly c-myb shRNA Sonrasında MYCN ve p53 DNA Cp ve Log (K)
Verileri için Oluşturulan Doğrusal Grafik
R=2123,52 KAT**

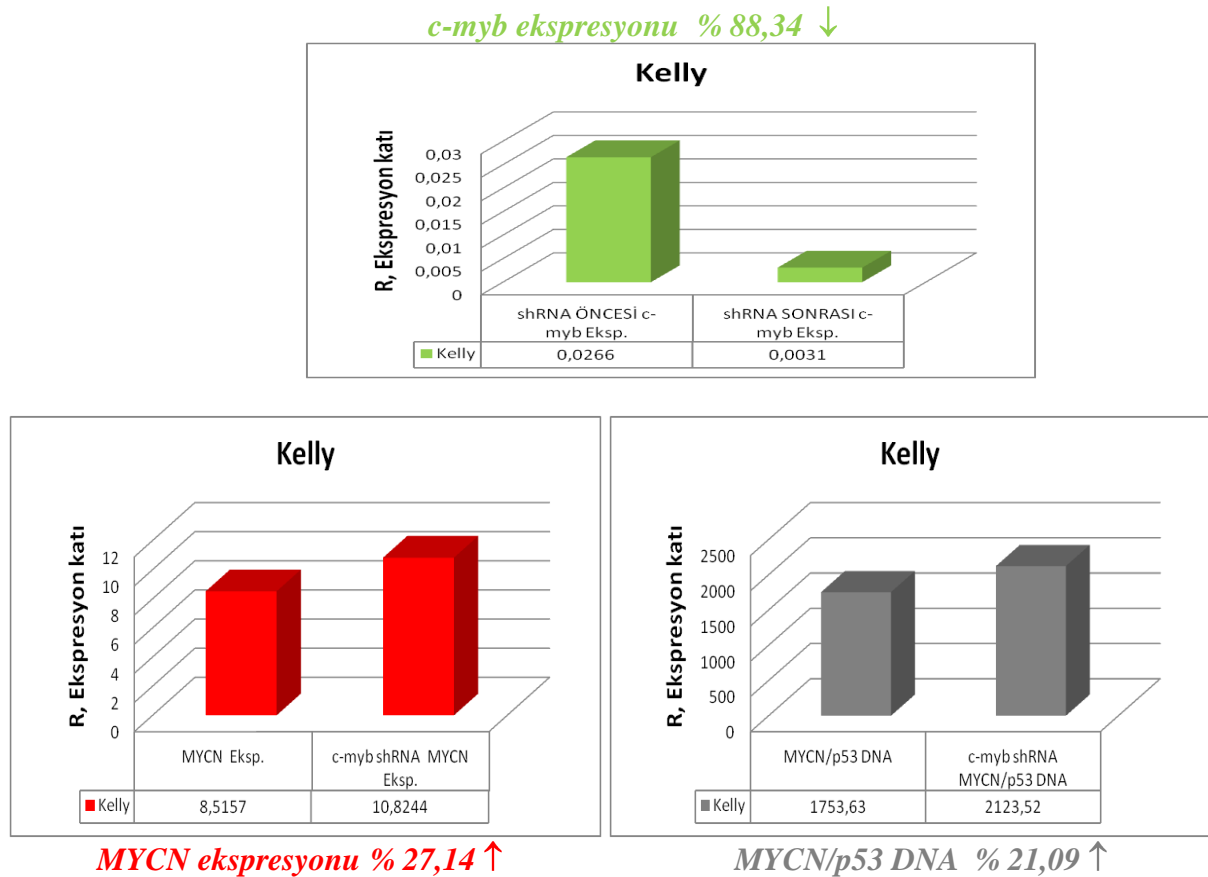


Şekil 43: C-myb RNA susturulması sonrasında Kelly hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle MYCN ve p53 Cp değerleri arasında çizilen grafik.

$$R_{MYCN/p53} = E^{\Delta Cp} = (1,9651/2,1052+1)^{(33,22-21,60)} = 1,9334^{11,62} = 2123,52$$

değeri elde edildi. Bu sonuç LinReg PCR metoduyla elde edilen R değerinden % 57,96 daha azdır. LinReg PCR ve dilüsyon metodu ile elde edilen ekspresyon katlarının (R) değerleri arasında uyumsuzluk olduğu göze çarpmaktadır. Bununla birlikte; Kelly hücre hattında c-myb geni mRNA'sı susturulmadan önce dilüsyon metoduyla E değerinin hesaplandığı durumda R:1753,63 kat idi. C-myb mRNA'sı susturulduktan sonra MYCN kopya sayısının p53'e göre 2123,52 kata çıktığı görülmektedir.

Sonuç olarak; Kelly'de c-myb mRNA'sı % 88,34 oranında baskılandığında MYCN ekspresyonu % 27,14; MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 21,09 oranında arttı (Şekil 44).



Şekil 44: Kelly'de c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.

SIMA hücre hattında c-myb, HL3MBTL, E2F1, p21 ve b-myb dahil beş gende RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturmadan sonra yapılan gerçek zamanlı PCR deneylerinin sonuçları Tablo 12`de görülmektedir. Tablo` da hücre hattındaki mRNA ekspresyon düzeyleri ile MYCN/p53 kopya sayısı oranları verildi. Ayrıca Tablo 13`de SIMA`da susturma öncesi ve sonrasında gen ekspresyonları ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları birbiriyle kıyaslanarak verildi. SIMA`da da mRNA ekspresyonları ve MYCN/p53 DNA PCR reaksiyonları için amplifikasyon etkinlik (E) değerleri LinReg PCR programında hesaplandı.

Sonuçlarda MYCN ekspresyonu ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının üzerine diğer genlerin etkisi incelendi. SIMA hücre hattında; c-myb geni mRNA`nın baskılanması ile MYCN ekspresyonunda Kelly` nin aksine % 44,44 oranında azalma görüldü. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı ise % 55,87 arttı. HL3MBTL shRNA uygulandığında Kelly`de olduğu gibi MYCN mRNA düzeyinde düşüş gözlemlendi. Ancak düşüş Kelly` ye göre daha fazla düzeyde (% 37,42) meydana geldi. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı ise % 3,6 arttı. E2F1 geninde shRNA uygulandığı zaman, Kelly`nin aksine % 20,46 oranında MYCN mRNA düzeyinde artma meydana geldi. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı ise % 20,13 arttı. B-myb ve p21 mRNA` ları üzerinde shRNA baskılanması uygulanınca ise sırasıyla % 14,61 ve % 66,66 oranlarında MYCN mRNA` sının arttığı belirlendi. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı ise b-myb`de % 22,63 azalırken p21`de % 0,93 arttı.

Ayrıca Kelly`de olduğu gibi SIMA`da da iki kat dilüsyonlarla elde edilen gerçek zamanlı PCR sonuçlarıyla çizilen grafiklerin eğiminden de E değerleri hesaplandı. SIMA hücre hattında da c-myb geninin susturulduğu DNA örneklerinde shRNA öncesinde yapıldığı gibi iki kat başlangıç konsantrasyonları dilüe edilerek gerçek zamanlı PCR deneyleri kuruldu. Bunun için yine 2, 4, 8, 16 ve 32 nanogram başlangıç konsantrasyonlarında DNA örnekleri Lightcycler 2.0 cihazına yüklendi.

SIMA Hücre Hattı shRNA Sonrası Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

GENLER	SIMA RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER						
	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB	HCDT1	GEMININ	P21
MYCN	30,70 1,689 0,9592	30,15 1,704 1,0736	29,75 1,740 2,0622	29,81 1,736 1,9613	X	X	29,26 1,744 2,8543
CMYB	>40 1,126 0,0083	>40 1,244 0,0041	>40 1,527 0,0025	38,08 1,578 0,0078	X	X	38,42 1,461 0,0083
HL3MBTL	Neg. 1,088 0,0000	39,69 1,403 0,0029	Neg. 1,107 0,0000	Neg. 1,141 0,0000	X	X	39,78 1,576 0,0025
E2F1	35,18 1,417 0,0627	36,29 1,412 0,0237	33,70 1,449 0,1622	33,18 1,431 0,2254	X	X	32,44 1,453 0,3484
BMYB	31,22 1,420 0,7016	31,08 1,447 0,5925	31,09 1,461 0,8188	29,96 1,405 1,6254	X	X	30,12 1,464 1,4720
HCDT1	32,23 1,681 0,3329	31,24 1,702 0,4953	31,83 1,715 0,4749	32,47 1,740 0,2968	X	X	31,85 1,721 0,4587
GMN	30,17 1,176 1,2823	30,48 1,130 0,8867	30,98 1,145 0,8967	30,72 1,144 1,0209	X	X	30,84 1,208 0,9475
P21	>40 1,119 0,0085	>40 1,126 0,0062	>40 1,383 0,0039	>40 1,399 0,0037	X	X	>40 1,425 0,0034
HPRT1	30,64 1,686 1,0000	30,25 1,647 1,0000	30,77 1,684 1,0000	30,76 1,682 1,0000	X	X	30,74 1,691 1,0000
MYCN/P53	23,56/ 30,97	26,78/ 36,40	27,62/ 35,49	23,68/ 33,34	X	X	26,49/ 36,16
	1,643/ 1,568	1,167/ 1,720	1,590/ 1,73	1,030/ 1,648	X	X	1,205/ 1,800
	219,22	145,71	168,96	108,8	X	X	141,95

Tablo12: SIMA hücre hattında beş gen susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo`da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDT1ve Geminin genlerinde shRNA dizilerinin vektörleri çalışmadı.

SIMA`da shRNA öncesi ve sonrası R değerlerinin karşılaştırılması

GEN ADI	SHRNA ÖNCESİ	SIMA RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER (R)				
	SIMA (R)	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB	P21
MYCN	1,7172	0,9592	1,0736	2,0622	1,9613	2,8543
CMYB	0,0196	0,0083	0,0041	0,0025	0,0078	0,0083
HL3MBTL	0,0307	0,0000	0,0029	0,0000	0,0000	0,0025
E2F1	0,4544	0,0627	0,0237	0,1622	0,2254	0,3484
BMYB	2,9269	0,7016	0,5925	0,8188	1,6254	1,4720
HCDT1	0,4738	0,3329	0,4953	0,4749	0,2968	0,4587
GEMININ	0,2307	1,2823	0,8867	0,8967	1,0209	0,9475
P21	0,0296	0,0085	0,0062	0,0039	0,0037	0,0034
HPRT1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MYCN/P53 DNA Kopya Sayısı (R)	140,64	219,22	145,71	168,96	108,8	141,95

Tablo 13: SIMA`da RNA susturması öncesinde ve sonrasında mRNA ekspresyonları ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri.

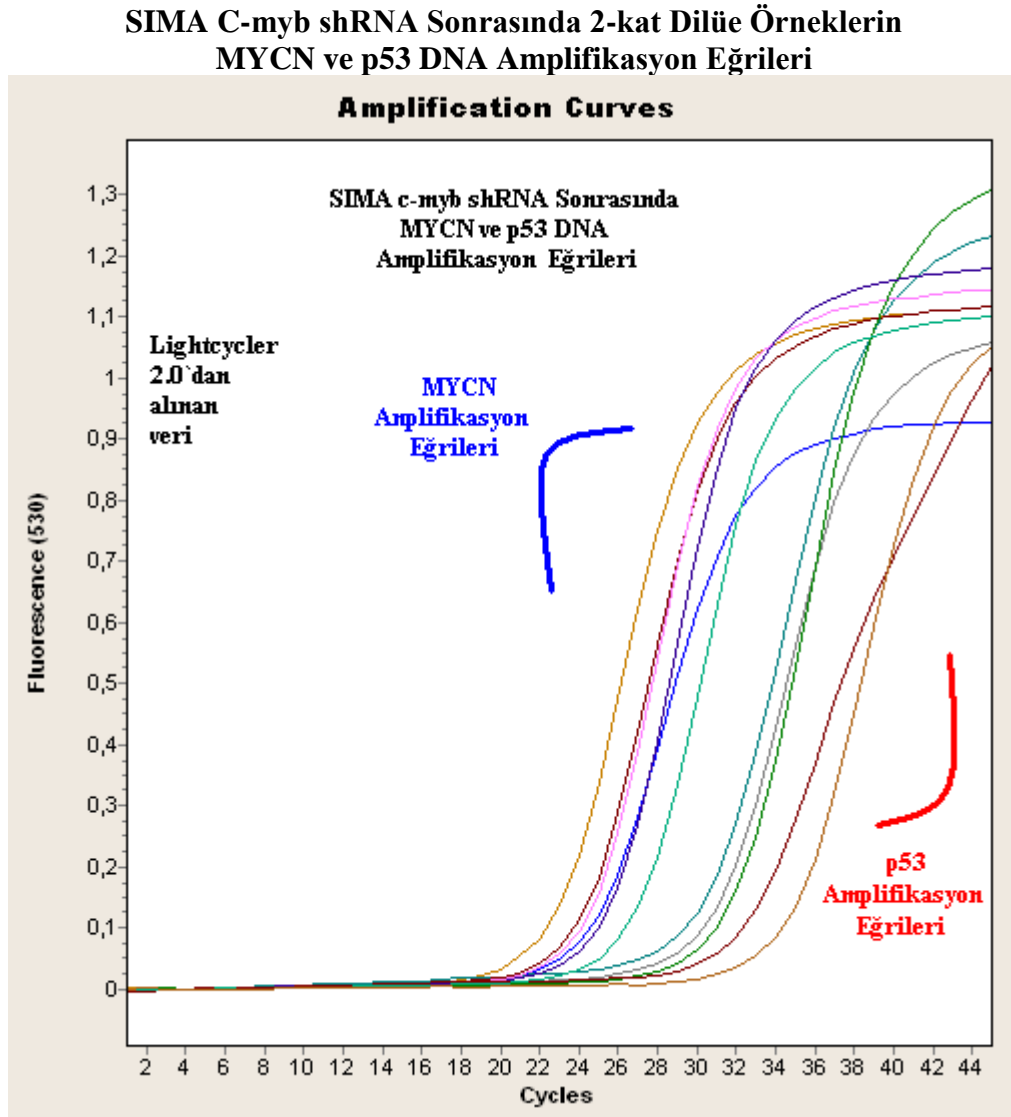
Tablo 14`de Cp değerleri gösterildi. Ayrıca Şekil 45`de SIMA c-myb shRNA sonrasında elde edilen MYCN ve p53 DNA PCR amplifikasyon eğrileri görülmektedir. SIMA shRNA öncesi iki

SIMA`da c-myb shRNA sonrasında iki kat seri dilüsyonlardan elde edilen Cp değerleri

Lightcycler 2.0- Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları				
İki kat dilüsyon Serisi				
Sıra	Hücre hattı-Dönem	Baş. Kons.	Gen Adı	Cp
1	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-32ng	MYCN	21,79
2	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-32ng	p53	29,82
3	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-16ng	MYCN	23,14
4	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-16ng	p53	30,06
5	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-8ng	MYCN	23,56
6	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-8ng	p53	30,97
7	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-4ng	MYCN	24,50
8	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-4ng	p53	31,59
9	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-2ng	MYCN	25,81
10	SIMA c-myb shRNA-Sonra	DNA-2ng	p53	34,00

Tablo 14: RNA susturulması sonrasında SIMA hücre hattında DNA örneğinin iki kat seri dilüsyon sonuçları.

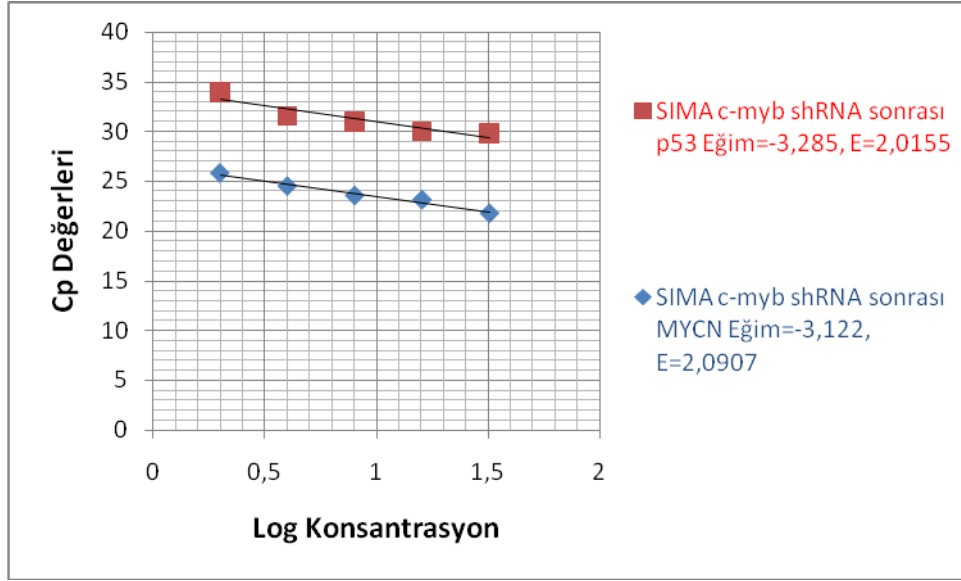
kat dilüsyon serilerinde olduğu gibi c-myb shRNA sonrasında da MYCN ve p53 genlerinin Cp değerleri ile DNA örneklerinin başlangıç konsantrasyonlarının logaritmik verileri arasında grafik çizildi (Şekil 46). Hem MYCN hem de p53 için grafiğin eğimi hesaplandı. MYCN için eğim= -3,122, p53 için eğim= -3,285 olarak ölçüldü.



Şekil 45: SIMA hücre hattında c-myb susturulduktan sonra MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneylerinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri. Cp değerlerine karşılık gelen floresans ölçümleri grafikte gösterildi.

Gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi, $E = 10^{(-1/\text{Eğim})}$ formülü kullanılarak SIMA` da MYCN ve p53 için PCR amplifikasyon etkinlikleri hesaplandı. SIMA c-myb shRNA sonrası

**SIMA c-myb shRNA Sonrasında MYCN ve p53 DNA Cp ve Log (K)
Verileri için Oluşturulan Doğrusal Grafik**
R=210,90 KAT



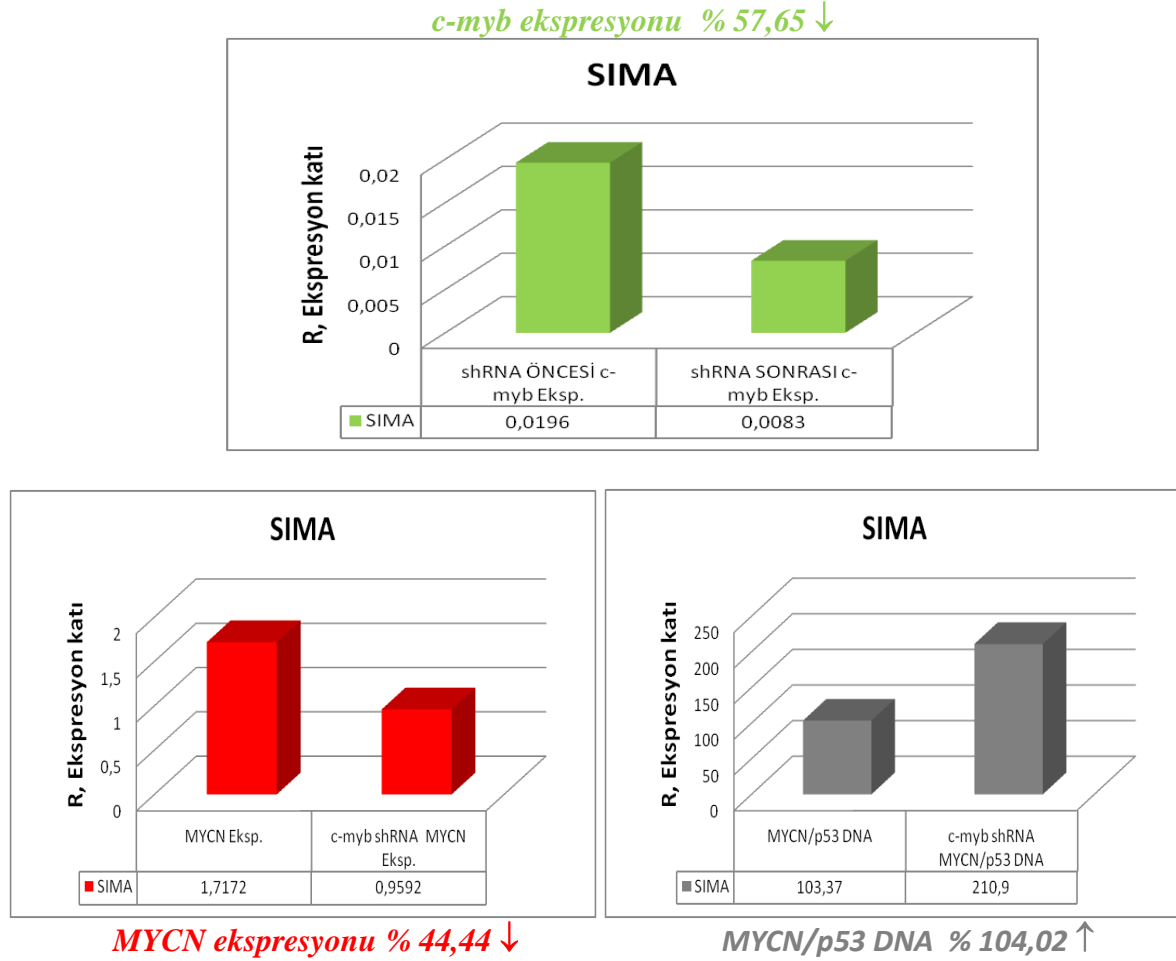
Şekil 46: C-myb RNA susturulması sonrasında SIMA hücre hattında konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 nanogram olan iki kat dilüsyon serisinde DNA örneklerinin logaritmik verileriyle MYCN ve p53 Cp değerleri arasında çizilen grafik.

MYCN için E=2,0907; p53 için E=2,0155 olarak belirlendi. Bu E değerleriyle SIMA hücre hattında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı yeniden hesaplandı. LinReg PCR programında R=219,22 olarak hesaplanmıştı. Dilüsyon metodu kullanılarak hesaplanan E değeri formülde yerine konulduğunda;

$$R_{MYCN/p53} = E^{ACp} = (2,0907/2,0155+1)^{(31,28-23,76)} = 2,0373^{7,52} = 210,90$$

değeri elde edildi. Bu sonuç LinReg PCR metoduyla elde edilen R değerinden % 3,79 daha düşüktür. Bu sonuçta LinReg PCR ile dilüsyon metodu ile elde edilen ekspresyon katlarının (R) değerlerinin birbiriyle (Kelly'deki uyumsuzluğun aksine) yakın değerde bulunduğu göze çarpmaktadır. Bu durumda SIMA'da c-myb shRNA uygulamasından sonra MYCN/p53 kopya sayısı oranı R=103,37'den R=210,90'a çıktı.

Sonuç olarak; SIMA hücre hattında c-myb geni mRNA'sı % 57,65 oranında baskılandığında MYCN ekspresyonu % 44,44 azaldı; MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 104,02 arttı (Şekil 47).



Şekil 47: SIMA`da c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.

IMR32 hücre hattında da c-myb, HL3MBTL, E2F1 ve b-myb dahil dört gende RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturmadan sonra yapılan gerçek zamanlı PCR deneylerinin sonuçları Tablo 15`de görülmektedir. Tabloda hücre hattındaki mRNA ekspresyon düzeyleri ile MYCN/p53 kopya sayısı oranları verildi. Ayrıca Tablo 16`da IMR32`de susturma öncesi ve sonrasında gen ekspresyonlarının ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları birbiriyle kıyaslanarak verildi.

IMR32 Hüce Hattı shRNA Sonrası Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

GENLER	IMR32 RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER						
	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB	HCDT1	GEMININ	P21
MYCN	31,68 1,800 3,6163	28,10 1,763 2,2752	30,27 1,767 2,5700	30,51 1,744 4,2323	X	X	X
CMYB	Neg. 1,070 0,0000	>40 1,505 0,0013	Neg. 1,104 0,0000	>40 1,446 0,0107	X	X	X
HL3MBTL	Neg. 1,423 0,0000	Neg. 1,190 0,0000	>40 1,465 0,0047	37,90 1,562 0,0318	X	X	X
E2F1	>40 1,373 0,0226	34,26 1,437 0,0521	39,32 1,431 0,0080	35,49 1,445 0,1683	X	X	X
BMYB	36,61 1,428 0,1542	29,22 1,462 1,0430	32,29 1,445 0,6365	31,73 1,481 1,6853	X	X	X
HCDT1	32,62 1,802 1,8559	31,02 1,819 0,2945	31,30 1,780 1,2178	31,61 1,776 1,9762	X	X	X
GMN	29,69 1,672 12,922	28,11 1,174 1,8223	29,09 1,123 3,6103	29,13 1,130 5,6851	X	X	X
P21	>40 1,075 0,0436	>40 1,407 0,0019	>40 1,109 0,0132	>40 1,431 0,0111	X	X	X
HPRT1	33,49 1,740 1,0000	29,29 1,771 1,0000	31,57 1,656 1,0000	32,57 1,719 1,0000	X	X	X
MYCN/P53	25,11/ 32,69	29,07/ 39,46	19,32/ 29,52	26,65/ 35,73	X	X	X
	1,602/ 1,500	1,52/ 1,75	1,51/ 1,78	1,65/ 1,57	X	X	X
	246,53	661,93	526,11	442,2	X	X	X

Tablo 15: IMR32 hüce hattında dört gen susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo`da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDT1, Geminin ve p21 genlerinde shRNA dizilerinin vektörleri çalışmadı.

IMR32`de shRNA öncesi ve sonrası R değerlerinin karşılaştırılması

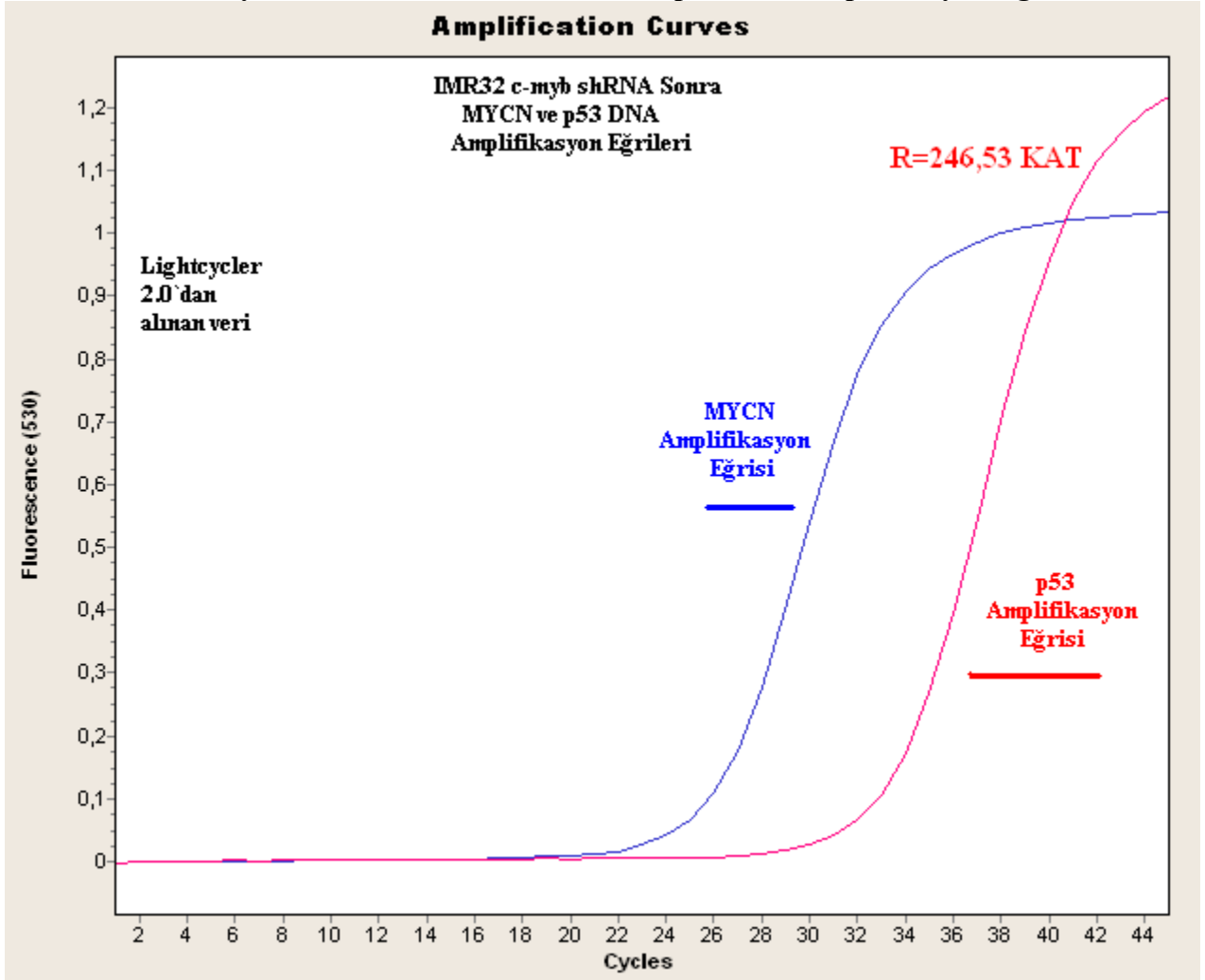
GEN ADI	SHRNA ÖNCESİ	IMR32 RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER (R)			
	IMR32 (R)	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB
MYCN	5,7724	3,6163	2,2752	2,5700	4,2323
CMYB	0,0585	0,0000	0,0013	0,0000	0,0107
HL3MBTL	0,0171	0,0000	0,0000	0,0047	0,0318
E2F1	0,4100	0,0226	0,0521	0,0080	0,1683
BMYB	3,5713	0,1542	1,0430	0,6365	1,6853
HCDT1	0,5622	1,8559	0,2945	1,2178	1,9762
GEMININ	0,6312	12,922	1,8223	3,6103	5,6851
P21	0,1859	0,0436	0,0019	0,0132	0,0111
HPRT1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
MYCN/P53 DNA Kopya Sayısı (R)	537,29	246,53	661,93	526,11	442,2

Tablo 16: IMR32`de RNA susturması öncesinde ve sonrasında mRNA ekspresyonları ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri.

IMR32 hücre hattında Lightcycler 2.0`dan Cp değerleri elde edildikten sonra PCR amplifikasyon etkinlik değerleri hesaplandı. IMR32 hücre hattında shRNA sonrasında da öncesinde olduğu gibi MYCN ve p53 genomik DNA kopya sayıları için E değerleri sadece LinReg PCR yöntemiyle hesaplandı.

IMR32 hücre hattında elde edilen sonuçlar incelendiğinde; c-myb geni mRNA`nın baskılanması ile SIMA`da olduğu gibi MYCN ekspresyonunda azalma görüldü. Bu azalma % 37,43 olarak saptandı. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı ise % 54,11 azaldı. HL3MBTL ve E2F1 shRNA uygulamalarından sonra sırasıyla % 60,65 ve % 55,45 oranlarında MYCN ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu gözlemlendi. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı, HL3MBTL sh-RNA uygulandıktan sonra % 23,19 artarken, E2F1 shRNA uygulandıktan sonra % 2,08 azaldı. B-myb geni baskılandığında ise; MYCN ekspresyonu % 26,68 oranında azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı da % 17,69 azaldı.

IMR32 c-myb shRNA Sonrasında MYCN ve p53 Geni Amplifikasyon Eğrileri

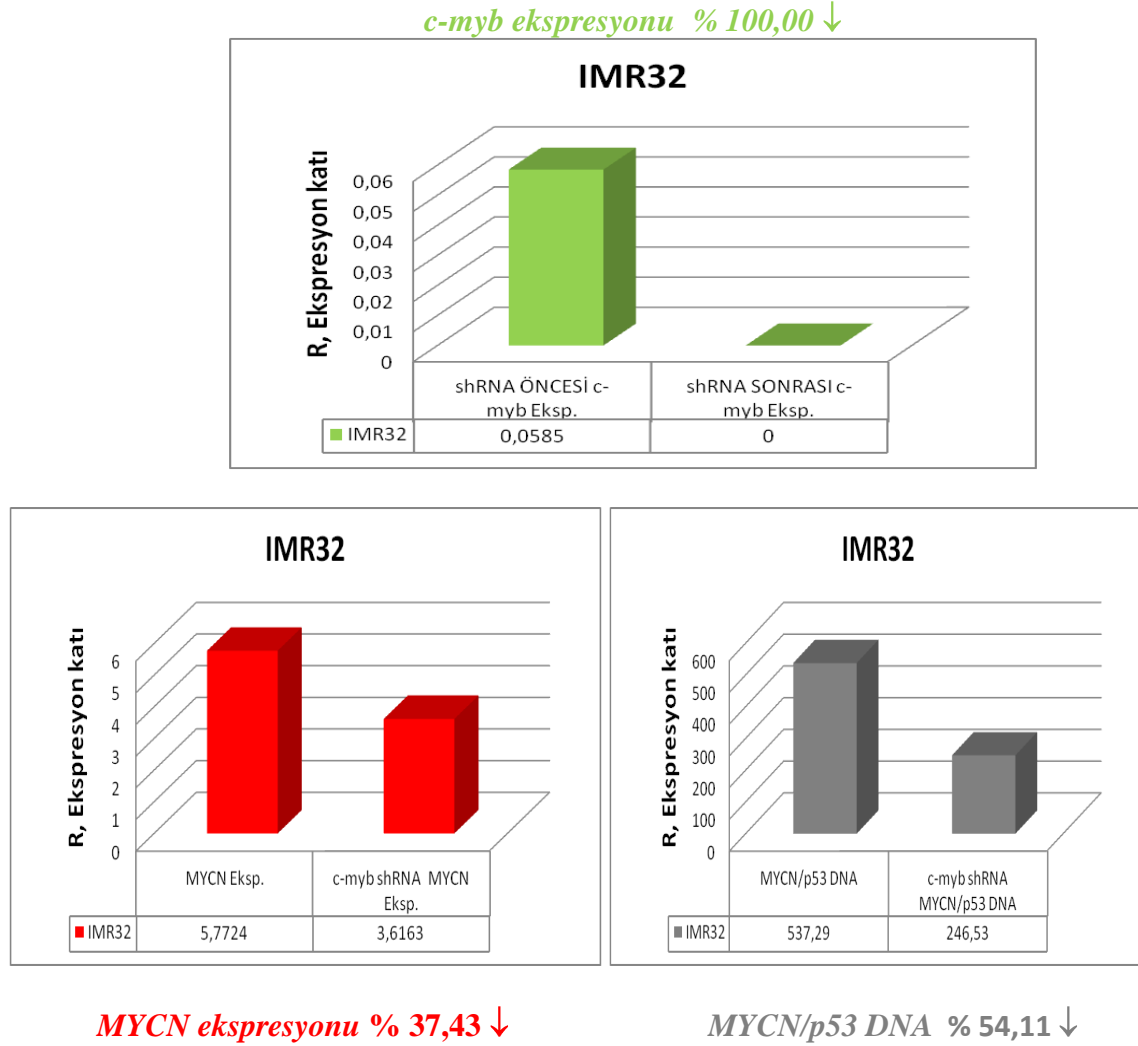


Şekil 48: IMR32 c-myb RNA susturulması sonrasında MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 amplifikasyon eğrileri.

Şekil 48`de IMR32 c-myb shRNA sonrasında elde edilen MYCN ve p53 DNA PCR amplifikasyon eğrileri görülmektedir. Çalışma üç kere tekrarlandı. Lightcycler 2.0`dan alınan Cp değerlerinin ortalamaları alındı. MYCN için Cp= 25,11; p53 için Cp= 32,69 olarak saptandı. LinReg PCR programında MYCN için E=1,602, p53 için E=1,500 olarak hesaplandı.

Bu E değerlerinden IMR32 hücre hattında, MYCN/ p53 DNA kopya sayısı oranı c-myb geni susturulmasından sonra R=246,53 olarak bulundu. Sonuç olarak; MYCN/P53 DNA kopya sayısı oranı c-myb susturulmasından sonra 537,29`dan 246,53`e düştü.

Bu durumda Kelly ve SIMA'nın aksine IMR32'de c-myb geni mRNA'sı % 100,00 oranında baskılandığında MYCN ekspresyonu % 37,43 azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı da % 54,11 azaldı (Şekil 49).



Şekil 49: IMR32'de c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.

MHH-NB-11 hücre hattında da c-myb, HL3MBTL, E2F1 ve b-myb dahil dört gende RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturmadan sonra yapılan gerçek zamanlı PCR deneylerinin sonuçları Tablo 17'de görülmektedir.

MHH-NB-11 Hüce Hattı shRNA Sonrası Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

GENLER	MHH-NB-11 RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER						
	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB	HCDT1	GEMININ	P21
MYCN	30,25 1,814 1,4559	29,68 1,762 1,6841	28,71 1,800 2,2769	30,88 1,837 5,8898	X	X	X
CMYB	>40 1,495 0,0030	>40 1,445 0,0029	>40 1,418 0,0025	39,0 1,088 0,0564	X	X	X
HL3MBTL	Neg. 1,046 0,0000	37,15 1,377 0,0192	36,03 1,612 0,0184	35,20 1,417 0,3055	X	X	X
E2F1	34,45 1,529 0,0954	33,76 1,489 0,1249	33,08 1,536 0,1347	36,10 1,500 0,1630	X	X	X
BMYB	30,50 1,543 1,1894	30,34 1,483 1,0509	29,73 1,545 1,0989	32,51 1,529 1,6388	X	X	X
HCDT1	31,27 1,840 0,6942	31,56 1,761 0,4481	30,32 1,780 0,7356	32,75 1,736 1,4486	X	X	X
GMN	30,16 1,142 1,3657	29,97 1,142 1,2570	29,62 1,129 1,1372	31,55 1,147 2,4578	X	X	X
P21	>40 1,425 0,0037	37,91 1,284 0,0154	>40 1,494 0,0020	37,50 1,196 0,1018	X	X	X
HPRT1	30,77 1,712 1,0000	30,42 1,723 1,0000	29,88 1,764 1,0000	33,27 1,67 1,0000	X	X	X
MYCN/P53	25,60/ 34,76	27,07/ 36,41	-	28,76/ 37,79	X	X	X
	1,576/ 1,639	1,905/ 1,5	-	1,84/ 1,45	X	X	X
	478,75	2114,85	-	1640,26	X	X	X

Tablo 17: MHH-NB-11 hüce hattında dört gen susturulmalarından sonra elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri ve MYCN/p53 DNA kopya sayıları oranları. Tablo` da birinci satırlar Cp oranlarını, ikinci satırlar E değerlerini, üçüncü satırlar R katlarını göstermektedir. X: HCDT1, geminin, p21 genlerinde shRNA dizilerinin vektörleri çalışmadı.

MHH-NB-11`de shRNA öncesi ve sonrası R değerlerinin karşılaştırılması

GEN ADI	SHRNA ÖNCESİ	MHH-NB-11 RNA SUSTURMASI UYGULANAN GENLER (R)			
	MHH NB-11 (R)	CMYB	HL3MBTL	E2F1	BMYB
MYCN	4,3746	1,4559	1,6841	2,2769	5,8898
CMYB	0,0219	0,0030	0,0029	0,0025	0,0564
HL3MBTL	0,0265	0,0000	0,0192	0,0184	0,3055
E2F1	1,1844	0,0954	0,1249	0,1347	0,1630
BMYB	5,5817	1,1894	1,0509	1,0989	1,638
HCDT1	1,0970	0,6942	0,4481	0,7356	1,448
GEMININ	0,2594	1,3657	1,2570	1,1372	2,457
P21	0,0121	0,0037	0,0154	0,0020	0,1018
HPRT1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
MYCN/p53 DNA Kopya Sayısı (R)	2201,20	478,75	2114,85	-	1640,26

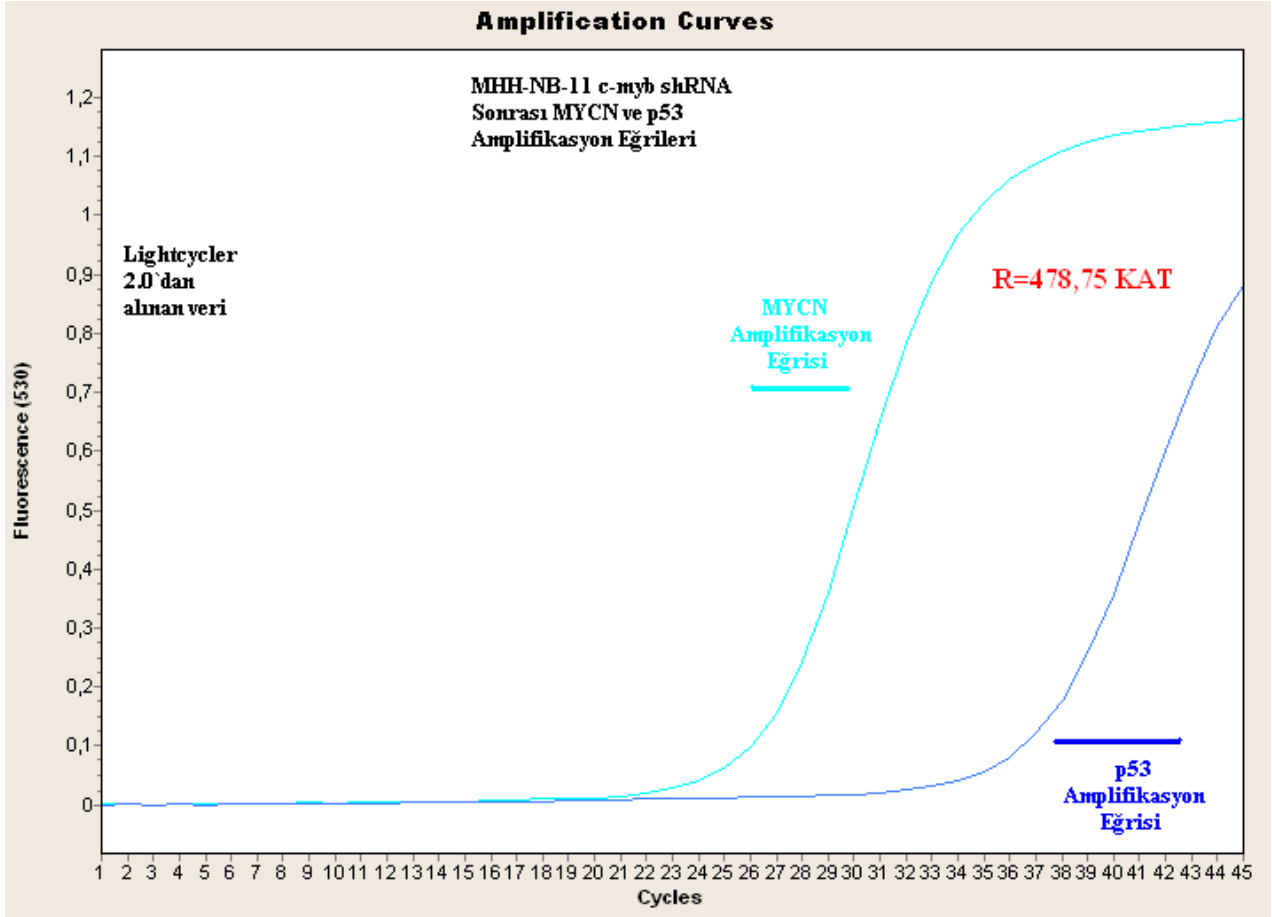
Tablo 18: MHH-NB-11`de RNA susturması öncesinde ve sonrasında mRNA ekspresyonları ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarının R değerleri.

Tabloda hücre hattındaki mRNA ekspresyon düzeyleri ile MYCN/p53 kopya sayısı oranları verildi. Ayrıca Tablo 18`de MHH- NB-11`de susturma öncesinde ve sonrasında gen ekspresyonlarının ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları birbiriyle kıyaslanarak verildi. MHH-NB-11 hücre hattında Lightcycler 2.0`dan Cp değerleri elde edildikten sonra PCR amplifikasyon etkinlik değerleri belirlendi. MYCN ve p53 genomik DNA kopya sayılarının belirlenmesi için E değerleri sadece LinReg PCR yöntemiyle hesaplandı.

MHH-NB-11 hücre hattında elde edilen sonuçlar incelendiğinde; c-myb mRNA` sı baskılandığında, SIMA ve IMR32` de olduğu gibi MYCN ekspresyon düzeyi önceki durumuna göre % 66,81 oranında azaldı. MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı da % 78,25 azaldı. HL3MBTL ve E2F1` in mRNA`ları üzerinde susturma meydana getirildiğinde ise sırasıyla % 61,55 ve % 48,05 düzeyinde MYCN ekspresyonunda azalmalar belirlendi. HL3MBTL shRNA uygulamasından sonra MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 3,92 azaldı. B-myb mRNA` sı

baskılandığında, MYCN ekspresyon düzeyi % 34,63 artarken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı % 25,48 azaldı.

MHH-NB-11 c-myb shRNA Sonrasında MYCN ve p53 Geni Amplifikasyon Eğrileri

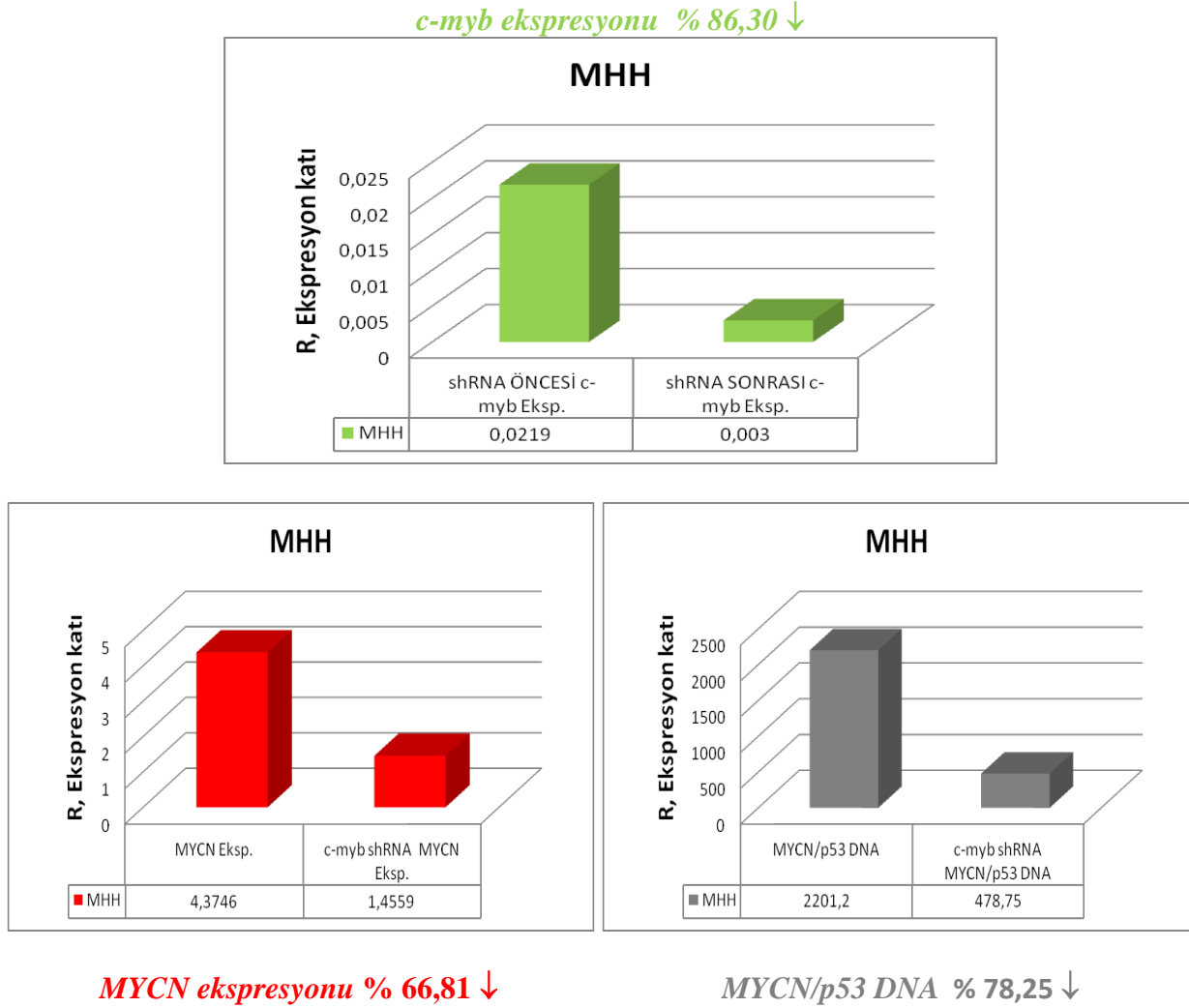


Şekil 50: MHH-NB-11 c-myb RNA susturulması sonrasında MYCN ve p53 DNA gerçek zamanlı PCR deneyinden elde edilen Lightcycler 2.0 Amplifikasyon eğrileri.

Şekil 50`de MHH-NB-11 c-myb shRNA sonrasında elde edilen MYCN ve p53 DNA PCR amplifikasyon eğrileri görülmektedir. Çalışma üç kere tekrarlandı. Lightcycler 2.0`dan alınan Cp değerlerinin ortalamaları alındı. MYCN için Cp= 25,60; p53 için Cp= 34,76 olarak saptandı. LinReg PCR programında MYCN için E=1,576, p53 için E=1,639 olarak hesaplandı.

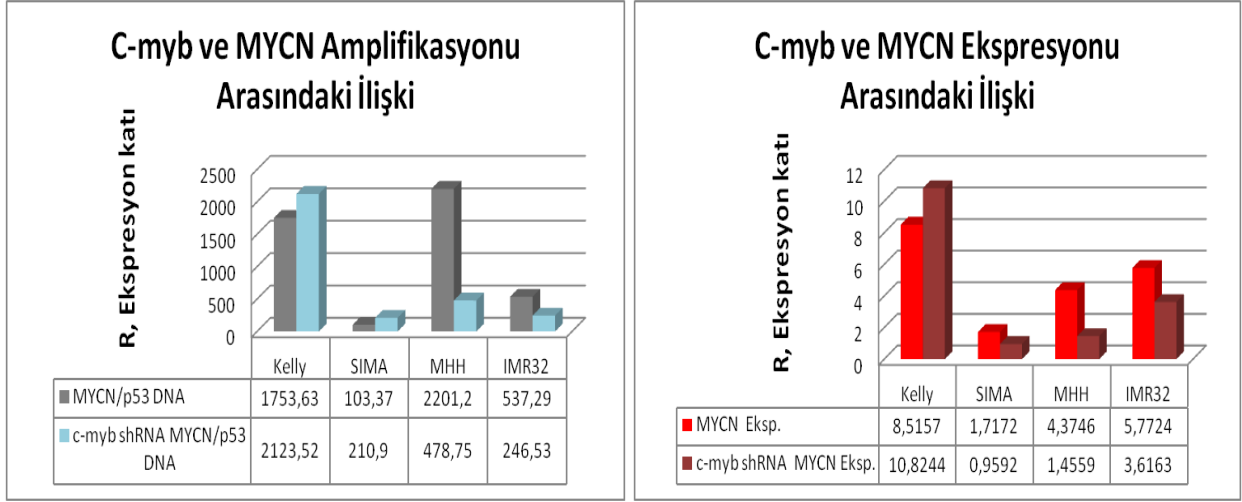
Bu E değerlerinden MHH-NB-11 hücre hattında, MYCN/ p53 DNA kopya sayısı oranı c-myb geni susturulmasından sonra R=478,75 olarak bulundu. Sonuç olarak; MYCN/P53 DNA kopya sayısı oranının c-myb susturulmasından sonra R= 2201,20`den, 478,75`e düştü.

Bu durumda MHH-NB-11`de c-myb ekspresyonu % 86,30 oranında baskılandığında MYCN ekspresyonu % 66,81 azalırken MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı da % 78,25 azaldı (Şekil 51).



Şekil 51: MHH-NB-11`de c-myb susturulması öncesinde ve sonrasında MYCN ekspresyonu ile MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı.

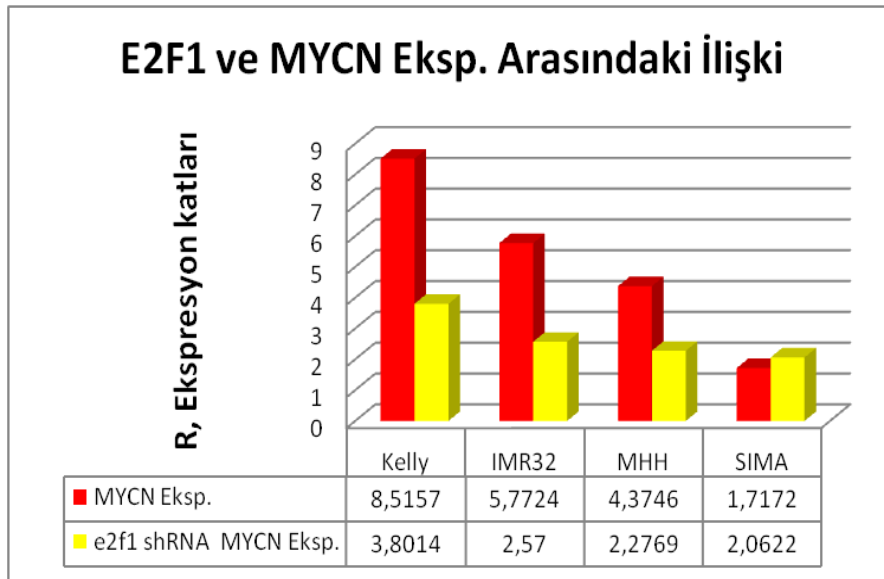
Tüm dört hücre hattında c-myb geni ile MYCN ekspresyonları ve MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları arasındaki ilişkiler değerlendirildi (Şekil 52).



Şekil 52: Kelly, SIMA, MHH-NB-11, IMR32`de c-myb shRNA öncesinde ve sonrasında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları ile MYCN ekspresyonları.

Bu sonuçlar incelendiğinde, c-myb ekspresyonunun baskılanmasıyla Kelly`de hem MYCN ekspresyonu hem de DNA amplifikasyonu arttı. SIMA`da MYCN ekspresyonu düşerken DNA amplifikasyonu arttı. MHH ve IMR32`de hem MYCN ekspresyonu hem de DNA amplifikasyonu azaldı. SIMA hariç diğer üç hücre hattında MYCN ekspresyonu ile MYCN Amplifikasyonu paralel olarak değişim gösterdi.

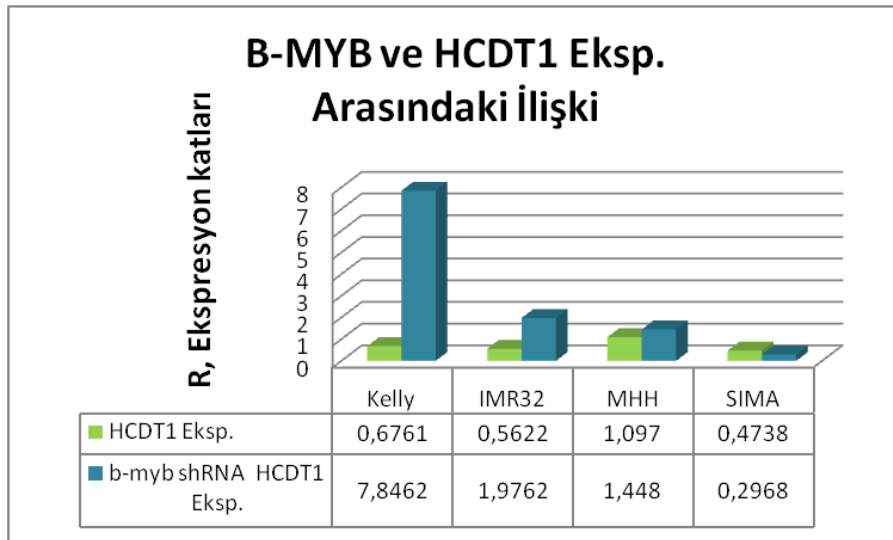
Tüm dört hücre hattında E2F1 ve MYCN ekspresyonunun ilişkisi de incelendi (Şekil 53).



Şekil 53: MYCN amplifiye hücre hatlarında E2F1 shRNA uygulamasından sonra MYCN ekspresyonlarındaki değişimler.

E2F1 baskılandığında, MYCN onkogeninin amplifiye olduğu Kelly, IMR32 ve MHH-NB-11 hücre hatlarında MYCN ekspresyonu azaldı. SIMA hücre hattında ise artış görüldü. Şekilde görüldüğü gibi, E2F1 baskılandığında; MYCN ekspresyonu Kelly`de % 55,36, IMR32`de % 55,47, MHH-NB-11`de % 47,95 azalırken, SIMA`da % 20,09 arttı.

Ayrıca b-myb ve HCDT1`in birbiriyle olan ilişkileri de incelendi (Şekil 54). Kelly hücre hattında, b-myb baskılandığı zaman HCDT1 mRNA düzeyinde 11,6 kat artış gösterdi. SIMA`da ise b-myb baskılandığı zaman, HCDT1 mRNA ekspresyonu % 37,35 oranında Kelly`nin aksine düşüş gösterdi. IMR32`de ise Kelly`de olduğu gibi b-myb baskılandığında, HCDT1 mRNA düzeyinde 3,51 kat arttı. Bu bulgulara göre, b-myb baskılandığında Kelly, IMR32 ve MHH-NB-11`de HCDT1 ekspresyonu artarken SIMA`da azaldı. Ayrıca b-myb baskılanmalarında Geminin mRNA`larında da artış gözlemlendi. Kelly`de 4,72 kat, SIMA`da 4,42 kat, IMR32`de 9 kat Geminin mRNA artışı gözlemlendi.



Şekil 54: MYCN amplifiye hücre hatlarında b-myb shRNA uygulamasından sonra HCDT1 ekspresyonlarındaki değişimler.

5-TARTIŞMA

Nöroblastom santral sinir sistemi dışında tutulum gösteren çocukluk çağı solid tümörleri arasında en sık görülen tümördür (20). Nöroblastom tümörlerinde çok farklı kompleks genomik değişiklikler bir arada ortaya çıkabilmektedir. Özellikle MYCN geninde kopya sayısı artışı ve 1p36 lokusunda geniş delesyonlar tek başına ya da birlikte aynı tümörde gözlenebilmektedirler (1-3). Amplifikasyon sırasında MYCN onkogeni ya bulunduğu lokusa ya da 17 gibi farklı kromozomların içine yerleşerek homojen boyanan bölgeleri (homogenously staining region, hsr) oluşturabilmektedir (1).

Diğer taraftan, MYCN geni kopyalarından oluşan küçük kromozom parçaları da (double minute) herhangi bir kromozoma yerleşmeden çekirdek içinde serbestçe yer alabilmektedir (1). Bu genomik değişikliklerin dışında 17q kazanımları ya da 11q kayıpları da tümörün kötü prognostik özellikler geliştirmesinde önemli etkenler olarak meydana gelebilmektedir. 17 q kazanımları MYCN geni amplifikasyonları ile birliktelik gösterebilirken, 11q kayıplarında literatürde böyle bir birliktelik gösterilememiştir (1).

MYCN geni amplifikasyonlarının nöroblastom tümörlerinde % 20 oranında görülebilmesine rağmen hala bu onkogenin neden kopya sayısını artırdığı tam olarak çözülebilmemiş değildir. Ancak yine de bazı hipotezler öne sürülmüştür (17). Örneğin; replikasyon sırasında MYCN`in art arda kopyalanma işleminin tekrarlandığı ve yeni bir kromozomal bölgeye yerleştiği konusunda bir hipotez vardır. Bir diğer hipoteze göre ise, 2p24 lokusunda eşit olmayan kardeş kromatid değişimi ile MYCN`in tandem gen artışına yol açtığı ve sonraki gen amplifikasyonunu indüklediği öne sürülmüştür (1).

Gen amplifikasyonları, insan genomu dışındaki farklı organizmalarda da çeşitli şekillerde oluşabilmektedir (4,5). Özellikle meyve sineği *Drosophila melanogaster`de gelişime bağlı olarak X ve 3. kromozomlarında yerleşmiş chorion genlerinde, çeşitli amfibi oositlerine ait*

rRNA genlerinde ve avian miyogenezisi sırasında aktin genlerinde amplifikasyon meydana gelmektedir (4).

Drosophila chorion geni amplifikasyonu ile ilgili deneysel çalışmalarda, ACE3 adı verilen dizilerin bir amplifikasyon kontrol merkezini oluşturduğu rapor edilmiştir (7). Ayrıca Chorion genleri önünde ACE3 dizisine myb adı verilen bir transkripsiyon faktörünün ve ilgili protein kümesinin bağlandığı bildirilmiştir (8). Bu çalışmada myb ve ilgili başka proteinlerin birlikte küme halinde ACE3 dizisine özgül olarak bağlanıp chorion geninin kopya sayısı artışını düzenlediği belirlenmiştir. Bu küme içinde yer alan tüm proteinler belirli olmamasına rağmen myb ve E2F1'in bulunduğu bir kompleks proteinler grubunun chorion amplifikasyonunu pozitif yönde indüklediği gösterilmiştir (8). Aynı çalışmada, chorion amplifikasyonunu negatif yönde etkileyen kümede myb ile E2F2 ve l(3)mbt'nin de yer aldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, *Drosophila*'da myb'in kümenin her iki fonksiyonu için ACE3'e bağlandığı dikkati çekmektedir.

Acaba insan genomunda da myb kümesine benzer şekilde bir protein kompleksi gen amplifikasyonların da devreye giriyor olabilir mi? Bu tez çalışmasında, myb ve E2F1'in insanda da yer alan ortologlarının MYCN geni amplifikasyonu ile ilişkileri araştırıldı. Bu amaçla, Kelly, Imr32, MHH-NB-11 ve SIMA hücre hatlarında; c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve kontrol olarak EGFP'nin spesifik shRNA dizileri ile bağlanmış vektör sistemleriyle RNA susturulması gerçekleştirildi. Susturulmadan sonra MYCN, c-myb, HL3MBTL, E2F1, hCdt1, p21, Geminin, b-myb ve referans HPRT1 genlerin de mRNA ekspresyon düzeyleri ve ayrıca MYCN/p53 genomik DNA kopya sayısı oranları gerçek zamanlı PCR deneyleriyle yeniden belirlendi. Ölçüm sonuçlandıktan sonra RNA susturulmasından önceki ekspresyon düzeyleriyle ve genomik DNA kopya sayıları arasında karşılaştırmalar

yapıldı. Her bir hücre hattında ilgili genlerde gerçekleştirilen RNA susturulması öncesinde ve sonrasında elde edilen ortalama Cp, E ve R değerleri birlikte kıyaslanarak değerlendirildi.

Bu sonuçlara göre, Kelly hücre hattında c-myb geni mRNA'sı baskılandığı zaman, MYCN ekspresyonu shRNA öncesindeki düzeyine göre % 27,14 oranında arttı. SIMA hücre hattında ise; c-myb geni mRNA'sının baskılanması ile MYCN ekspresyonunda Kelly'nin aksine % 44,44 oranında azalma meydana geldi. IMR32 hücre hattında; c-myb geni mRNA'sının baskılanması ile SIMA'da olduğu gibi MYCN ekspresyonunda azalma görüldü. Bu azalma % 37,43 olarak saptandı. MHH-NB-11 hücre hattında c-myb mRNA'sı üzerinde susturma meydana getirildiğinde, SIMA ve IMR32'de olduğu gibi MYCN ekspresyon düzeyi önceki durumuna göre % 66,81 oranında azaldı. Bu durumda, c-myb ekspresyonu baskılandığında, SIMA, IMR32, MHH-NB-11'de MYCN ekspresyonunda azalma olurken Kelly'de artma oldu. Bu sonuçlar dikkate alındığında, c-myb ve MYCN ekspresyonları arasında bir ilişkinin olduğu görülmektedir. Ancak tüm dört hücre hattında, c-myb'nin baskılanmasıyla aynı yönde MYCN ekspresyonları değişmemiştir. Dolayısıyla acaba bu değişimlerin MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranlarıyla da bir ilgisi var mıdır, sorusu akla gelmektedir.

Bu soruya yanıt verebilmek için, tez çalışmasında hücre hatlarında MYCN/p53 kopya sayısı oranları da belirlendi. Buna göre Kelly'de c-myb susturulmasından önce, MYCN/p53 oranı 1753,63 kat olarak saptanırken, c-myb susturulmasından sonra bu oranın 2123,52'ye çıktığı belirlendi. Bu durumda Kelly'de c-myb baskılandığında MYCN/p53 kopya sayısı oranının % 21,09 arttığı görülmektedir. Aynı hücre hattında c-myb'nin baskılanmasıyla MYCN ekspresyon düzeyide % 27,14 oranında arttı. Hem MYCN geninin DNA düzeyinde kopya sayısının hem de mRNA düzeyinde ekspresyonunun birbirine yakın oranda artmış olması, ilave kopyaların transkripsiyonel olarak aktif olabileceğini akla getirmektedir.

SIMA`da da Kelly`de olduğu gibi, MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranında artış gözlemlendi. Buna sonuca göre MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı, c-myb susturulmasından önce 103,37 iken susturulmadan sonra 210,90 oldu. Bu yükselme % 104,02 olarak gerçekleşti. Ancak SIMA`da c-myb baskılanmasıyla, MYCN geni mRNA düzeyinde ekspresyonunu % 44,44 oranında azalttı. SIMA`da MYCN ekspresyonu ile genin kopya sayısı artışı arasında Kelly`de olduğu gibi bir paralellik görülmedi.

IMR32` de ise Kelly ve SIMA`nın aksine MYCN/P53 DNA kopya sayısı oranının c-myb susturulmasından sonra azaldığı saptandı. Buna göre, c-myb`nin susturulmasından önce oran 537,29 iken susturulmadan sonra 246,53 oldu. Bu azalma % 54,11 olarak gerçekleşti. IMR32`de MYCN ekspresyonu da % 37,43 oranında azaldı. IMR32` de c-myb` nin baskılanması durumunda hem MYCN DNA kopya sayısı hem de mRNA ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Bu sonuca göre, Kelly`de olduğu gibi IMR32`de de MYCN geni kopya sayısı ile ekspresyon düzeyi arasında bir paralellik dikkati çekmektedir.

MHH-NB-11`de de c-myb mRNA`sı üzerinde susturmanın gerçekleştirilmesinden sonra, IMR32`de olduğu gibi MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı azaldı. Buna göre, c-myb susturulmasından önce oran 2201,20 iken susturulmadan sonra 478,75 oldu. Bu gerileme % 78,25 olarak gerçekleşti. MHH-NB-11 hücre hattında c-myb mRNA` sı üzerinde susturma meydana getirildiğinde, MYCN ekspresyon düzeyi de % 66,81 oranında azaldı. Bu sonuca göre, Kelly ve IMR32`de olduğu gibi MHH-NB-11 hücre hattında da, MYCN geni kopya sayısı ile ekspresyon düzeyi arasında bir paralellik kurulabilmektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar incelendiğinde, c-myb ekspresyonunun hem MYCN amplifikasyonu hem de ekspresyonu ile ilişkili olabileceği görüldü. Bununla birlikte c-myb`nin nöroblastom`da prognostik bir değeri olmadığı rapor edilmişti (21). Ancak diğer taraftan *Drosophila*`da ise chorion geni amplifikasyonunda insan c-myb proteini ile ilişkili myb`in

hem genin kopya sayısı artışını indükleyen hem de baskılayan kümede yer aldığı gösterilmişti (8).

Bu tezin sonuçlarına göre, MYCN amplifiye nöroblastom hücre hatlarında c-myb baskılandığında, MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı, Kelly ve SIMA`da artarken IMR32 ve MHH-NB-11`de azaldı. Bu durumda, *Drosophila`da myb proteininde olduğu gibi c-myb`de hücre içindeki şartlara göre MYCN geni kopya sayısında iki yönlü etki gösteriyor olabilir. Ayrıca c-myb dışında olası kümede yer alabilecek farklı protein ya da proteinler de MYCN amplifikasyonunun iki yönlü olarak düzenlenmesini sağlayabilirler. Bu tezde elde edilen bulgulara göre, Kelly ve SIMA`da c-myb`nin MYCN geni kopya sayısını azalma yönünde, IMR32 ve MHH-NB-11`de artma yönünde etkilediği görüldü. Bu durumda; acaba MYCN amplifikasyonunun her iki yönde düzenlenebilmesi için c-myb DNA üzerinde farklı bölgelere mi bağlanıyor, sorusu akla gelmektedir. Bu tez çalışmasında, kromatin immünopresipitasyonla c-myb ve E2F1 antikoları kullanılarak DNA`lar elde edildi. Ancak bu antikoların bağlandığı bölgeyi tespit etmek için DNA kütüphanesinin oluşturulması ve CHIP`e özel dizilendirilmenin yapılması gerekmektedir. Daha sonraki hedeflerden biri, nöroblastom hücre hatlarında DNA üzerinde c-myb`nin bağlandığı olası dizinin tanımlanabilmesidir.*

Bu tez çalışmasında, Kelly`de b-myb baskılanması durumunda da c-myb shRNA sonrası durum gibi MYCN ekspresyon düzeyinde artış görüldü. Bu artış % 115,39 oranında gerçekleşti. SIMA hücre hattında ise b-myb mRNA` sı üzerinde shRNA baskılanması uygulanınca % 14,61 oranında MYCN ekspresyonunun yine arttığı belirlendi. IMR32 hücre hattında ise Kelly ve SIMA`nın tersine b-myb geni baskılandığında; MYCN ekspresyonu % 26,68 oranında azaldı. MHH-NB-11`de b-myb shRNA uygulandığında, % 34,63 MYCN ekspresyonu arttı. B-myb mRNA`nın baskılandığı hücre hatlarında, MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranları incelendiğinde, Kelly`de bu oranın 1519,75`ten 858,79`a gerilediği görüldü. SIMA`da

140,64`den 108,8`e, IMR32`de 537,29`dan 442,2`ye geriledi. MHH-NB-11`de 2201,2`den 1640,26`ya geriledi. Bu sonuçlar dikkate alındığında; nöroblastom hücre hatlarında b-myb baskılanması durumunda, IMR32 dışında MYCN ekspresyonu artarken DNA kopya oranları dört hücre hattında da geriledi.

Megakaryoblastlarda b-myb aşırı eksprese olduğunda hem S- fazına geçen hücre sayısı hem de endoreplikasyona uğrayan hücrelerin arttığı rapor edilmiştir (26). Megakaryoblastların terminal farklılaşmaları sırasında poliploidizasyona uğramaları olağan bir süreçtir. Bu hücrelerde b-myb baskılandığında ise S-fazına ilerleyen hücrelerde bir düşüş ile endoreplike olan DNA sentezinde bir azalma gözlenmektedir. Bu durumda mitozaya giren hücre sayısında artışla birlikte megakaryoblastlarda kromozomal instabilite de görülmektedir. Bu tez çalışmasında da megakaryoblastlarda ki endoreplike olan DNA`daki azalma gibi, b-myb baskılandığında tüm dört hücre hattında da MYCN/p53 DNA kopya sayılarında azalma görüldü. Tez çalışmasının bu sonuçları dikkate alındığında b-myb`nin MYCN ekspresyonu ile IMR32 hariç ters orantılı bir ilişkide olduğu, tüm dört hücre hattında MYCN/p53 DNA kopya sayısı ile doğru orantılı olduğu görüldü.

Ayrıca Kelly hücre hattında, b-myb baskılandığı zaman hCdt1 mRNA düzeyinde 11,6 kat artış gösterirken, SIMA`da, hCdt1 mRNA ekspresyonu % 37,35 oranında Kelly`nin aksine düşüş gösterdi. IMR32`de ise Kelly`de olduğu gibi b-myb baskılandığında, hCdt1 mRNA düzeyinde bir artış görüldü. Bu artış 3,51 kat olarak gerçekleşti. MHH-NB-11`de ise 1,31 kat hCdt1 ekspresyonu arttı. hCdt1`de shRNA sekansı hücre hatlarında ikişer defa transfekte edilmesine rağmen çalışmadı. Bu yüzden tersi durumda b-myb ekspresyonlarının nasıl etkilendiği incelenemedi. Bu tez çalışmasında, RNA susturulması öncesindeki gerçek zamanlı PCR deneylerinin sonuçları b-myb ve hCdt1 ekspresyonlarının birbiriyle ilişkili olabileceğini işaret ediyordu. B-myb baskılandığında hCdt1 ekspresyonu, Kelly, IMR32 ve MHH-NB-11`de

artarken SIMA`da azaldı. RNA susturulduktan sonra elde edilen sonuca göre de hCdt1`in SIMA dışında diğer hücre hatlarında b-myb`nin hedef geni olabileceğini akla getirmektedir.

Ayrıca b-myb baskılanmalarında, tüm dört hücre hattında Geminin mRNA`larında artış gözlemlendi. Kelly`de 4,72 kat, SIMA`da 4,42 kat, IMR32` de 9 kat, MHH`de 9,47 kat Geminin mRNA artışı görüldü. Bu sonuca göre b-myb baskılanmasından sonra hem hCdt1 hem de geminin SIMA hücre hattı hariç diğer üç hücre hattında da artmıştır. HCdt1 proteini, hücrelerin G1 evresinde oluşan prereplikatif kompleksin (pre-RC) bir üyesidir (12). Bir kez replikasyon orijininin DNA sentezi başlarsa hücrede ipliğin tekrar sentez edilmesini önlemek üzere SiklinA/cdk2 kompleksi ile hCdt1`in N ucu fosforillenir (10,12). Fosforilasyondan sonra hCdt1 degrade olur. İnsanlarda hCdt1 kontrolü Geminin ile de sağlanmaktadır. Geminin, hCdt1`i baskılayan bir inhibitördür (12). Dolayısıyla varolan tez çalışmasında Geminin ile hCdt1`in birlikte ekspresyon düzeylerinin artması Gemininin nöroblastom hücre hatlarında hCdt1 inhibitörü olarak iş görmüş olabileceğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte çeşitli kanser hücre hatlarında (Saos, MDAMB231, Hela, MCF7, Lncap, HT1080 ve U2OS), ve bir primer hücre hattında da (human foreskin fibroblasts, HFF) hCdt1/Geminin ekspresyon oranları incelenmiştir (14). Bu incelemeden sonra tümörojenik hücre hatlarında, primer HFF hücre hatlarına göre hCdt1/Geminin ekspresyon oranlarının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, HCdt1/Geminin protein ve mRNA ekspresyon oranlarının tümörün tipi, agresif seyri ya da moleküler patolojisiyle ilgili olabileceği öngörülmüştür. Bir diğer çalışmada memeli kanser hücrelerinde, yüksek hCdt1/Geminin oranının re-replikasyona neden olduğu rapor edilmiştir (15). Ayrıca hCdt1`in fare aday ortoloğu olan Ris-2 proteininin onkojenik potansiyel gösterdiği için hCdt1`in de memelilerde onkogen olarak fonksiyon gösterebileceğine işaret edilmiştir (16). Tezde elde edilen bulgular dikkate alındığında

da, MYCN amplifiye olan hücre hatlarında hCdt1 ve Geminin birbiriyle ilişkili olabileceği görülüyor.

Bu tez çalışmasında; c-myb baskılandığı zaman Kelly`de b-myb azalırken (% 53,56) hem hCdt1 (1,54 kat) hem Geminin (1,15 kat) ekspresyonu artmıştır. SIMA`da b-myb azalırken (% 76,02) hCdt1`de azaldı (% 29,73). Aynı hücre hattında Geminin 5,56 kat arttı. IMR32`de b-myb azalırken (% 95,68) hem hCdt1 (3,3 kat) hem de Geminin (20,47 kat) ekspresyonu artmıştır. MHH-NB-11`de de SIMA`da olduğu gibi b-myb ekspresyonu azalırken (% 78,69) hCdt1 (% 36,71) ekspresyonunda azaldı. Bu hücre hattında da Geminin (5,26 kat) ekspresyonu arttı. Burada tüm dört hücre hatında da c-myb baskılandığında b-myb ekspresyonu azalmıştır. C-myb ve b-myb ekspresyon düzeylerinin hücrelerde birlikte kontrol ediliyor olabileceği akla gelmektedir.

E2F1 baskılandığında; MYCN ekspresyonu Kelly`de % 55,36, IMR32`de % 55,47, MHH-NB-11`de % 47,95 azalırken, SIMA`da % 20,09 arttı. E2F1`in MYCN ekspresyonunu promoter üzerinden indüklediği daha önce rapor edilmişti (32). Bu tez çalışmasındaki bulgulara göre de Kelly, IMR32 ve MHH-NB-11`de E2F1 ve MYCN ekspresyonunun birbiriyle ilişkili olabileceği akla gelmektedir. Bu durumda E2F1 nöroblastom tümörlerinde MYCN ekspresyonunu düzenliyor olabilir.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasının bulguları nöroblastom MYCN amplifiye hücre hatlarında c-myb proteini ile MYCN gen amplifikasyonunun ilişkili olduğunu ortaya koydu. Bu yüzden nöroblastom tedavisinde c-myb geni bir ilaç hedefi olarak seçilebilir. Diğer taraftan, genomda mutasyonların tersinir olmadığı kabul edilir. Gen amplifikasyonları da mutasyonel bir değişimdir. Bu tez çalışmasının sonucuna göre; mutasyonların da tersinir olabileceği akla gelmektedir.

6-SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; MYCN geni amplifikasyonu ile ilişkili olarak c-myb transkripsiyon faktörünün ilişkili olabileceği görülmektedir. RNA susturulması sonucunda c-myb'nin hem MYCN'nin kopya sayısı ile hem de mRNA ekspresyonu ile ilişkili bulunduğu belirlendi. Bu bulgulara göre, Kelly hücre hattında c-myb geni mRNA'sı baskılandığında, MYCN ekspresyonu shRNA öncesindeki düzeyine göre % 27,14 oranında arttı. SIMA hücre hattında ise; c-myb geni mRNA'sının baskılanması ile MYCN ekspresyonu Kelly'nin aksine % 44,44 oranında azaldı. IMR32 hücre hattında; c-myb geni mRNA'sının baskılanması ile SIMA'da olduğu gibi MYCN ekspresyonunda % 37,43 oranında azalma saptandı. MHH-NB-11 hücre hattında c-myb shRNA gerçekleştirildikten sonra, SIMA ve IMR32'de olduğu gibi MYCN ekspresyon düzeyi önceki durumuna göre % 66,81 oranında azaldı.

Ayrıca hücre hatlarında MYCN/p53 kopya sayısı oranları da belirlendi. Buna göre Kelly'de c-myb susturulmasından önce, MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı 1753,63 kat olarak saptanırken, susturulmadan sonra bu oranın 2123,52'ye çıktığı belirlendi. Bu durumda Kelly'de c-myb baskılandığında % 21,09 oranında MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranının arttığı görülmektedir. Kelly'de MYCN ekspresyon düzeyinde % 27,14 artmıştır. Artış yüzdesinin birbirine yakın olması MYCN geninde artan kopya sayılarının transkripsiyonel olarak aktif olabileceğini akla getirmektedir.

SIMA'da da Kelly'de olduğu gibi MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranında artış gözlemlendi. Buna göre, c-myb susturulmasından önce, MYCN/p53 oranı 103,37 iken susturulmadan sonra 210,90'a yükseldiği belirlendi. Bu yükselme % 104,02 olarak gerçekleşti. Ancak SIMA'da MYCN ekspresyonu, c-myb baskılanmasıyla % 44,44 oranında azaldı. Kelly'de olduğu gibi SIMA'da MYCN ekspresyonu ile genin kopya sayısı artışı arasında bir paralellik kurmak mümkün gözükmemektedir.

IMR32` de ise Kelly ve SIMA`nın aksine MYCN/P53 DNA kopya sayısı oranının c-myb susturulmasından sonra azaldığı saptandı. Buna göre, susturmadan önce oran 537,29 iken susturulmadan sonra 246,53`e geriledi. Bu düşüş % 54,11 olarak gerçekleşti. IMR32`de MYCN ekspresyonu da % 37,43 düştü. IMR32` de c-myb` nin baskılanması durumunda, hem MYCN DNA kopya sayısı hem de mRNA ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Kelly`de olduğu gibi IMR32`de de MYCN geni kopya sayısı ile ekspresyon düzeyi arasında bir paralellik dikkati çekmektedir.

MHH-NB-11` de de MYCN/p53 DNA kopya sayısı oranı, IMR32`de olduğu gibi c-myb mRNA` sı üzerinde susturmanın gerçekleştirilmesinden sonra azaldı. Buna göre, susturmadan önce oran 2201,20 iken susturmadan sonra 478,75`e geriledi. Bu düşüş % 78,25 olarak gerçekleşti. MHH-NB-11 hücre hattında c-myb mRNA` sı üzerinde susturma meydana getirildiğinde, SIMA ve IMR32` de olduğu gibi MYCN ekspresyon düzeyide önceki durumuna göre % 66,81 oranında azaldı. Kelly ve IMR32`de olduğu gibi MHH-NB-11`de de MYCN geni kopya sayısı ile ekspresyon düzeyi arasında bir paralellik dikkati çekmektedir.

Sonuç olarak; c-myb ekspresyonunun hem MYCN amplifikasyonu hem de ekspresyonu ile ilişkili olabileceği görülmektedir. Bu yüzden nöroblastom tedavisinde c-myb geni bir ilaç hedefi olarak seçilebilir. Diğer taraftan, genomda mutasyonların tersinir olmadığı kabul edilir. Gen amplifikasyonları da mutasyonel bir değişimdir. Bu tez çalışmasının sonucuna göre; mutasyonların da tersinir olabileceği akla gelmektedir.

Bundan sonraki aşamada c-myb`nin MYCN geni kopya sayısında ve ekspresyonunun düzenlenmesinde DNA üzerinde her hangi bir bölgeye bağlanıp bağlanmadığının gösterilmesi hedeflenmektedir. Bunun için kromatin immünopresipitasyon deneyleriyle kromatine bağlı DNA` lar elde edildi. Bundan sonraki aşamada bu DNA` ların CHIP-dizilendirmesiyle genomda hangi bölge ya da bölgelere bağlandığı tespit edilecektir.

7-KAYNAKLAR

- 1-) Schwab, M. Oncogene amplification in solid tumors. *Seminars in cancer biology*, 1999; 9: 319–325.
- 2-) Raggi CC , Bagnoni ML, Tonini GP, Maggi M , Vona G , Pinzani P, Mazzocco K, De Bernardi B, Pazzagli M and Orlando C . ‘‘Real-Time Quantitative PCR for the Measurement of *MYCN* Amplification in Human Neuroblastoma with the TaqMan Detection System’’ *Clinical Chemistry* 1999, 45:1918-1924.
- 3-) George RE, Variend S, Cullinane C, Cotterill SJ, McGuckin AG, Ellershaw C, Lunec J, AD, United Kingdom Children Cancer Study Group. ‘‘Relationship between histopathological features, *MYCN* amplification, and prognosis: a UKCCSG study. United Kingdom Children Cancer Study Group.’’ *Med Pediatr Oncol*. 2001, 36:169-76.
- 4-) Albrecht, E B. Hunyady, A B. Stark, G R. And Patterson T E. ‘‘Mechanisms of *sod2* Gene Amplification in *Schizosaccharomyces pombe*.’’ *Molecular Biology of the Cell* Vol. 11, 873–886, 2000.
- 5-) Romero D, Palacios R. ‘‘Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes.’’ *Annu Rev Genet*. 1997, 31:91-111.
- 6-) Nielsen JL, Walsh JT , Degen DR, Drabek SM, McGill JR and Von Hoff DD. ‘‘Evidence of gene amplification in the form of double minute chromosomes is frequently observed in lung cancer.’’ *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1993, 65: 120-124.
- 7-) Carminati, J L. Johnston, C G. And T L. Orr-Weaver. ‘‘The *Drosophila* ACE3 Chorion Element Autonomously Induces Amplification’’ *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12:2444-2453.
- 8-) Lewis, P W. Beall, E L. Fleischer, T C, Andrew J. DG, Link and Michael R. Botchan. ‘‘Identification of a *Drosophila* Myb–E2F2/RBF transcriptional repressor complex.’’ *GENES & DEVELOPMENT* 18:2929–2940.
- 9-) M Thomer, N R. May, B D. Aggarwal, G Kwok and B R. Calvi. *Drosophila* double-parked is sufficient to induce re-replication during development and is regulated by cyclin E/CDK2. *Development* 2004, 131:4807-4818.
- 10-) H Nishitani, S Taraviras, Z Lygerou, and T Nishimoto. ‘‘The Human Licensing Factor for DNA Replication Cdt1 Accumulates in G1 and Is Destabilized after Initiation of S-phase’’. 2001, *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 44905–44911.

- 11-)** Yanagi K, Mizuno T, Tsuyama T, Tada S, Iida Y, Sugimoto A, Eki T, Enomoto T, and Hanaoka F. "Caenorhabditis elegans geminin homologue participates in cell cycle regulation and germline development." *The Journal of Biological Chemistry* 280: 19689–19694, 2005.
- 12-)** J M. Benjamin, S J. Torke, B Demeler, and T J. McGarry. "Geminin Has Dimerization, Cdt1-binding, and Destruction Domains That Are Required for Biological Activity." *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279:45957–45968.
- 13-)** L M. Quinn, A Herr, T J. McGarry, and H Richardson. "The Drosophila Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis." *GENES & DEVELOPMENT* 15:2741–2754, 2001.
- 14-)** Xouri G, Lygerou Z, Nishitani H, and co-workers. Cdt1 and geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271:3368–3378.
- 15-)** Arentson E, Faloon P, Seo J, and co-workers. Oncogenic potential of the DNA replication licensing protein CDT1. *Oncogene*, 2002; 21:1150-8.
- 16-)** Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, and co-workers. A p53-dependent checkpoint pathway prevents re-replication. *Molecular Cell*, 2003; 11:997-1008.
- 17-)** Hansford LM. , Thomas WD., Keating JM., Burkhart CA., Peaston AE., Norris , MD. Haber M, Armati PJ., Weiss WA., and Marshall GM. "Mechanisms of embryonal tumor initiation: Distinct roles for MycN expression and MYCN amplification." *PNAS* 2004, 101: 12664-12669.
- 18-)** Davidson CJ, Tirouvanziam R, Herzenberg LA, Lipsick JS. "Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements Drosophila Myb in hemocytes." *Genetics* 2005, 169: 215-229.
- 19-)** Attwooll C, Denchi EL and Helin K. "The E2F family: specific functions and overlapping interests." *The EMBO Journal*, 2004, 23: 4709–4716.
- 20-)** *Turkiye Klinikleri J Pediatr Özel Dergi*, 2;885-892, 2004.
- 21-)** Giuseppe Raschella, Vincenzo Cesi, Roberto Amendola, Anna Negroni, Barbara Tanno, Pierluigi Altavista, Gian Paolo Tonini, Bruno De Bernardi, ve Bruno Calabretta (1999). Expression of B-myb in Neuroblastoma Tumors Is a Poor Prognostic Factor Independent from MYCN Amplification. *Cancer Research* 59: 3365-3368.
- 22-)** Arturo Sala (2005). B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *European Journal of Cancer* 41: 2479–2484.

- 23-)** Emanuela Grassilli, Paolo Salomoni, Danilo Perrotti, Claudio Franceschi, and Bruno Calabretta (1999). Resistance to Apoptosis in CTLL-2 Cells Overexpressing B-Myb Is Associated with B-Myb-dependent bcl-2 Induction. *Cancer Research* 59: 2451–2456.
- 24-)** Maria Cervellera, Giuseppe Raschella, Giorgia Santilli, Barbara Tanno, Andrea Ventura, Camillo Mancini, Cinzia Sevignani, Bruno Calabretta, ve Arturo Sala (2000). Direct Transactivation of the Anti-apoptotic Gene Apolipoprotein J (Clusterin) by B-MYB. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 21055–21060.
- 25-)** Wencheng Zhu, Paloma H Giangrande ve Joseph R Nevins (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *The EMBO Journal* 23: 4615–4626.
- 26-)** Paloma García ve Jon Frampton (2006). The transcription factor B-Myb is essential for Sphase progression and genomic stability in diploid and polyploid megakaryocytes. *Journal of Cell Science* 119: 1483-1493.
- 27-)** Litt, M., White RL. A highly polymorphic locus in human DNA revealed by cosmid – derived probes. *PNAS* 82 (18):6206-6210; 1985.
- 28-)** Crissman HA and Steinkamp JA. 1973. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biology* 59:766-771.
- 29-)** Sambrook and Russel, *Molecular cloning: A laboratory Manual* 3.ed, Vol 2 Chap 8: Protoc15. S 8.86. CSH NY 2001.
- 30-)** Gregory J Hannon. *RNAi: A guide to gene silencing*. Cold Spring Harbor Laboratory Press , CSH NY. 2003.
- 31-)** Ren B., Robert F., Wyrick JJ and workers. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 290:2306-2309, 2000.
- 32-)** Strieder V and Lutz W. ‘E2F Proteins Regulate *MYCN* Expression in Neuroblastomas.’ *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278: 2983–2989.