

T763

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez Kütüphanesi

**GANGLİONÖROBLASTOMADA DNA
ARTIŞ VE AZALIŞLARININ
KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK
HİBRİDİZASYON (KGH)
İLE ANALİZİ**

Ahter Dilşad TORAMAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2000

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

**GANGLİONÖROBLASTOMADA DNA
ARTIŞ VE AZALIŞLARININ
KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK
HİBRİDİZASYON (KGH)
İLE ANALİZİ**

Ahter Dilşad TORAMAN

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr.İbrahim KESER**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
Desteklenmiştir. (Proje No 99.01.0122.05)

"Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir"

Antalya, 2000

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Temel Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir. **25 OCAK 2001**

Tez Danışmanı : Yrd Doç.Dr. İbrahim KESER

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Üye : Prof.Dr. Güven LÜLECI

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Üye : Doç.Dr. Nidai ÖZES

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Üye : Doç.Dr. Tekinalp GELEN

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fakültesi


Üye : Yrd.Doç Dr. Sibel Berker KARAÜZÜM

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fakültesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun
kararıyla kabul edilmiştir


Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Nöroblastoma ve ganglionöroma arasında ara geçiş evresi olan ganglionöroblastomadaki genetik değişiklikler tam olarak bilinmemektedir. Nöronal orijinli tümörlerde sitogenetik çalışmalar koşullar zor olduğu için çok fazla değildir.

Bu çalışmada, karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon (KGH) ve iki aşamalı dejenere oligonükleotid primer ile polimeraz zincir reaksiyonu (DOP-PCR) kullanılarak, yaşları 3-4 arasında olan 5 olguya (3 erkek, 2 kız) ait ganglionöroblastoma örneklerindeki genomik kopya sayısı değişiklikleri ile bunların kromozomal yerleşimleri araştırılmıştır.

5 olgunun 3'ünde 2p5.1-pter, 5p15.1-p15.3, +7, 13q22-q31, +22 artışları, ve 2'sinde 1p35, 4p15.1, 10q11.2-q21.2, 12q24.32-qter, +13, 17p12-p13 ve 18p11.35-pter gibi kromozom bölgelerinde artışlar bulunmuştur. 3 olgumuzda ortak amplifikasyon bölgesi olarak belirlenen 13q22-q31 bölgesinde tanımlanmış olan bir onkogen bulunmamaktadır. Bu bölge, ganglionöroblastomanın ortaya çıkışında ve ilerlemesinde önemli rol oynayan olası bir onkogen taşıyor olabilir. Ayrıca, nöronal orijinli tümörlerde şimdiye kadar artışı gösterilmemiş olan ve bizim olgularımızın 3'ünde artışı belirlenen kromozom 22, üzerinde taşıdığı YESP, SIS, PDGB, NRASL2 onkogenlerinin ürünleri ile, ganglionöroblastoma gelişimde önemli rol oynuyor olabilir.

Anahtar Kelimeler: Karşılaştırılmalı Genomik Hibridizasyon, Dejenere oligonükleotid primerli polimeraz Zincir Reaksiyonu, ganglionöroblastoma

ABSTRACT

The genetic changes in ganglioneuroblastoma, which represents an intermediate stage between neuroblastoma and ganglioneuroma, are not yet clear. Difficulty of performing cytogenetic studies on neuronal tumours have resulted in fewer studies. This study investigated the genomic copy number changes as well as their chromosomal locations, of the ganglioneuroblastoma samples belonging to 5 cases (3 male, 2 female) between the ages of 3-4, by comparative genomic hybridization and two-step degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction (DOP-PCR).

Gains in chromosomes 2p5.1-pter, 5p15.1-p15.3, +7, 13q22-q31 and +22 were detected as minimal common regions in 3 of our patients, while gains in chromosomes 1p35, 4p15.1, 10q11.2-q21.2, 12q24.32-qter, +13, 17p12-p13 and 18p11.35-pter were observed in 2 of our patients. No oncogenes were reported to be located in the chromosomal region of 13q21-q31 previously. This region may harbor a novel oncogene which contributes to the initiation and progression of ganglioneuroblastoma. Furthermore, whole chromosome amplification of chromosomes 22, which was detected in 3 of our patients, and which has been reported in previous studies on neuronal tumours, may play a specific role in the progression of ganglioneuroblastoma, with the YESP, SIS, PDGB, NRASL2 oncogenes it harbors.

Key words: Comparative Genomic Hybridization, Degenerate Oligonucleotide Primed -Polymerase Chain Reaction, Ganglioneuroblastoma

TEŞEKKÜR

Çalışmama verdiği destekten ve yüksek lisans eğitimindeki katkılarından dolayı sayın Prof.Dr.Güven LÜLECİ'ye,

Akademik kariyerimde attığım bu ilk adımda bilgi ve tecrübelerinden yararlanmaktan onur duyduğum, yüksek lisans tez çalışmam süresince her zaman desteği, yardımları ve yönlendirmeleri ile yanımda olan sayın danışmanım Yrd. Doç.Dr. İbrahim KESER'e,

Çalışmamda kullandığım materyalleri sağlayan Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof.Dr.Nurdan TUNALI'ya ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr.Tekinalp GELEN'e,

Tez çalışmam süresince gösterdikleri anlayış için tüm bölüm arkadaşlarıma ve hocalarıma,

Tez çalışmam süresince ve her zaman desteği ile yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	viii
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
1.1 Kanserde Kromozomal Abnormaliteler	5
1.2 Kanser Oluşumu ile İlgili Genler	6
1.3 İnsanda Sinir Sistemi ve Sinir Dokusu	12
1.4 Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Tümörleri	17
1.5 Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH)	20
1.6 MSS Tümörleri ile Yapılan Sitogenetik ve KGH Çalışmaları	22
MATERYAL VE METOD	25
2.1 Tümör Dokusundan DNA İzolasyonu	25
2.1.1 Kullanılan Solüsyonlar	25
2.1.2 İşlemler	27
2.2 Tümör Dokusundan Elde Edilen DNA'dan	
Birinci Basamak DOP-PCR Amplifikasyonu	27
2.2.1 Kullanılan Solüsyonlar	27
2.2.2 İşlemler	28
2.3 Kontrol DNA'larının Periferik Kandan Eldesi	29
2.3.1 Kullanılan Solüsyonlar	29
2.3.2 İşlemler	31

2.4 Periferik Kandan Elde Edilen Normal DNA'dan Birinci Basamak DOP-PCR Amplifikasyonu	31
2.5 Normal Kişilerden Periferik Kandan Kromozom Eldesi	32
2.5.1 Periferik Kan Kültüründe Besi Ortamı	32
2.5.2 İşlemler	32
2.5.3 Kromozom Eldesi	32
2.5.3.1 Kullanılan Solüsyonlar	32
2.5.3.2 İşlemler	33
2.6 Normal DNA ve Tümör DNA'sının İkinci DOP-PCR Kullanılarak Flöresan İle İşaretlenmesi	34
2.6.1 Kullanılan Solüsyonlar	34
2.6.2 İkinci Basamak DOP-PCR Koşulları	35
2.7 Prob Presipitasyonu	36
2.7.1 Kullanılan Solüsyonlar	36
2.7.2 İşlemler	36
2.8 Prob Denatürasyonu	36
2.9 Kromozomların İşlenmesi ve Denatürasyonu	37
2.9.1 Kullanılan Solüsyonlar	37
2.9.2 İşlemler	38
2.10 Metafaz Kromozomlarının Denatürasyonu	39
2.10.1 Kullanılan Solüsyonlar	39
2.10.2 İşlemler	39
2.11 Hibridizasyon	40
2.11.1 İşlemler	40
2.12 Yıkama	40
2.12.1 Kullanılan Solüsyonlar	40
2.12.2 İşlemler	40
2.13 Hazırlanan Preparatların Görüntüleme Sistemi ile Analizi	41

BULGULAR	43
3.1 Ganglionöroblastomalı Dokulardan Elde Edilen DNA'ların ve Normal DNA'ların Ölçüm Sonuçları	43
3.2 Direkt DOP-PCR Amplifikasyonu ile Elde Edilen Ürünlerin Agaroz Jelde Gösterilmesi	44
3.3 İkinci DOP-PCR Kullanılarak Flöresan İşaretleme Sonucu Elde Edilen Ürünlerin Agaroz Jelde Gösterilmesi	45
3.4 Hibridizasyon Sonrası Gerçekleştirilen Dijital Görüntü Analiz Sonuçları	46
TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	74

KISALTMALAR

Am-Ac	: Amonyum Asetat
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CGH	: Comparative Genomic Hybridization (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon)
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitozin trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
dUTP	: Deoksiuridin trifosfat
DAPI	: 4',6'-diamidino-2-fenilindol
DOP-PCR	: Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction (Dejenere Oligonükleotit Primerli Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
EDTA	: Etilen Diamino Tetra Asetik Asit
FITC	: Fluorescein izotiyosiyanat
HCl	: Hidroklorik Asit
H-E	: Hemotoksilen-Eozin
HEPES	: N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2-Etan Sülfanik Asit
Human Cot-1 DNA	: İnsan tekrarlı DNA'sı
KHCO ₃	: Potasyum Bikarbonat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KCl	: Potasyum Klorür
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
Na-Ac	: Sodyum Asetat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Sodyum dihidrojen fosfat di hidrat
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
NP-40	: Nonidet P-40
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PSI	: Perceptive Scientific Instruments
PN	: Fosfat Natrium Tampon
RNase A	: Ribonükleaz A
rpm	: dakika başına düşen devir (revolutions per minute)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
2XSSC	: Sodyum Salin Sitrat
WBL	: White Blood Lysis Tampon

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Bugüne Kadar Belirlenmiş Onkogenlere Örnekler	8
Tablo 1.2. Bugüne Kadar Belirlenmiş Tümör Supresor Genlere Örnekler	11
Tablo 3.1. Ganglionöroblastomalı 5 Olgunun Parafine Gömülü Dokularından Direkt DOP-PCR Amplifikasyonu ile Elde Edilen DNA'ların Ölçüm Sonuçları	43
Tablo 3.2. Normal DNA'ların Verimleri ve Konsantrasyonları	44
Tablo 3.3. Ganglionöroblastomalı 5 olgunun Yaş, Cinsiyet ve KGH Sonuçları	57
Tablo 3.4. 5 Olguda Gözlenen Ortak Amplifikasyon Bölgeleri ve Sıklıkları	58
Tablo 4.1. Çalışılan 5 olgumuz ile Keser ve ark.'nın 5 Olguda Yaptıkları KGH Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması	64

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 (a) Nöron hücresi, (b) Hemotoksilen-eozin ile boyalı nöron hücreleri (beyin dokusu), (c) Nöronal ağ sistemi	13
Şekil 1.2 Oligodendrosit hücreleri	15
Şekil 1.3 Astrosit hücreleri	15
Şekil 1.4 Mikroglia hücreleri	16
Şekil 1.5 Ependimal hücreler	16
Şekil 1.6 Meningler	17
Şekil 1.7 (a) Nöroblastoma, (b) Ganglionöroblastoma, (c) Ganglionöroma	20
Şekil 3.1 Direkt birinci DOP-PCR amplifikasyonu ile elde edilen normal DNA'ların % 1.2'lik jelde görüntüsü.	44
Şekil 3.2 Direkt birinci DOP-PCR amplifikasyonu ile elde edilen tümör DNA'larının % 1.2'lik jelde görüntüsü.	45
Şekil 3.3 İkinci DOP-PCR kullanılarak işaretlenmiş normal ve tümör DNA'larının %1.2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	
Şekil 3.4 a) Mavi (DAPI), b) yeşil (FITC), c) kırmızı d) yeşil ve kırmızı flöresan filtreler kullanılarak elde edilen metafaz görüntüleri	47

Şekil 3.5 DAPI band modeline göre elde edilmiş karyotip örneği.	48
Şekil 3.6 Yeşil/kırmızı floresan yoğunluklarının normalizasyonu	49
Şekil 3.7 3. olguya ait incelenen 10 metafazın profil Değerleri	50
Şekil 3.8 İncelenen 10 metafaz örneğindeki her bir kromozoma Ait amplifikasyon ve delesyon oranları	51
Şekil 3.9. Karyotipteki bütün kromozomlar için elde edilen hibridizasyon oranları.	52
Şekil 3.10. Amplifiye olan kromozomların profilleri.	53
Şekil 3.11 4 no.lu olguya ait farklı metafazlardaki 10 no.lu kromozomda gözlenen a) normal, b) delesyon c) amplifikasyon oranları.	55
Şekil 3.12. Beş olguda gözlenen amplifikasyonların kromozomal idiogramda gösterilmesi	56

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, multifaktöriyel ve multistep bir etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır (1). Bu etkileşimde genetik yapı rol oynamaktadır. Kanserde genomik yapıdaki artış ve azalışlar, kanser genlerinin mekanizmasında önemlidirler. Kanserın klonal evrimini takip etmek için, kanserli dokunun ve daha detaylı inceleme için de kanser hücrelerinin kendi genomik yapısının incelenmesi gerekmektedir.

Kanserde genetik çalışmalar sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerle yapılmaktadır. Solid tümörlerde sitogenetik çalışma çok zordur ve yeterli sayıda canlı hücre elde etmek gerekmektedir. Bazen de sadece var olan ve üreyen hücrelerdeki genetik değişiklikler incelenebilmektedir (2). Moleküler genetik yöntemlerle ise genomdaki değişiklikler üzerinde tek tek inceleme yapılmaktadır. Oysa kanserli hücrelerde birçok genomik değişiklikler meydana gelebilmektedir (3). Bütün genomu incelemek için bu nedenle moleküler sitogenetik tekniklerden yararlanılmaktadır.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (KGH, Comparative Genomic Hybridization, CGH) moleküler sitogenetik bir yöntem olup, bütün genomdaki artış ve azalışların incelenmesine ve tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Yöntemin temeli, iki farklı renkte floresan ile işaretlenmiş tümöral ve normal dokuya ait DNA'ların, normal kromozomlarla hibridizasyonuna, bu hibridizasyon oranının bir yazılım programı yardımıyla elde edilmesine, DNA artış ve azalışlarının kromozomal yerleşimlerinin belirlenmesine dayanmaktadır (4).

Çalışmamızda, çocukluk döneminde ortaya çıkan ve seyrek görülen, nöronal orijinli tümörlerden nöroblastoma ve ganglionöroma arasında geçiş evresi olan ganglionöroblastomada, KGH yöntemini kullanarak tümör hücrelerindeki genomik artış ve azalışları araştırmayı ve kromozomal yerleşimlerini belirlemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Ökaryotik hücre, karmaşık bir yapıya sahiptir. Tüm fonksiyonları, çekirdeğinde bulunan genetik program aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu program, hücrenin fonksiyonlarını yönlendirir ve bunların kontrolünü sağlar. Hücre, elde ettiği enerjiyi, kimyasal reaksiyonlarda kullanarak, iç ve dış uyarılara cevap verir, kendi fonksiyonlarını düzenler, sürekliliğini sağlamak için, bölünerek çoğalır (5).

İki hücre bölünmesi arasındaki evre, hücre döngüsü olarak tanımlanır. Normal hücrede, hücre döngüsü, hücrenin kendi genomik DNA'sı tarafından kodlanan enzim ve proteinlerle yürütülmekte ve kontrol edilmektedir (6). Hücre döngüsü, gerçekleşen hücresel aktivitelere göre G1, S, G2 ve M olmak üzere dört faza ayrılır. G1 fazında hücre büyür ve normal metabolizmasını sürdürür. Organeller kendilerini eşlerler. S fazında DNA replikasyonu ve kromozom duplikasyonu gerçekleşir. G2 fazında hücre büyümesi devam eder ve hücre kendini mitoz (M) hazırlar. Mitozda hücre bölünmesi ve replike olan DNA'ların yavru hücrelere dağılımı gerçekleşir. Bazı hücreler ise, örneğin sinir hücreleri, DNA sentezi öncesinde G₀ evresinde tutulurlar (5). Bu hücreler metabolik olarak aktiftirler, ancak uygun ekstraselüler sinyallerle uyarılmadıkça çoğalmazlar (6).

Hücre, bir başka hücre tarafından gönderilen uyarıcı moleküllere veya fiziksel temas sonucu oluşan bir dış uyarana karşı uygun hücresel cevabı verebilme yeteneğine sahiptir. Sinyal olarak bilinen bu işlem, genellikle bir dizi farklı proteinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile gerçekleşir. Sinyal iletiminde görev alan proteinlerin konformasyonel değişikliğe uğraması, DNA'ya spesifik bağlanmaları ve spesifik cevabın oluşmasını sağlar. görev alan

proteinlerin konformasyonel değişikliğe uğraması, DNA'ya spesifik bağlanmaları ve spesifik cevabın oluşmasını sağlar (5).

Ökaryotik hücreler, farklılaşarak özelleşirler. İnsanda yumurta hücresinin sperm hücresi ile döllenmesi sonucu oluşan zigot, embriyonik gelişimini sürdürürken, hücreler dokulara ve organlara farklılaşırlar. Bazı hücreler, bir sindirim bezinin parçası haline gelirken, kimi hücreler bir iskelet kasının, kimi ise kemiğin bir parçası haline gelir. Her bir embriyonik hücre tarafından izlenen farklılaşma yolu, temelde çevreden aldığı sinyallerle genomik yapının davranışına bağlıdır (5, 6).

Organizmada normal hücre, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozise uğrayarak ölür. Apoptozis, spesifik genlerin aktivasyonunu gerektirir (5).

Normal hücrede büyüme ve gelişme, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve kontrolünde görev alan protein kinazlar ve siklinler tarafından yönlendirilir. Örneğin, hücre döngüsünün ilerlemesi, siklin D tarafından kontrol edilmektedir. Bu kontrol, siklin D ve büyüme faktörü arasındaki bağlantı ile gerçekleşir. Ayrıca, siklin D proteini ile bağlanan protoonkogen ve tümör supressör gen ürünü proteinler, hücre döngüsünün kontrolünde önemli rol oynarlar. *Ras* onkogen proteini, siklin D'ye bağlandığında, hücre bölünmesi artarken, p53 ve Rb1 tümör supresör gen ürünleri, hücre bölünmesinin yavaşlamasını ve durmasını sağlamaktadırlar. Kısaca, normal hücrede hücre büyümesi ve gelişmesi, protoonkogenler ve tümör supressör genler arasındaki bir denge ile sürdürülmektedir. Hücre büyüme ve proliferasyonunda görev alan protoonkogenler, tümör supressör genlerin kontrolü altında çalışmaktadırlar (6).

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü, hücrenin normal fonksiyonları üzerindeki kontrolün yitirilmesine yol açan bir dizi genetik mutasyon sonucu olur. Kansere yol açan mutasyonlar, hücre çoğalmasından, hücre gelişiminden, ve diğer temel hücresel aktivitelerden sorumlu genleri etkilerler (7). Kanser hücresinde hücre çoğalmasının kontrolü kaybolur. Kanser hücresi, hücre döngüsünün G₀ safhasında tutulmasını sağlayacak sinyallere cevap vermez. Kanser hücresinde normal farklılaşma görülmez. Normal farklılaşma geçirmeyen ve sürekli aktif olarak bölünen kanser hücresi, kendisini programlı hücre ölümüne sevk edecek sinyallere karşı duyarsız olduğundan, apoptozise uğramaz (6).

Kanser, genetik bir hastalıktır. Tüm kanserlerin %5'i ailesel geçiş gösterir. Ancak bazı kişilerin kansere yakalanma riskleri, genetik yapılarının kansere yatkınlık göstermesi nedeni ile, normal kişilere göre daha yüksektir (7).

Normal hücreninin kanser hücresine dönüşümünde etkili olan genetik değişiklikler, kromozomal abnormaliteler ve gen düzeyindeki değişiklikler olarak gruplandırılabilir.

1.1 Kanserde Kromozomal Abnormaliteler

Kanser hücrelerinde anöploidi, translokasyonlar, delesyonlar, kardeş kromatid değişimleri, frajil bölgeler, homojen boyanan bölgeler (hsr) ve double minüt kromozomlar (dmin) gibi birçok değişik kromozom abnormaliteleri görülür (8). Anöploidi, kanser hücrelerinde büyüme kontrolününün kaybına bağlı olarak sık görülen bir kromozomal abnormalitedir. Bazı kromozomal translokasyonlar ve kardeş kromatid değişimleri, kromozomlarda özgül onkogenleri aktive ederler ve kanser oluşumunda önemli rol oynarlar. Kromozomlar üzerinde bulunan frajil bölgeler, mutajen ve karsinogenlerin hedefi

konumundadırlar. Hsr ve dmin, gen amplifikasyonlarının oluşturduğu hücresel yapılar olup, birçok tümör tipinde *de novo* olarak veya organizmanın sitotoksik ajanlara maruz kalması sonucunda oluşurlar (5, 8).

Kanser hücresinde karşılaşılabilecek sitogenetik abnormaliteler, 3 ana grupta toplanır:

1. Primer abnormaliteler: Genellikle tümöre özgü tek tip anomali olup, kanserde erken basamağın göstergesidirler.
2. Sekonder abnormaliteler: Kanser ilerlemesinde (progresyon) önemli olup, genetik instabilitenin sonucu olarak ortaya çıkarlar. Kanser ileri evrelerinde dominant pozisyonadırlar.
3. Sitogenetik noise: Tümöre özgü aberasyonlar değildirler. Ancak tümör hücre popülasyonunda çok sayıda olduklarında karyotipte dominant hale geçerek patogenetik olarak önemli değişikliklerin belirlenmesini güçleştirirler (9).

1.2 Kanser Oluşumu ile İlgili Genler

Protoonkogenler, tümör supresör genler ve mutator genler, normal hücre büyümesini ve proliferasyonunu kontrol eden çeşitli proteinleri kodlarlar. Protoonkogenlere dominant fonksiyon kazandırıp, bunları onkogenlere dönüştüren mutasyonlar, tümör supresör genlerde resesif fonksiyon kaybı yaratan mutasyonlar ve mutator genlerin yapısında meydana gelen çeşitli mutasyonlar, hücrenin kanserleşmesine neden olurlar (10).

Onkogenler

Onkogenler, normal hücresel olayların yürütülmesinde görev alan protoonkogenlerin mutant formlarıdır (11). Protoonkogenler, pozitif etkili büyüme faktörleri ve reseptörlerini, sinyal iletim proteinlerini, transkripsiyon faktörlerini ve hücre döngüsü proteinleri gibi hücre için kritik önemi olan proteinleri kodlarlar. Onkogenler, viral onkogenlerin hücresel karşılığı olarak genomda bulunurlar ve c-onc olarak isimlendirilirler. İnsanda tanımlanan ilk onkogen, bir sinyal iletim proteini olan *ras*'ın konstitutif aktif formunu kodlar (11, 12). Bugüne kadar tanımlanmış protoonkogenlerin en iyi bilinenleri, Çizelge 1.1'de görülmektedir.

Onkogen aktivasyonunda çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır. Nokta mutasyonlar, kromozomlarda yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonları, retroviral onkogenler ve insersiyonel mutagenesisler, onkogen aktivasyonuna neden olmaktadır (13).

1) Nokta mutasyonlar ile onkogen aktivasyonu

Ras onkogeninin aktivasyonu, nokta mutasyonu ile onkogen aktivasyonuna iyi bir örnektir. Mesane, akciğer, kolon, pankreas, myeloid lösemi gibi farklı tümörlerde yapılan çalışmalarda, *ras* genlerinin (N-*ras*, H-*ras*, K-*ras*) birinde nokta mutasyona rastlanmıştır. Akciğer adenokarsinomlarında, *ras* onkogeninde nokta mutasyonu oranı %30 olarak belirlenmiştir. *Ras* protein ürünü, GTP'ye bağlanan aktif formda ve GDP'ye bağlanan inaktif formda bulunabilir. *Ras* onkogeninde 12, 13 ve 61. kodonlarda meydana gelen nokta mutasyonlar, *ras*'ın aktif formdan inaktif forma dönüşümünü bloke eder ve kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar (13, 14).

Tablo 1.1 Bugüne kadar belirlenmiş onkogenlere örnekler (6).

<u>Onkogen mekanizması</u>	<u>Neoplazm</u>	<u>Aktivasyon</u>
<i>abl</i>	Kronik miyelojenik lösemi	Translokasyon
<i>erbB-2</i>	Meme ve over karsinoma	Amplifikasyon
<i>c-myc</i>	Burkitt's lenfoma, akciğer, meme, serviks kanseri	Amplifikasyon; Translokasyon
<i>H-ras</i>	Kolon, akciğer, pankreas Karsinoma, melanoma	Nokta mutasyonlar
<i>bcl-2</i>	Foliküler B-hücre lenfoması	Translokasyon
<i>gip</i>	Adrenal kortikal ve over karsinoma	Nokta mutasyonu
<i>gli</i>	Glioblastoma	Amplifikasyon
<i>gsp</i>	Hipofiz ve tiroid tümörleri	Nokta mutasyon
<i>hox-11</i>	Akut T-hücre lösemisi	Translokasyon
<i>lyl</i>	Akut T-hücre lösemisi	Translokasyon
<i>L-myc</i>	Akciğer karsinoma	Amplifikasyon
<i>PRAD1</i>	Paratiroid adenoma	Translokasyon

2) Kromozomlarda yeniden düzenlenmeler ile onkogen aktivasyonu

Kromozomlarda oluşan ve protoonkogenlerin yapısında ve ifadesinde değişikliklere neden olan translokasyon ve inversiyon gibi yeniden düzenlenmeler, onkogen aktivasyonuna sebep olurlar (12, 10). Philadelphia kromozomunun (Ph1) oluşumu, kromozomal translokasyonlar ile onkogen aktivasyonuna, bir örnektir. Kromozom 9 ve 22 arasında gerçekleşen, t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon sonucu oluşur. Kromozom 9q34'teki ABL onkogeninin intronu ile, kromozom 22q11'deki BCR geninin birleşmesi sonucu,

hücreyi transformasyona sevk eden bir tirozin kinazı kodlayan BCR-ABL kimerik geni oluşur (11).

3) Gen amplifikasyonu ile onkogen aktivasyonu

İnsan tümörlerinde amplifiye olmuş DNA dizileri, çoğunlukla onkogenleri içerir. Gen amplifikasyonları hücrede homojen boyanan bölgeler (hsr) ve/veya double minutler (dmin) olarak bulunur. Çocukluk çağı tümörü olan nöroblastomada, N-myc geni 300 kat amplifiye olabilir (13, 14).

4) Retroviral onkogenler ve insersiyonel mutagenesis ile onkogen aktivasyonu

Retrovirusler, normal retrovirusler ve hücreyi transforme eden retrovirusler olarak ikiye ayrılırlar. Normal retrovirusler, bir RNA genomuna sahiptir. Viral RNA, reverse transkriptaz enzimiyle DNA'ya çevrilir ve bu DNA konakçı hücre genomuna entegre olur. Bu viral DNA'nın hücre DNA'sındaki bir protoonkogenin kodlayıcı bölgesine veya bu bölgenin yakınına insersiyonu, genin aşırı oranda ifade edilmesine veya ifadenin uygunsuz zamanda gerçekleşmesine neden olabilir ve hücre transformasyonu gerçekleşir (11). Hücreyi transforme eden retrovirüsler, içerdikleri onkogen ile konakçı hücreyi hızlı ve etkili bir şekilde transforme ederler. v-abl, v-erb B, v-ets, v-mos ve v-myc, bugüne dek kanser oluşumu ile ilişkili olarak tanımlanmış çeşitli viral onkogenlerdir (13).

Tümör Supressör Genler (TSG)

Tümör supressör genler, hücre döngüsünün spesifik bir evresinde ilerlemeyi yavaşlatan veya inhibe eden, DNA'nın hasarlı veya kromozomların anormal olması durumunda hücre döngüsünü durduran kontrol noktası proteinlerini kodlarlar (11).

Tümör gelişimi için, bir tümör supressör genin her iki alleli de işlev kaybetmelidir. Her iki allel de somatik olaylarla inaktive olabileceği gibi, etkilenmiş ebeveynden geçen ya da yeni bir mutasyona bağlı germ hücresi mutasyonu taşıyan bireyler tümör gelişimine yatkındırlar. Tümör, ikinci allelin işlev kaybından sonra ortaya çıkar. Bu olay, 'two hit' hipotezi olarak bilinir. Bunun sonucunda gerçekleşen heterozigosite kaybı (Loss of heterozigosity; LOH) ile tümör supressör genin o hücredeki etkisi ortadan kalkar ve kontrolsüz olarak bölünmeye başlayan hücre kanserleşir (7, 15).

İnsanda tanımlanan ilk tümör supressör gen, retinoblastoma (Rb) genidir (12). Bugüne kadar tanımlanan TSG'lerden en iyi bilinenleri, Tablo 1.2'de görülmektedir.

Tablo 1.2 Bugüne kadar belirlenmiş tümör supressör genlere örnekler (6).

<u>Tümör Supressör Gen</u>	<u>Kanser Tipi</u>
<i>p53</i>	Kolon kanseri ve diğer çeşitli kanserleri
<i>Rb</i>	Retinoblastoma
<i>NF1</i>	Nörofibromalar
<i>NF2</i>	Meningioma
<i>APC</i>	Kolon/rektum karsinoma
<i>BRCA1</i>	Meme ve over karsinoma
<i>BRCA2</i>	Meme karsinoma
<i>DCC</i>	Kolon/rektum karsinoma
<i>DPC4</i>	Pankreatik karsinoma
<i>INK4</i>	Melanoma, akciğer karsinoma, beyin tümörleri, lösemiler ve lenfomalar
<i>VHL</i>	Renal hücre karsinoma
<i>WT1</i>	Wilms' tümörü

Mutatör Genler

Normal hücre döngüsünün kontrolünde, DNA replikasyonunda ve DNA tamirinde görev alan proteinleri kodlayan genlerdir. Mutatör genler, DNA'da yanlış baz eşleşmesi durumunda, hata doğrulama sistemi enzimlerini kodlarlar. İnsanda, bugüne kadar tanımlanmış mutatör genler, kalıtsal nonpolipozis kolon kanserinin gelişiminde rol oynayan MSH2, MLH1, PMS1 ve PMS2 genleridir. Bu genlerdeki mutasyonlar, mikrosatellit dizilerin instabilitesini yaratarak kansere neden olurlar (10).

Normal bir somatik hücre, gerektiğinde kendi büyümesini inhibe edecek mekanizmaya sahiptir. Normal hücre genomunda meydana gelecek bir mutasyon, bu hücrenin çoğalma yeteneğini diğer

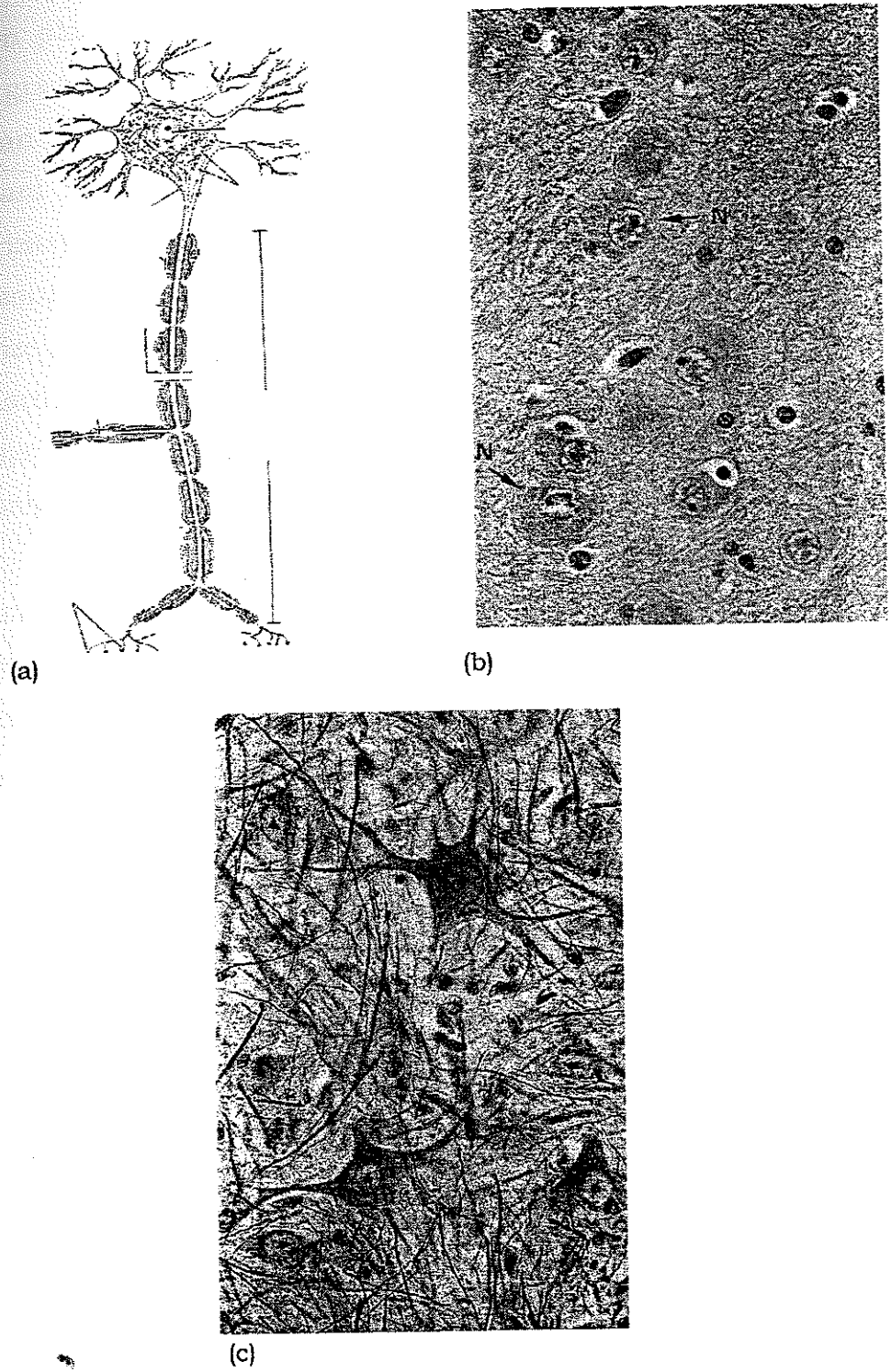
hücrelere oranla artırabilir. Ancak tek bir mutasyon, hücrenin kontrol mekanizmalarından kaçabilmesi için yeterli değildir. Bu hücrede meydana gelen ve tümör supresör gen, protoonkogen ve mutator genlerin fonksiyonlarını etkileyebilecek ek mutasyonların birikimi sonucu hücre, normalde çoğalmasını durduracak sinyallere rağmen bölünmeye devam eder. Bu noktada, kanserleşen hücre komşu dokuları istila edip vücudun diğer bölgelerine yayılabilir (16).

Ortaya çıktıkları bölgede kalmayıp komşu dokuları istila ederek ve kan ve lenfoid dolaşımı yoluyla vücudun başka bölgelerine metastaz yaparak yayılan tümörler malign olarak tanımlanır. Oluştukları bölgedeki konumlarını koruyan ve vücudun diğer bölgelerine yayılma olasılıkları düşük olan tümörler ise benign tümörlerdir (13).

Beyin veya omurilik bölgesinde oluşan tümörler, ister benign ister malign olsun, ölümcül olabilir, çünkü sinir sistemi, insanın yapısını oluşturan milyarlarca hücre arasındaki hızlı iç iletişimi sağlar. Bu tür bir iletişim olmadan, insanda hücresel aktivitelerin düzenlenebilmesi ve koordine edilebilmesi mümkün değildir (17, 18).

1.3 İnsanda Sinir Sistemi ve Sinir Dokusu

Sinir sisteminin fonksiyonu, iç ve dış uyartıları almaktır. Bu uyartılar daha sonra analiz edilir ve çeşitli organlarda uygun cevaplar oluşur. Sinir sistemi içinde, özelleşmiş hücreler olan nöronlar, bir haberleşme ağı oluşturur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 (a) Nöron hücresi, (b) Hemotoksilen-eozin ile boyalı nöron (N) hücreleri (beyin dokusu), (c) Nöronal ağ sistemi

Sinir sisteminin fonksiyonları, nöronların uyarılabilme özelliklerine dayanır. Tüm hücrelerde olduğu gibi, uyarılmamış bir nöronun plazma membranı boyunca elektriksel potansiyel yaratan iyonik gradient mevcuttur. Uyarılma ile, uygun uyaranlara karşı membran geçirgenliğinde değişiklik meydana gelir ve plazma membranı depolarize olur. Aksiyon potansiyeli olarak bilinen bir depolarizasyon dalgası plazma membranı boyunca yayılır. Membran daha sonra hızla dinlenme halindeki potansiyeline döner, yani repolarize olur. Bitişik nöronlar arasındaki iletişim bölgeleri olan sinapslarda, bir nöronun depolarizasyonu, bitişik nöronda aksiyon potansiyeli başlatan kimyasal transmitter maddeler, yani nörotransmitterler salgılamasına neden olur (19).

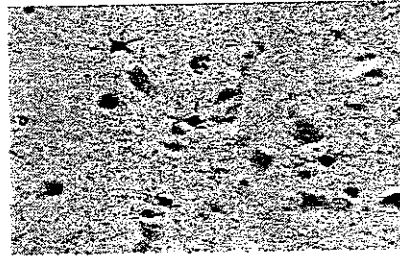
Sinir sistemi anatomik olarak, beyin ve omuriliği kapsayan merkezi sinir sistemi (MSS) ve merkezi sinir sistemi dışındaki tüm sinir dokusunu içeren periferel sinir sistemi (PSS) şeklinde incelenir. Fonksiyonel olarak ise sinir sistemi, istemli fonksiyonlarda görev alan somatik sinir sistemi ve istemsiz fonksiyonları kontrol eden otonom sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Histolojik olarak incelendiğinde, tüm sinir sistemi, nöronlar ve bunlara destek görevi gören hücrelerin farklı şekillerde düzenlenmelerinden oluşur.

Büyükükleri ve şekillerinde farklılıklar görülse de tüm nöronların temel yapısı aynıdır. Genel olarak, bir sinir hücresi üç kısımdan oluşur: dendritler, esas hücre kısmı (hücre gövdesi) ve akson. Dendritler ve aksonlar, esas hücre kısmının uzantılarıdır. Uyarılar, sayıları bir ya da daha fazla olan dendritlerle hücreye alınır, aksonla hücreden uzaklaştırılır. Aksonun üzerinde miyelin denilen yağlı bir tabaka vardır. Miyelinin üzerinde ise, nörolemma (Schwann kılıfı) denilen hücresel bir yapı bulunur. Miyelin kılıf, her sinir hücresinde görülmez. Miyelin kılıfı olan sinir hücrelerinde, iletim

hızı büyük ölçüde artmıştır. Çünkü miyelin kılıf çok iyi bir yalıtıcıdır (Şekil 1.1).

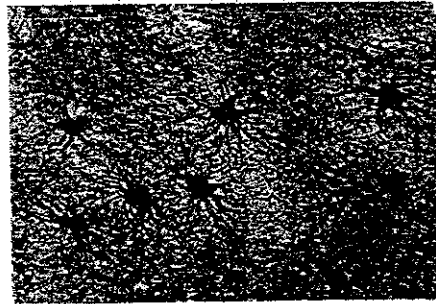
Merkezi sinir dokusu, çok sayıda nöron ile bunların destek hücreleri içine gömülü olan uzantılarından meydana gelir. Bu destek hücreleri, nöroglia olarak adlandırılır. Nöroglia hücreleri, nöronlara mekanik ve metabolik destek sağlar. Dört tip nöroglia hücresi mevcuttur. Bunlar; oligodendrositler, astrositler, mikroglia ve ependimal hücrelerdir (19).

Oligodendrositler, merkezi sinir sisteminde aksonların myelin tabakayla kaplanmasından sorumludur. Tek bir oligodendrosit 50 sinir fiberinin myelinle kaplamasında rol oynayabilir (Şekil 1.2).



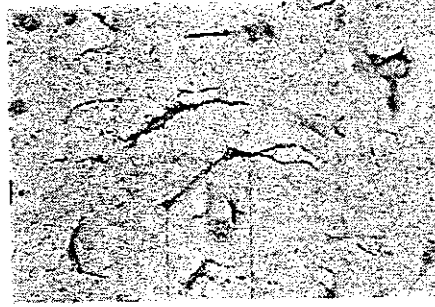
Şekil 1.2 Oligodendrosit hücreleri

Astrositler, nöronlara destek görevlerinin yanında merkezi sinir sistem dokusunda meydana gelen hasarların tamirinde önemli rol oynarlar. Astrositlerin ayrıca nöronlar ve kan arasındaki metabolik alışverişlerde aracılık yaptığı da düşünülür (Şekil 1.3).



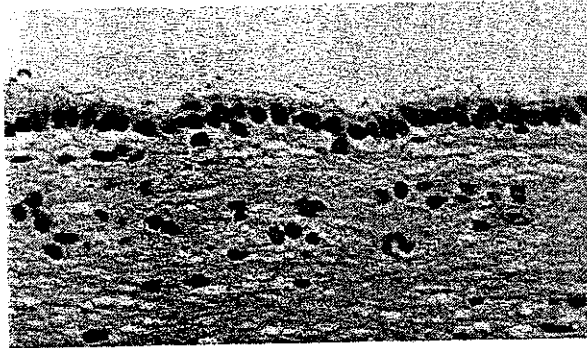
Şekil 1.3 Astrosit hücreleri

Mikroglia hücreleri , diğer glial hücrelere oranla merkezi sinir dokusunda daha az sayıda bulunurlar. Mezenşimal orijinli hücrelerden köken alan bu hücreler, fetal gelişimin geç bir evresinde merkezi sinir sistemini kuşatırlar. Doku hasarı meydana geldiğinde mikroglia hücreleri, büyük amipsi fagositik hücrelere dönüştüklerinden, makrofaj-monosit savunma sisteminin bir parçası olarak fonksiyon görürler (Şekil 1.4).



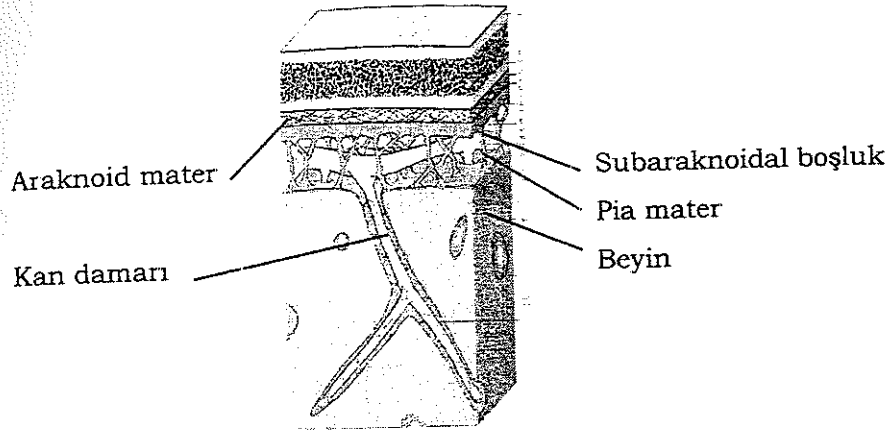
Şekil 1.4 Mikroglia hücreleri

Ependimal hücreler, ventriküllerin ve spinal kanalın epitelyal astarını oluştururlar. Diğer epitel hücrelerin aksine, ependimal hücreler bir bazal membran üzerinde bulunmazlar. Luminal yüzeyleri üzerinde bulunan sillerin beyinde ventriküller içindeki serebrospinal sıvının hareketinde rol aldıkları düşünülür (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Ependimal hücreler

Beyin ve omuriliğin dış yüzeyi, meningler olarak bilinen özelleşmiş bağ dokusu katmanları ile kaplıdır. Sinir dokusunun yüzeyinde *pia mater* denen ve fibroblastları, kollajen fiberleri ve astrosit uzantılarını içeren mening tabakası bulunur. Bu tabakanın üzerinde *araknoid mater* olarak isimlendirilen fibröz tabaka mevcuttur. *Pia* ve *araknoid* tabakalar arasındaki bulunan ve *subaraknoid* bölge olarak tanımlanan boşluk, arter ve venleri içerir (19) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Meningler

Sinir sistemi hücreleri de, diğer vücut hücreleri gibi kanser hücrelerine dönüşebilir. Kanser oluşumu, hücrede birçok mutasyonun birikimini gerektirdiğinden ve bu süreç yıllar alabildiğinden, çocuklarda kanser erişkinlere oranla daha seyrek görülür (16). Merkezi sinir sistemi tümörleri 0-4 yaşta çocuklar arasında 100.000'de 3.1 sıklıkla görülür (17)

1.4 Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Tümörleri

Merkezi sinir sistemi tümörleri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ya göre, glial neoplazmlar; nöronal, karışık nöronal-glial, ve

nöroendokrin neoplazmları; pineal neoplazmlar; omurilik neoplazmları; meningeal ve melanositik neoplazmlar; vasküler neoplazmlar; sinir kılıfı neoplazmları; hematopoetik neoplazmlar; germ hücre neoplazmları ve teratomalar; malformatif ve neoplastik olmayan kütle lezyonları, sekonder neoplazmlar; paraneoplastik sendromlar; ve sinir sistemi neoplazmlarının terapötik komplikasyonları olarak sınıflandırılır.

Astrositomalar, çocuklarda ve yetişkinlerde görülebilen, primer beyin tümörlerinin en sık görülen formlarıdır. Beyin kökünde, serebellumda, omurilikte görülebilen bu tümörlerin benign ve malignant formları vardır ve merkezi sinir sistemi dışına metastaz yapmazlar. Glioblastome multiforme, bu tür tümörlere örnektir.

Oligodendroglial tümörler, oligodendroglial hücrelerden köken alırlar. Bu tümörler yetişkinlerde görülürler. Serebral hemisferlerde gelişen oligodendroglial tümörler, benign (oligodendroglioma) veya malign (anaplastik oligodendroglioma) olabilirler.

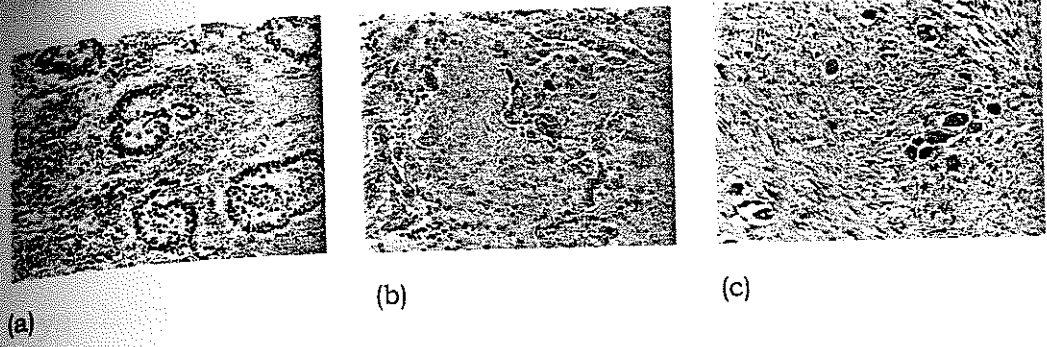
Ependimal hücre tümörleri, çoğunlukla çocuklarda omurilikte görülürler. Bu tümörlerin benign (ependimoma) ve malignant (anaplastik ependimoma) türleri vardır.

Nöronal tümörler, genç yetişkinlerde görülür. Gangliositoma, ganglioglioma bu tümörlere örnek olarak verilebilir. Prognozları iyidir.

Meningeal tümörlerin en sık görülen formu, meningiomadır. Meningiomalar yavaş büyüyen tümörlerdir. Araknoidal hücrelerden köken alırlar. Bu tümörlerin büyük bir çoğunluğu benign, ancak malign formları da bulunur.

Embriyonal hücreler, çeşitli tip hücrelerden köken alan ve çeşitli şekillerde farklılaşma gösteren tümörler oluşturabilirler. Embriyonal tümörlerin en sık görülen formu, serebellumda oluşan medulloblastomadır. Primitif tümör hücrelerinden oluşan, hızlı büyüyen ve meningeal yayılma eğilimi gösteren bu tümörler, çocukluk çağı beyin tümörlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur (20). Diğer bir embriyonal orijinli tümör olan nöroblastoma, genellikle bebeklik ve erken çocukluk çağında ortaya çıkar (Şekil 1.7). Bu tümörlerin seyri, klinik ve biyolojik olarak, kendiliğinden regresyondan malignant ilerlemeye kadar çeşitli şekillerde olabilir. Tüm pediatrik malignansilerin %10-12'sini oluşturur. Agresif, metastatik formlarının tedaviye cevabı zayıftır. Bu tümör, farklılaşmamış nöroblastik hücreler ve farklılaşma halindeki hücreleri içerir. Bu hücreler, büyük nukleus ve belirgin nukleolusları ile tipiktirler (21). Nöroblastoma, embriyonik dönemde sempatik sinir sistemini oluşturacak olan nöral krest hücrelerinden köken alır. Nöroblastoma, bir başka tümör olan ganglionöromaya farklılaşabilir. (Şekil 1.7). Bu farklılaşmada ara geçit evresi ise, ganglionöroblastomadır (22-24) (Şekil 1.7b).

Ganglionöroblastoma, nöroblastomalarla birlikte, bebeklik ve çocukluk döneminin beyin dışında gelişen ikinci en sık görülen tümörlerini oluşturur. Ganglionöroblastoma tanısında ortalama yaş, yaklaşık 21 aydır. Çoğu sporadik olarak ortaya çıkar, ancak nadiren ailesel geçişli formları da görülür (23, 24). Mikroskop altında ganglionöroblastoma, nöroblastlar ve bunların ara formları ile, sinir fiberlerinin birlikte bulunduğu bir karışım olarak gözlenir.



Şekil 1.7 (a) Nöroblastoma, (b) Ganglionöroblastoma, (c) Ganglionöroma

Ganglionöroblastoma, çok nadir görülen bir tümördür. Ara geçiş evresi olduğundan, patolojik inceleme ile tespit edilebilmektedir. Tümör gelişiminde rol oynayan genetik değişiklikler, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemler ile belirlenerek, tümörlerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadırlar. Moleküler sitogenetik bir yöntem olan KGH, tüm genomdaki DNA artış ve azalışlarını gösterdiğinden, kanser çalışmalarında kullanılmakta ve sınıflandırmaya yardımcı olmaktadır.

1.5 Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH; Comparative Genomic Hybridization ; CGH)

Hücrede, genomik materyalin yapısındaki tüm dengesiz kromozomal aberasyonların incelenmesine olanak tanıyan, moleküler sitogenetik bir yöntem olan KGH, Kallioniemi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (3). Bu yönteme, dijital ve sitometrik çalışmaların eklenmesi ile dijital görüntü analiz sistemleri ortaya çıkmıştır. (25-27).

KGH, biri analiz edilecek tümör dokusundan, diğeri karyotipik olarak normal bireyden elde edilen iki genomik DNA'nın, farklı renkte

flöresan ile işaretlenip, prob şekline getirilerek normal metafaz yaymalarına hibridizasyonu esasına dayanır (28).

KGH için tümör DNA'sı, taze ve parafine gömülü doku örneklerinden veya lösemiler için kemik iliği hücrelerinden elde edilebilir (29-32). Ayrıca, parafin blok kesitlerinden tümörlü doku veya hücrelerin mikrodiseksiyonunu takiben DOP-PCR yöntemi kullanılarak, direkt amplifikasyonla da genomik DNA eldesi gerçekleştirilebilir (33, 34). Normal DNA kaynağı ise genellikle normal karyotipli bireylerden alınan periferik kandan izole edilir. Elde edilen tümör ve normal DNA'lar, iki farklı renkte flöresan dNTP (tümör DNA kırmızı, normal DNA yeşil) ile direkt DOP-PCR ya da indirekt olarak nick translasyon yöntemi kullanılarak işaretlenir (35, 36).

Normal kromozomlar, karyotipik olarak normal bireylerden periferik kandan kültür kurularak, standart yöntemlerle elde edilir (37). KGH'da kullanılacak preparatların aynı kültürden, bir defada elde edilmesi gerekir. Preparatlar, kuru, temiz ve karanlık ortamda, oda ısısında bekletilir. Prob DNA (farklı renkte flöresan ile işaretli normal DNA ve tümör DNA'sı ile, işaretsiz olan, kromozomlardaki telomerik ve sentromerik heterokromatin bölgeleri baskılayan insan Cot-1 DNA'sının karışımı) ve kromozomlar, FISH protokollerine uygun olarak, ısı ve denatüre edici ajanlar ile denatüre edilirler. Denatüre edilmiş prob DNA, denatüre kromozomlar ile hibridize edilip 37°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılır (38). Hibridizasyon sonrası, spesifik olmayan bağlanmalar, yıkanarak uzaklaştırılır. Yıkama basamağı, KGH'da en önemli basamaklardan biridir. Preparatlar, inceleninceye kadar karanlıkta ve +4°C'de saklanır. Optimal hibridizasyon oranı, uygun filtre sistemi taşıyan epiflöresan mikroskoba bağlı CCD kamera ve geliştirilmiş bir yazılım (software) programı ile elde edilir. Elde edilen hibridizasyon oranının artış ve azalış biçimleri dikkate alınarak, DNA artış ve azalışlarının kromozomal bölgeleri tespit edilir

(39). KGH, en sıklıkla kanser alanında uygulanmakla birlikte, klinik genetikte, gen haritalamasında, prenatal tanı çalışmalarında da başvurulan bir yöntemdir (40-44).

1.6 MSS Tümörleri ile Yapılan Sitogenetik ve KGH Çalışmaları

MSS tümörleri, beyin içinde veya beyin dışında gelişebilir. Beyin içi tümörlerinden malign seyreden glioma ve medulloblastoma, benign ve malign formları bulunabilen oligodendroglioma ve ependidoma ve genellikle benign formları bulunan meningioma ile ilgili sitogenetik çalışmalar sınırlıdır (45-47).

En sık görülen glioma, astrositomadır. Astrositomada görülen en sık kromozom aberasyonu, anormal karyotipli olguların %40'ında görülen trizomi 7 ve Y kromozomu kaybıdır. Kromozom 9p, 10, ve 22'nin kaybı da sık görülen kromozomal anomali olarak görülmektedir (48).

Oligodendrogliomada yapılan karyotipik çalışmada, +7, -X ve -Y bulguları ile, oligodendrogliomanın astrositomaya benzerlik gösterdiği bulunmuştur (48,49).

Ependidomada görülen en sık kromozomal abnormalitelerin +7,+12 ve -22 olduğu saptanmıştır (48).

Medulloblastomanın da dahil olduğu primitif nöroktodermal tümörlerde yapılan çalışmada, 22 olgunun 8'inde izokromozom 17q, karakteristik bulgu olarak tanımlanmıştır (50, 51). Ayrıca t(11;22)(q24;12) ve t(8;11)(q11;p11), +7, -10, -17, -22, -X, -Y, 6q delesyonu ve dmin'ler sitogenetik olarak tanımlanmış anormalliklerdir (48).

Meningiomalı hastalarla yapılan çalışmaların $\frac{3}{4}$ 'ünde kromozom 22 kaybı gözlenmiştir. Erkeklerin $\frac{1}{3}$ 'ünde ise Y kromozomu kaybı bulunmuştur (48).

Nöroblastoma, MSS'nde beyin dışında gelişen, postganglionik nöronlardan orijin alan hücrelerin tümörüdür. Bu tümörler, spontan regresyon ile benign olarak seyredebilir veya malignant tümöre dönüşebilirler. Çocukluk döneminde sık görülürler. Nöroblastoma olgularının %70-80'inde görülen en genel sitogenetik abnormalite, kromozom 1p'nin delesyonları veya 1p'nin karıştığı diğer abnormalitelere. Kromozom 1p delesyonundan sonra en sık görülen karyotipik anormallikler, hsr ve dmin'lerdir. Dmin'ler, hsr'lerden 3 kat daha fazla görülürler. Ayrıca bazı nöroblastoma olgularında t(1;17)(p36;q12) translokasyonu görülmüştür (48, 52-55).

Benign ve malign formları bulunan, sinir kılıfı hücrelerinin tümörü olan nörinomada ise kromozom 22 kaybı, olguların $\frac{2}{3}$ 'ünde görülmektedir (48). Bu tümörde ayrıca, -12, -15, -X, -Y ve +5- +7 ve +20 saptanmıştır (56). Nöroblastoma ile ganglionöroma arasında ara geçiş evresi olan ganglionöroblastomada ve ganglionöromada bildirilmiş bir sitogenetik çalışma bulunmamaktadır.

Kanserde, konvensiyonel sitogenetik tekniklerin yanında, moleküler sitogenetik teknikler de kullanılmaktadır (4). KGH, moleküler sitogenetik bir teknik olup, en çok kanser çalışmalarında kullanılır. Yöntem, gelişimi ve optimizasyonunu takiben başta sık görülen akciğer, meme, melanoma ve nöroblastoma gibi kanserler olmak üzere, birçok tümör tiplerinde uygulanmıştır (57).

KGH kullanılarak çalışılan 35 nöroblastomalı olguda esas olarak 1p delesyonu ile birlikte 2p23-24 ve 17q11-23 amplifikasyonu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, kromozom 7, 9q, 11q, 12q, 13q, 14 q ve

15 q'da tekrarlayan kromozomal amplifikasyonlar ve delesyon belirlenmiştir (58). Yapılan diğer bir çalışmada, 29 nöroblastoma örneğinde en sık olarak kromozom 17'nin amplifikasyonu tespit edilmiştir (59).

KGH ile glioblastoma multiformede yapılan çalışmada, kromozom 7, 7p, 11q, 12q'nun amplifikasyonları ile 9p, 10 ve 13'ün delesyonları tanımlanmıştır (60, 61).

KGH ile 10 glioma hücre hattında yapılan çalışma sonucunda, kromozom 1, 4, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 18 ve X'te kayıplar ile, kromozom 7'de amplifikasyon olduğu görülmüştür (62).

Çocukluk dönemi merkezi sinir sistemi tümörü olan medulloblastomada yapılan çalışmada, en sık kromozom 17q ve 7'nin amplifikasyonu tespit edilirken, 5p15.3 ve 11q22.3'ün aşırı DNA amplifikasyonu ile birlikte değişik kromozomların delesyonları gözlenmiştir (50). KGH ile yapılan bir başka çalışmada, 12 medulloblastoma örneğinde, 4p, 7p, 9p, 14q, 17p ve Xp kromozomlarında artışlar tespit edilmiştir (63).

KGH ile, 5 ganglionöroblastoma örneğinde yapılan çalışma sonucunda, 8p, 9q, 10p, 12p, 17p, 18q artışları ile 1p delesyonu bulunmuştur (64).

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'ndan 1, ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan ganglionöroblastoma tanısı konmuş 4 olgu olmak üzere toplam 5 olgu ele alındı, ve bu olguların parafine gömülü arşiv tümör dokusu materyalleri üzerinde çalışıldı.

2.1 Tümör Dokusundan DNA İzolasyonu

5 olguya ait parafin blok doku materyalinden 5µm'lik kesitler alındı ve tümör bölgesinin lokalizasyonunu tespit etmek amacıyla her birinden 1 preparat hemotoksilen-eozin (H-E) ile boyandı. Boyanmamış preparatlar, H-E ile boyalı preparatlar ile karşılaştırılarak, tümörlü hücrelerin %40-50 yoğunlukta olduğu bölgelerden mikrodiseksiyon yöntemi ile kazıma yapılarak hücreler elde edildi.

2.1.1 Kullanılan Solüsyonlar

Parafini Uzaklaştırma Tamponu

Dokulardan parafini uzaklaştırmak için, DOP-PCR Master Kit (Boehringer Mannheim) içindeki tampon kullanıldı.

Tampon içeriği:

2X DOP-PCR Tampon

Brij-35 %0.01 (v/v)

10 mM Tris-HCl

100 mM KCl

3mM MgCl₂

Digest Buffer (Sindirim Tamponu)

Tampon A:

0.1M Tris-HCl (pH 7.4)

0,5M EDTA (pH 8.0)

1000 µl Tris-HCl ile 40 µl EDTA karıştırılarak hazırlandı.

%10 Sodium Dodesil Sülfat (%10 SDS):

10 gr. SDS'e 100 ml steril bidistile su eklenerek 37°C su banyosunda çözüldü. 0.22 µm'lik filtre (Costar) ile filtre edildi.

Proteinaz K Çözeltisi:

Proteinaz K

10 mM Tris-HCl

10 mg Proteinaz K (Boehringer Mannheim), 1 ml Tris-HCl içinde çözüldü.

178 µl Tampon A, 6 µl %10'luk SDS, 16 µl Proteinaz K karıştırılarak hazırlandı.

2.1.2 İşlemler

Kazınan doku parçaları steril 0.5ml'lik kapaklı ependorfa alındı, üzerine 250 µl parafini uzaklaştırma tamponu ve 25 µl steril bidistile su eklendi. 95°C'de 20 dakika inkübe edildi. 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüjden sonra, dökelti atıldı. Kazınan doku parçalarını içeren çökelti, %70'lik alkol ile yıkandı, 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Çökelti üzerine 200 µl sindirim tamponu eklendi. 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Üzerine 60 µl doymuş NaCl eklenip vorteksle karıştırıldı. 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve dökelti temiz tüpe aktarıldı. Üzerine yaklaşık 250 µl izopropanol eklendi ve -20°C'de 25 dakika bekletildi. 12.000 rpm'de +4°C'de 13 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alkol uzaklaştırıldı, örnek 37°C etüvde kurutuldu, ve miktarına göre belirlenen oranda steril bidistile suda çözüldü.

2.2 Tümör Dokusundan Elde Edilen DNA'dan Birinci Basamak DOP-PCR Amplifikasyonu (65)

Tümör dokusundan elde edilen DNA'dan, 1. Basamak DOP-PCR amplifikasyonu için, DOP-PCR Master Kit (Boehringer Mannheim) kullanıldı.

2.2.1 Kullanılan Solüsyonlar

1) DOP-PCR master miks solusyonu (pH 8.3)

2X DOP-PCR Tampon

25 U Taq DNA Polimeraz, 20 mM Tris-HCl içinde

Brij 35, % 0.01 (v/v)

dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, her biri 0.4 mM)

10 mM Tris-HCl
100 mM KCl
3 mM MgCl₂

2) DOP-PCR primer

Primer dizisi: 5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTGG -3'
(N=A,C,G,T, yaklaşık aynı oranda)

3) PCR için steril su

4) Kontrol DNA'sı, 1 ng/μl

2.2.2 İşlemler

0,5 ml steril ependorf tüpü içerisinde toplam hacim 50 μl olacak şekilde reaksiyon koşulları aşağıdaki düzenekte hazırlandı.

DOP-PCR koşulları

2X DOP-PCR Master Mix Solusyonu	25	μl
DOP-PCR Primer	2,5	μl
DNA (100 ng/μl)	2	μl
Deiyonize su	20,3	μl
<u>Extra Taq Polimeraz</u>	<u>0,2</u>	<u>μl</u>
Toplam Hacim	50	μl

Thermal Cycler'da (Techne) Uygulanan Amplifikasyon Koşulları

94°C 1 dakika 1 döngü

30°C 1,5 dakika

30°C-72°C 3 dakika 5 döngü

72°C 3 dakika

94°C 1 dakika

62°C 1 dakika 35 döngü

72°C 2 dakika

72°C 7 dakika

Ürünlerin Agaroz Jelde Gözlenmesi

Birinci Basamak DOP-PCR ürünleri, %1,2'lik agaroz jelde 80 Voltta, EcoRI/Hind III DNA marker'ına (Fermentas) karşılık olarak yürütüldü, ve 200-2000 bp arasındaki DNA fragmentleri elde edildi. (şekil)

2.3 Kontrol DNA'larının Periferik Kandan Eldesi

2.3.1 Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Tamponu (pH 8.0)

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

1 mM EDTA (pH 8.0)

1 litre lizis tamponu hazırlamak için, 8,28 g NH_4Cl (Sigma), 1 g KHCO_3 (Sigma), 4 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) (Sigma) 200 ml bidistile suda çözülerek solüsyon hacmi bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

White Blood Lysis (WBL) Tamponu (pH 7.4):

100 mM NaCl

25 mM EDTA

100 ml WBL tamponu hazırlamak için, 2,5 ml 4 M NaCl (Merck) ve 5 ml 0,5 M EDTA (Sigma), toplam hacim 100 ml olacak şekilde, bidistile suda çözüldü. Otoklavda steril edildi.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Solüsyonu:

10 g SDS (Boehringer Mannheim), toplam hacim 100 ml olacak şekilde bidistile suda 37°C'ta çözüldü, ve 0,22 μm 'lik filtreden geçirilerek, steril edildi

Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml)

Proteinaz K

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mg Proteinaz K (AppliChem), 1 ml 10 mM Tris-HCl, içinde çözüldü.

Amonyum Asetat (Am-Ac) Solüsyonu (9,5 M)

50 ml Am-Ac solüsyonu hazırlamak için, 36,613 g Am-Ac (Sigma), 15 ml bidistile suda çözüldü, çözüldükten sonra toplam hacim bidistile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi

2.3.2 İşlemler

Normal bir erkek ve normal bir kadın bireyden, K3-EDTA içeren tüplere 10'ar ml kan alındı. Tüp içindeki kan, homojenizasyon amacıyla iyice altüst edildi. Kanlar, 50 ml'lik Falkon tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 40 ml'ye tamamlanacak şekilde lizis tampon eklendi. Kanlar Falkon tüpleri içinde, eritrositlerin lizisini kolaylaştırmak amacıyla 15 dakika -20 °C'de bekletildi. 1500 rpm'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti uzaklaştırıldı, ve elle tüpe vurularak çökelti homojenize edildi. Üzerine 30 ml lizis tampon eklendi. 1500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti uzaklaştırıldı, elle tüpe vurularak çökelti homojenize edildi. Homojenizasyonu tamamlanan çökelti üzerine 9,4 ml WBL, %10 SDS, ve 50 µl proteinaz K ilave edildi, ve 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün her örnek üzerine 3,7 ml 9,5 M Am-Ac eklendi. 5000 rpm'de, 25°C'de, 25 dakika santrifüj edildi. DNA'yı içeren dökelti temiz tüpe aktarıldı, üzerine 1:2 oranında izopropanol eklendi ve tüp yavaşça altüst edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. DNA 1,5 ml'lik ependorfta 500 µl %70'lik alkol içinde yıkandı. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. DNA, miktarına bağlı olarak 100-200 µl bidistile steril su içinde çözüldü ve 37°C etüvde yaklaşık bir saat çözünmeye bırakıldı. Süre tamamlandıktan sonra +4°C'de saklandı.

2.4 Periferik Kandan Elde Edilen Normal DNA'dan 1. Basamak DOP-PCR Amplifikasyonu (65)

Periferik kandan elde edilen normal DNA'dan birinci basamak DOP-PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Tümör dokusunda da

kullanılan DOP-PCR Master Kit (Boehringer Mannheim) kullanıldı, ve aynı işlemler gerçekleştirildi (Bkz. 2.2.2).

2.5 Normal Kişilerden Periferik Kandan Kromozom Eldesi (37)

2.5.1 Periferik Kan Kültüründe Besi Ortamı

RPMI Medium 1640 HEPES	(Irvine Scientific)	100 ml
Föetal calf Serum (FCS)	(Seromed)	15 ml
Fitohemaglutinin (PHA)	(Seromed)	0,75ml
L-Glutamin	(Sigma)	1 ml
Penisilin-Streptomisin	(Irvine Scientific)	0,1 ml

2.5.2 İşlemler

Normal bir erkek ve normal bir kadından heparinli enjektör kullanılarak alınan periferik kandan kromozom eldesi için, Moorhead ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek uygulandı (37). 5 ml RPMI 1640 HEPES besi ortamı içeren steril deney tüplerine, 0,4 ml kan damlatılarak kültür kuruldu. Tüpler, ağızları parafilmli olarak toplam 72 saat 37°C etüvde bekletildi.

2.5.3. Kromozom Eldesi

2.5.3.1 Kullanılan Solüsyonlar:

Kolçisin Solüsyonu

1 mg'lık kolçisin tableti 10 ml bidistile suda çözüldü. Bu stoktan 1 ml alınarak, üzerine 9 ml bidistile su eklendi ve final konsantrasyonunun 10 µg/ml olması sağlandı.

Hipotonik Solüsyonu:

0.075 M KCl

100 ml'lik solüsyon hazırlamak için 0.5592 g KCl (Merck) tartılıp, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve çalışma öncesi 37°C etüve bırakıldı.

Fiksatif Solüsyonu

Metanol (Merck) ve Glasial Asetik Asit (GAA) (Merck), 3:1 oranında taze hazırlanarak kullanıldı.

2.5.3.2 İşlemler

Kültüre 70. saat sonunda, final konsantrasyonu 0.1 mgr/ml olacak şekilde 0.05 ml (1 damla) kolçisin eklendi, hafifçe karıştırıldı. 2 saat, 37°C etüvde bekletildi. Tüp içindeki kültür materyali, pastör pipeti ile dereceli konik santrifüj tüplerine aktarıldı, hafifçe pipetaj yapıldı. 1570 rpm'de, oda ısısında, 8 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı ve çökelti pastör pipeti ile hafifçe karıştırıldı. Üzerine 8 ml hipotonik solüsyonu eklendi ve 10 dakika 37°C etüvde bekletildi. 1570 rpm'de, oda ısısında, 8 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldıktan sonra çökeltinin pipet ile hafifçe karışması sağlandı. Çökelti üzerine 4 ml fiksatif solüsyonu hızla eklenip, hemen pipetaj yapıldı. 1570 rpm'de, oda ısısında, 8 dakika santrifüj edildi. Fiksatif ile yıkama basamağı, 2 kez daha tekrar edildi. Son yıkamada, çökeltinin miktarına bağlı olarak bir miktar fiksatif solüsyonu bırakılıp, iyice pipetaj yapıldı. Önceden beyaz sabun ile bidistile suda yıkanmış ve bidistile suda bekletilmiş olan lamalar kurulandıktan sonra hohlama yöntemi ile nemlendirildi ve lamaların üzerine kültür solüsyonundan 1

damla damlatılarak havada kurutuldu. Yayma yapılan preparatlar, oda sıcaklığında saklandı.

2.6 Normal DNA ve Tümör DNA'sının İkinci DOP-PCR Kullanılarak Floresan ile İşaretlenmesi (65)

2.6.1 Kullanılan Solüsyonlar

dNTP'ler:

Her bir dNTP solüsyonu için, 100 mM stoktan 5 µl dNTP (Fermentas) alınıp, üzerine 95 µl ddH₂O konularak hazırlandı.

Spectrum Red dUTP:

Lyofilize haldeki 50 nmol Spectrum Red-dUTP (Vysis) üzerine 50 µl ddH₂O konularak hazırlandı.

MgCl₂:

25 mM hazır MgCl₂ karışımı (Fermentas).

PCR Tamponu, (MgCl₂'siz):

Hazır solüsyon kullanıldı.

Tampon Karışımı:

Normal DNA için:

5 mM dATP	2 µl
5 mM dCTP	2 µl
5 mM dGTP	2 µl
Spectrum Red-dUTP (50 nmol)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
PCR tamponu	14 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tümör DNA'sı için:

5 mM dATP	2 µl
5 mM dCTP	2 µl
5 mM dGTP	2 µl
Spectrum Green-dUTP (50 nmol)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
PCR tamponu	14 µl
Toplam Hacim	25 µl

2.6.2 İkinci Basamak DOP PCR Koşulları

Hem normal DNA hem de tümör DNA'sı için aşağıda verilen koşullar uygulanarak, ikinci DOP-PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Tampon Karışımı	25 µl
DOP-Primer	1,5 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
DNA (1. DOP-PCR ürünü)	1 µl (100 ng)
dH ₂ O	22 µl
Toplam Hacim	50 µl

Ürünlerin Agaroz Jelde Gözlenmesi

İkinci Basamak DOP-PCR ürünleri, %1,2'lik agaroz jelde 80 Voltta, EcoRI/Hind III DNA marker'ına (Fermentas) karşılık olarak yürütüldü, ve 200-2000 bp arasındaki DNA fragmentleri elde edildi.

2.7 Prob Presipitasyonu

2.7.1 Kullanılan Solüsyonlar

3 M Sodyum Asetat (Na-Ac).3H₂O Solüsyonu

81,62 g Na-Ac (Merck), 200 ml dH₂O'da çözüldü. pH'sı 7.0'a ayarlandı.

Prob Solüsyonu

5 ml Formamide (Sigma), 1 ml dekstran sülfat (Sigma), 4 ml 2XSSC (Salin Sodyum Sitrat) karıştırılarak 10 ml olarak hazırlandı.

2.7.2 İşlemler

100 ng tümör DNA'sı, 100 ng normal DNA, 10 µl human (insan) Cot-1 DNA'sı, 2,5 µl 3M Na-Ac, ve 66 µl %100'lük saf etanol, 0,5 ml'lik ependorf tüpünde karıştırıldı, 1 saat süreyle -20°C'de bekletildi. 13.000 rpm'de, oda ısısında 30 dakika santrifüj edildi. Dökelti uzaklaştırıldı. Çökelti 20 dakika 37°C etüvde kurutuldu, daha sonra 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 10 dakika sonunda çökelti 15 µl prob solusyonunda çözüldü, 15 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi, arada bir vorteks ile karıştırıldı.

2.8 Prob Denatürasyonu

Prob DNA'sı, 70°C su banyosunda, 5 dakika denatüre edildi, 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. 37°C su banyosunda 30 dakika bekletildi.

2.9 Kromozomların İşlenmesi ve Denatürasyonu

2.9.1 Kullanılan Solüsyonlar

2XSSC:

20XSSC'den (Sigma) 100 ml alınıp bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak kullanıldı.

10 mg/ml RNaz A (Boehringer Mannheim)

RNaz A Solüsyonu:

10 µl RNaz A, 1 ml 2XSSC (pH 7.0) ile 1,5 ml'lik ependorf tüpünde hazırlandı, kullanımdan önce 15 dakika 37°C etüvde tutuldu.

100 mg/ml Pepsin (Sigma)

Pepsin Solüsyonu:

Dik şalede 50 µl pepsin stok üzerine, 1 ml 1N HCl ve 99 ml ddH₂O konulduktan sonra karıştırılarak hazırlandı ve kullanımdan 20 dakika önce 37°C su banyosunda tutuldu.

1XPBS Tamponu:

8 gr. NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na₂HPO₄, ve 0,24 gr. KH₂PO₄ 800 ml suda çözüldü, pH'sı 7.4'e getirilip, bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav edilerek steril hale getirildi.

Post-fiksasyon Solüsyonu:

1XPBS

50 mM MgCl₂

%50 Formaldehit

20 ml Formaldehit (Birpa), 80 ml 1XPBS ve 1 ml 50 mM MgCl₂ karıştırılarak hazırlandı.

2.9.2 İşlemler

Önceden yayılmış ve oda sıcaklığında bekletilmekte olan preparatlar incelenerek, yaklaşık 600 bant uzunluğundaki kromozomları içeren en az 10 metafazın bulunduğu bölge, elmas kalemi ile işaretlendi. Preparatlar, 2XSSC'de (pH 7.0), oda ısısında, 5 dakika tutuldu. Daha önce 37°C su banyosunda bekletilen RNaz A solüsyonundan, her bir preparat üzerine 200 µl eklendi, önceden elmas kalem ile işaretli bölge üzerine 24X50 mm'lik lamel kapatılarak 37°C'de moist chamber'da (nemli kutu) 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda lamel uzaklaştırıldı.

Preparatlar, RNase A'nın uzaklaştırılması amacıyla 2XSSC'de (pH 7.0) oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika süreyle yıkandı. Preparatlar pepsin solüsyonu içinde 37°C su banyosunda 8 dakika süreyle inkübe edildi. Preparatlar 1XPBS'te (pH 7.0) oda sıcaklığında 2 kez 5'er dakika süreyle yıkandı. 1XPBS+50 mM MgCl₂ ile 5 dakika oda sıcaklığında yıkama yapıldı. Preparatlar post-fiksasyon solüsyonunda, 10 dakika, oda sıcaklığında tutuldu. 1XPBS'de, oda sıcaklığında 5 dakika süreyle yıkama yapıldı. Preparatlar, buz üstünde sırasıyla %70, 90, ve 100'lük alkol konsantrasyonlarında her birinde 3'er dakika süreyle tutularak dehidrate edildi. Preparatlar

dikey pozisyonda tutularak, kurutma kağıdı üzerinde havada kurutuldu.

2.10 Metafaz Kromozomlarının Denatürasyonu

2.10.1 Kullanılan Solüsyonlar

Denatürasyon Solüsyonu:

%70 Formamid, 2XSSC (pH 7.0)

Proteinaz K Solüsyonu:

10 µl stok Proteinaz K (1 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) (Boehringer Mannheim) ve 100 ml Tris-CaCl₂ (20 ml Tris-HCl pH 7.5, 2mM CaCl₂ pH 7.5) karıştırılarak hazırlandı.

2.10.2 İşlemler

Metafaz kromozomları, 68°C'de, %70 Formamid (Sigma), 2XSSC (pH 7.0) içinde 1 dakika 15 saniye süreyle denatüre edildi. Preparatlar, buz üstünde sırasıyla %70, 90, 100'lük alkol konsantrasyonlarında 3'er dakika süreyle her birinde 3 kez tutularak dehidrasyon sağlandı. Preparatlar dikey pozisyonda havada kurutuldu. Proteinaz K solüsyonu ile oda sıcaklığında 7,5 dakika boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Preparatlar buz üstünde sırasıyla %70, 90, 100'lük alkol konsantrasyonlarında 3'er dakika süreyle her birinde 3 kez tutularak, dehidrasyon sağlandı.

2.11 Hibridizasyon

2.11.1 İşlemler

Preparatlar 37°C hot-plate üzerinde bekletildi. Daha önce hazırlanmış ve denatüre edilmiş prob, 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Preparatta, daha önce elmas kalemi ile işaretlenmiş kısmın orta bölgesine 15 µl prob konuldu. 24X24 mm'lik, %70 alkol ile yıkanmış lamel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Lamelin etrafı yapıştırıcı (Punto fix) ile kapatıldı. 37°C'de moist chamber içinde 2 gün hibridizasyona bırakıldı.

2.12 Yıkama

2.12.1. Kullanılan Solüsyonlar

%50 Formamid, 2XSSC (pH 7.0)

1XPN Tampon Solüsyonu

58.99 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) ve 88.99 gr. Na_2HPO_4 (Merck)
500 ml bidistile suda çözülerek hazırlandı.

DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (Sigma):

1 mg/ml DAPI'dan 2 µl alınarak, 198 µl bidistile suda çözüldü.

2.12.2 İşlemler

Hibridizasyonu takiben, preparatlar üzerindeki lameller uzaklaştırıldı. Preparatlar, %50 Formamid , 2XSSC'de (pH 7.0) 45°C'de 3 kez 10'ar dakika süreyle yıkandı. 2XSSC'de (pH 7.0) oda

45°C'de 3 kez 10'ar dakika süreyle yıkandı. 2XSSC'de (pH 7.0) oda sıcaklığında 10 dakika tekrar yıkandı. Yıkama sonrası, preparatlar, %0,1 Nonidet P-40 (NP-40) içeren 1XPN tampon solüsyonunda, oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletildi ve sonra 10 dakika bidistile suda yıkandı. Preparatlar dikey pozisyonda havada kurutuldu. 20 µl DAPI solüsyonu, preparatta işaretli bölgenin ortasına gelecek şekilde konuldu, 24X50 mm büyüklüğündeki lamel ile, hava kabarcığı bırakmayacak şekilde kapatıldı. Lamelin etrafı oje ile kapatıldı, inceleninceye kadar +4°C'de tutuldu.

2.13 Hazırlanan Preparatların Görüntüleme Sistemi ile Analizi

Hibridizasyon sonrası elde edilen metafazlar, cooled charge-coupled (CCD) kamera (COHU), üçlü floresan filtre (DAPI, FITC, Texas Red), ve Perceptive Scientific Instruments (PSI) Workstation Mac Probe Version 4.0 yazılım programı bağlantılı flöresan mikroskopta (Olympus BX 50) incelendi.

Yeşil floresan izotiyosiyanat (FITC), kırmızı tetraetilrodamin izotiyosiyanat (Texas Red), ve mavi (DAPI) flöresan filtreler kullanılarak elde edilen metafaz görüntülerinden, flöresan bant modeline göre her bir metafazın karyotipi yapıldı.

Her hasta için 10 metafaz incelendi, yeşil spektrum işaretli tümör DNA'sı ve kırmızı spektrum işaretli normal DNA'nın normal kromozomlar üzerindeki yeşil/kırmızı (Y/K) oranı belirlendi. Bu oranların ortalama hibridizasyondan sapmaları, DNA artış ve azalışları olarak kromozomlar üzerinde gösterildi.

Kromozomlar boyunca, floresan yoğunluk oran profilleri oluşturuldu. Ortalama oran değişiklikleri ve standart sapmalar,

Perceptive Scientific Instruments (PSI) workstation bilgisayar yazılım programı kullanılarak belirlendi. Üst ve alt oran eşikleri, artışlar için 1.5 ve azalışlar için 0.5 olarak belirlendi. Bu sınırların dışında çıkan herhangi bir oran, DNA kopya sayısı değişikliği olarak yorumlandı.

BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'ndan 1, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'ndan 4 olmak üzere, ganglionöroblastoma tanısı almış toplam 5 olgu çalışıldı. DNA izolasyonları, flöresan işaretleme ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyonu takiben elde edilen metafazlar, PSI-görüntü analiz sistemi ile analiz edilerek, tümör DNA'larındaki kopya sayısı değişiklikleri belirlendi.

3.1 Ganglionöroblastomalı Dokulardan Elde Edilen DNA'ların ve Normal DNA'ların Ölçüm Sonuçları

Parafine gömülü dokulardan elde edilen 5 olguya ait DNA'ların ve normal bireylerin kanlarından salting-out yöntemi ile elde edilen DNA'ların verimleri ve konsantrasyonları sırasıyla Tablo 3.1 ve 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Ganglionöroblastomalı 5 olgunun parafine gömülü dokularından direkt DOP-PCR amplifikasyonu ile elde edilen DNA'ların ölçüm sonuçları.

Olgu No.	DNA Verimi	DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)
1	1.62	600
2	1.45	640
3	1.40	600
4	1.65	680
5	1.42	670

Tablo 3.2. Normal DNA'ların verimleri ve konsantrasyonları.

Olgu No.	DNA Verimi	DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)
1 (dişi)	1.75	2705
2 (erkek)	1.78	2560

3.2 Direkt DOP-PCR Amplifikasyonu ile Elde Edilen Ürünlerin Agaroz Jelde Gösterilmesi

Direkt DOP-PCR amplifikasyonu ile elde edilen normal DNA'lar ve tümör DNA'ları, %1.2'lik agaroz jelde yürütülerek 200-2000 bp arasında DNA ürünleri elde edildi (Şekil 3.1, 3.2).



Şekil 3.1 Direkt birinci DOP-PCR amplifikasyonu ile elde edilen normal DNA'ların % 1.2'lik jelde görüntüsü. M: Eco RI/Hind III DNA marker 1: Dişi Normal DNA; 2: Erkek Normal DNA

M 1 2 3 4 5

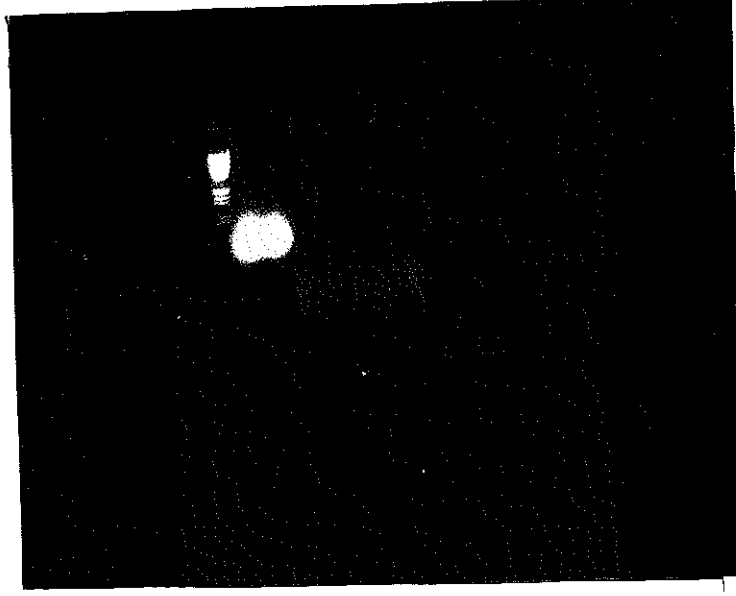


Şekil 3.2 Direkt birinci DOP-PCR amplifikasyonu ile elde edilen tümör DNA'larının % 1.2'lik jelde görüntüsü. M: Eco RI/Hind III λ DNA marker, 1-5: olgu DNA'ları.

3.3 İkinci DOP-PCR Kullanılarak Floresan İşaretleme Sonucu Elde Edilen Ürünlerin Agaroz Jelde Gösterilmesi

Birinci DOP-PCR ile direkt amplifiye edilen tümör DNA'sının kırmızı, normal DNA'nın yeşil spektrum ile ikinci DOP-PCR kullanılarak floresan işaretlenmesi sonucu elde edilen ürünler, Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

M 1 2 3 4 5 6 7



Şekil 3.3 İkinci DOP-PCR kullanılarak işaretlenmiş normal ve tümör DNA'ların %1.2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Eco RI/Hind III λ DNA marker, 1-2: kırmızı spektrum işaretli normal erkek ve dişi DNA, 3-7: yeşil spektrum işaretli tümör DNA'ları.

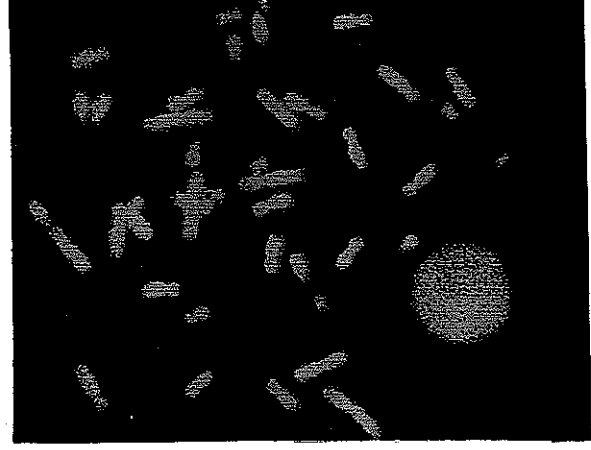
3.4 Hibridizasyon Sonrası Gerçekleştirilen Dijital Görüntü Analizi

Sonuçları

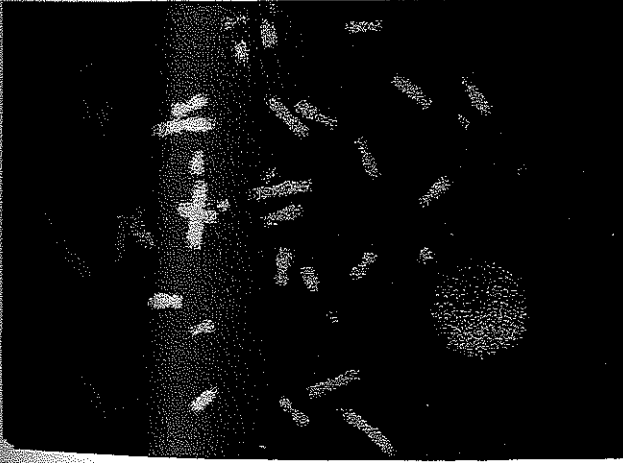
İşaretlenmiş tümör ve normal DNA'ların metafaz yaymaları ile hibridizasyonunu takiben, preparatlar flöresan mikroskop altında incelendi. Metafazlar, DAPI boya ile görünür hale getirildi. Mavi (DAPI), yeşil (FITC), kırmızı (TRITC) filtreler kullanılarak metafaz görüntüleri elde edildi (Şekil 3.4).



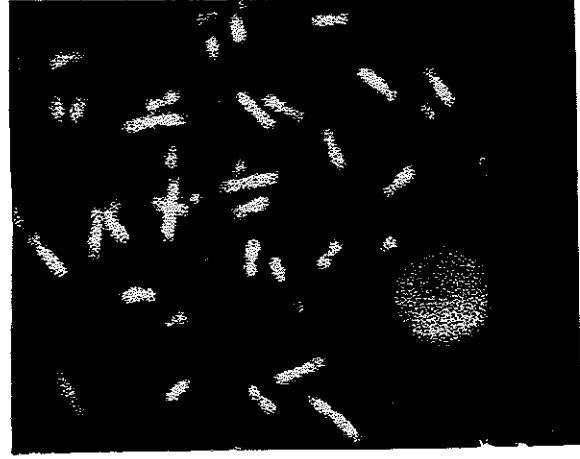
(a)



(b)



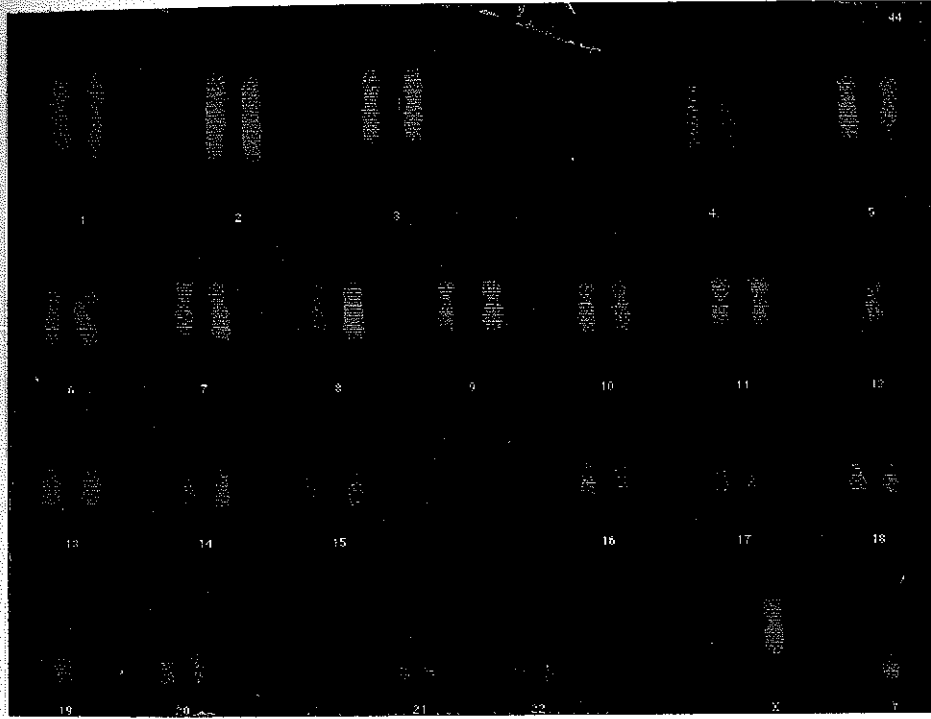
(c)



(d)

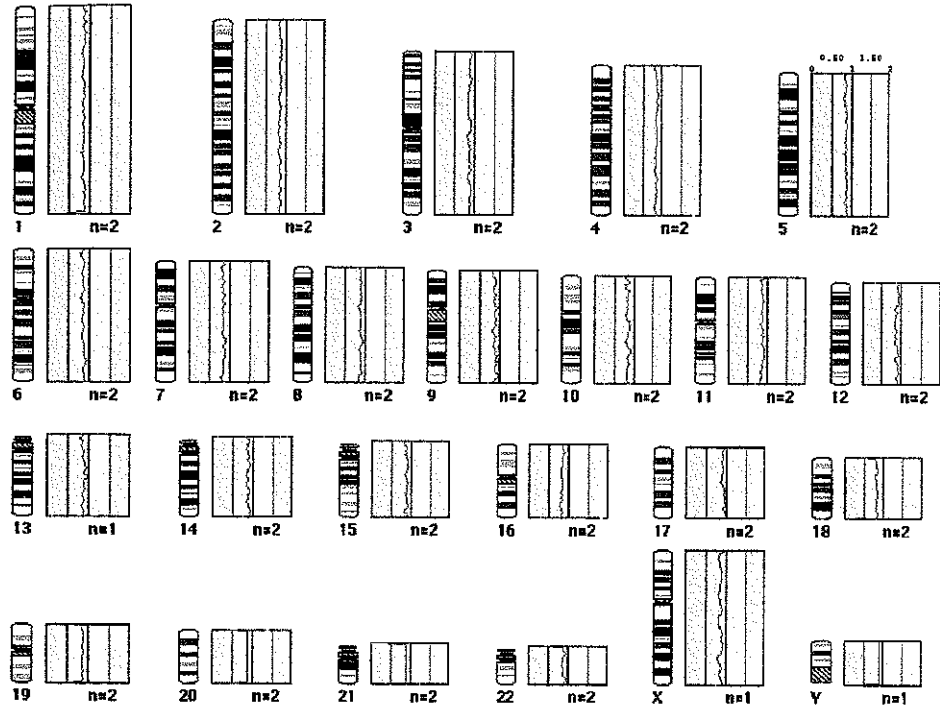
Şekil 3.4 a) Mavi (DAPI), b) yeşil (FITC), c) kırmızı (TRITC) d) yeşil ve kırmızı flöresan filtreler kullanılarak elde edilen metafaz görüntüleri

DAPI boya ile görünür hale getirilen metafazlardan, DAPI band modeline göre karyotipler elde edildi (Şekil 3.5).



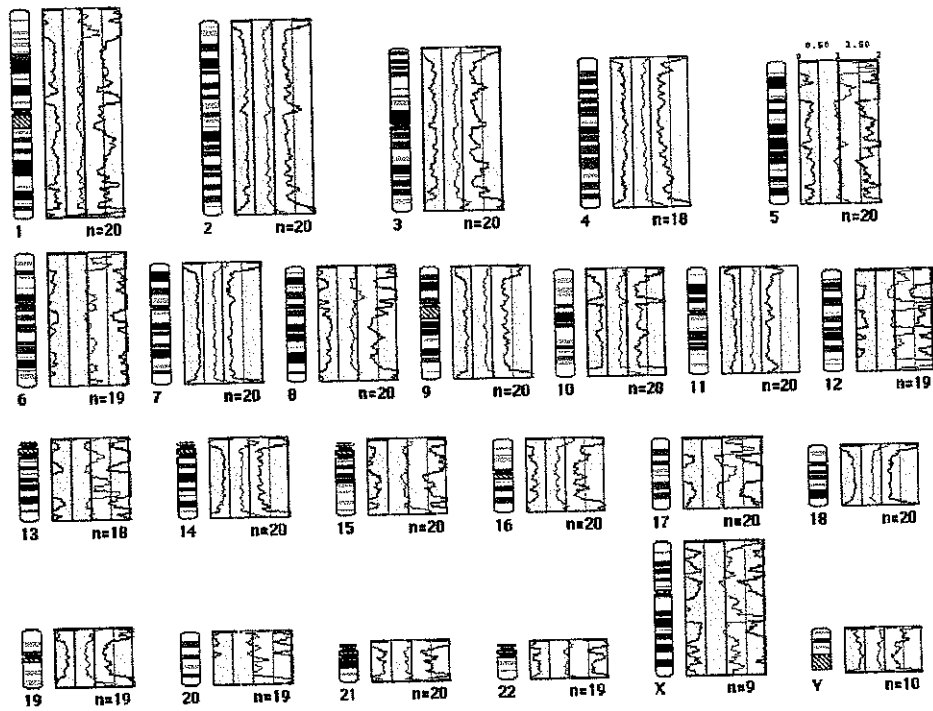
Şekil 3.5. DAPI band modeline göre elde edilmiş karyotip örneği.

Elde edilen karyotiplerden, yeşil/kırmızı oranlarının belirlenmesi için, daha önce yapılan ve sistemin işlerliğini gösteren normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Analiz öncesi gerçekleştirilen ve normal sınırlar (0,5 ve 1,5) içinde yeşil/kırmızı oranı veren hibridizasyon profili, Şekil 3.6'da verilmektedir.



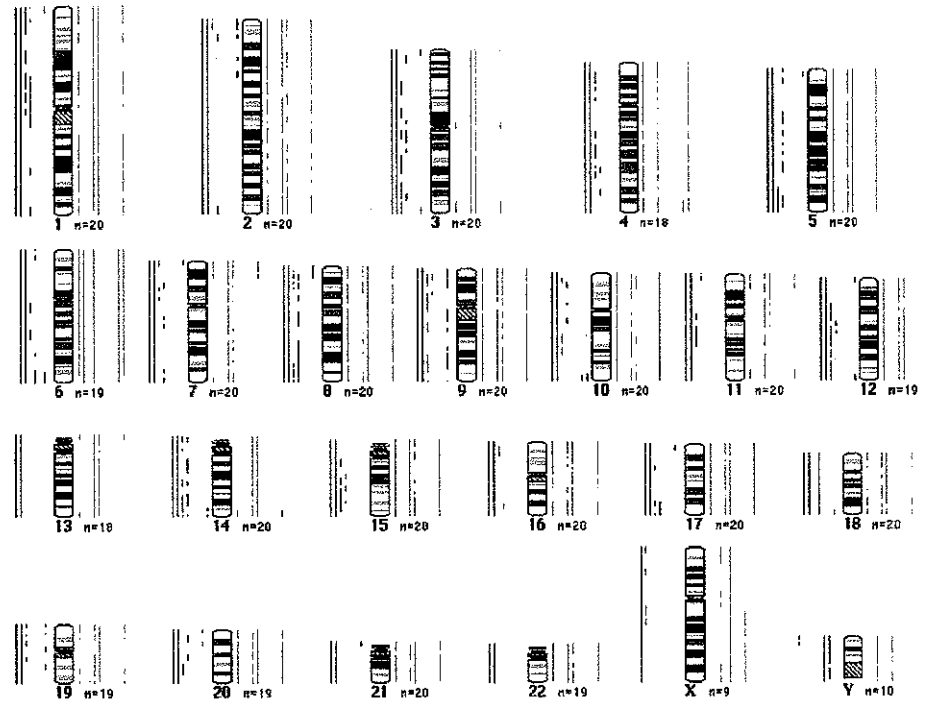
Şekil 3.6. Yeşil/kırmızı floresan yoğunluklarının normalizasyonu

Her bir olgu için, elde edilen karyotiplerden, PSI MacProbe 4.0 yazılım programı kullanılarak hibridizasyon oranları belirlendi (Şekil 3.7).



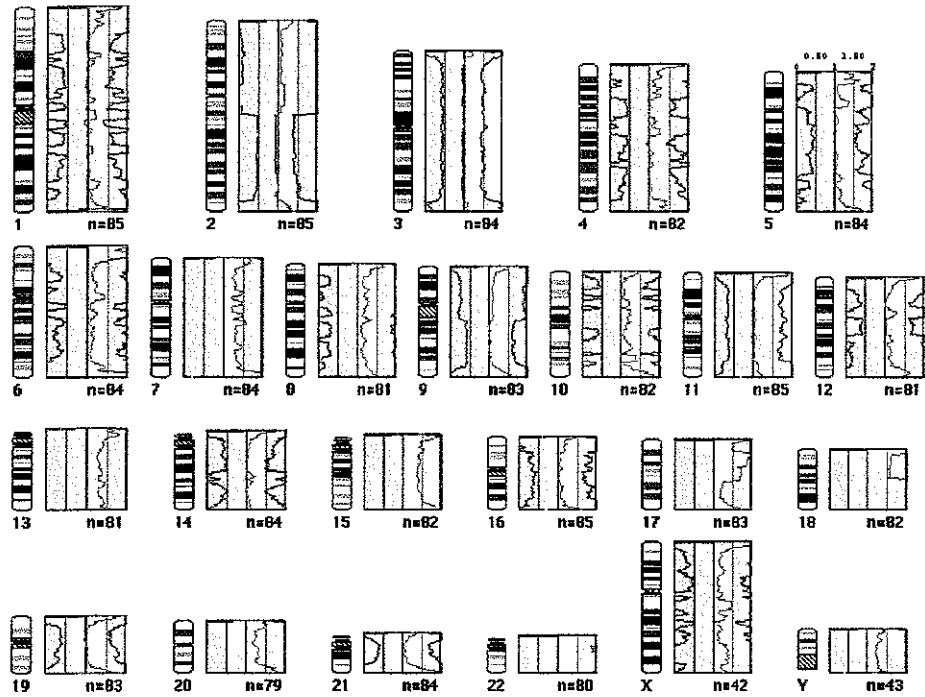
Şekil 3.7. 3. olguya ait incelenen 10 metafazın profil değerleri. Soldaki çizgi delesyon, sağdaki çizgi amplifikasyon ve ortadaki mavi çizgi amplifikasyon/delesyon ortalama değerini göstermektedir.

Ayrıca her olguya ait amplifikasyon ve delesyon oranları, kırmızı ve yeşil çubuklarla gösterildi (Şekil 3.8).



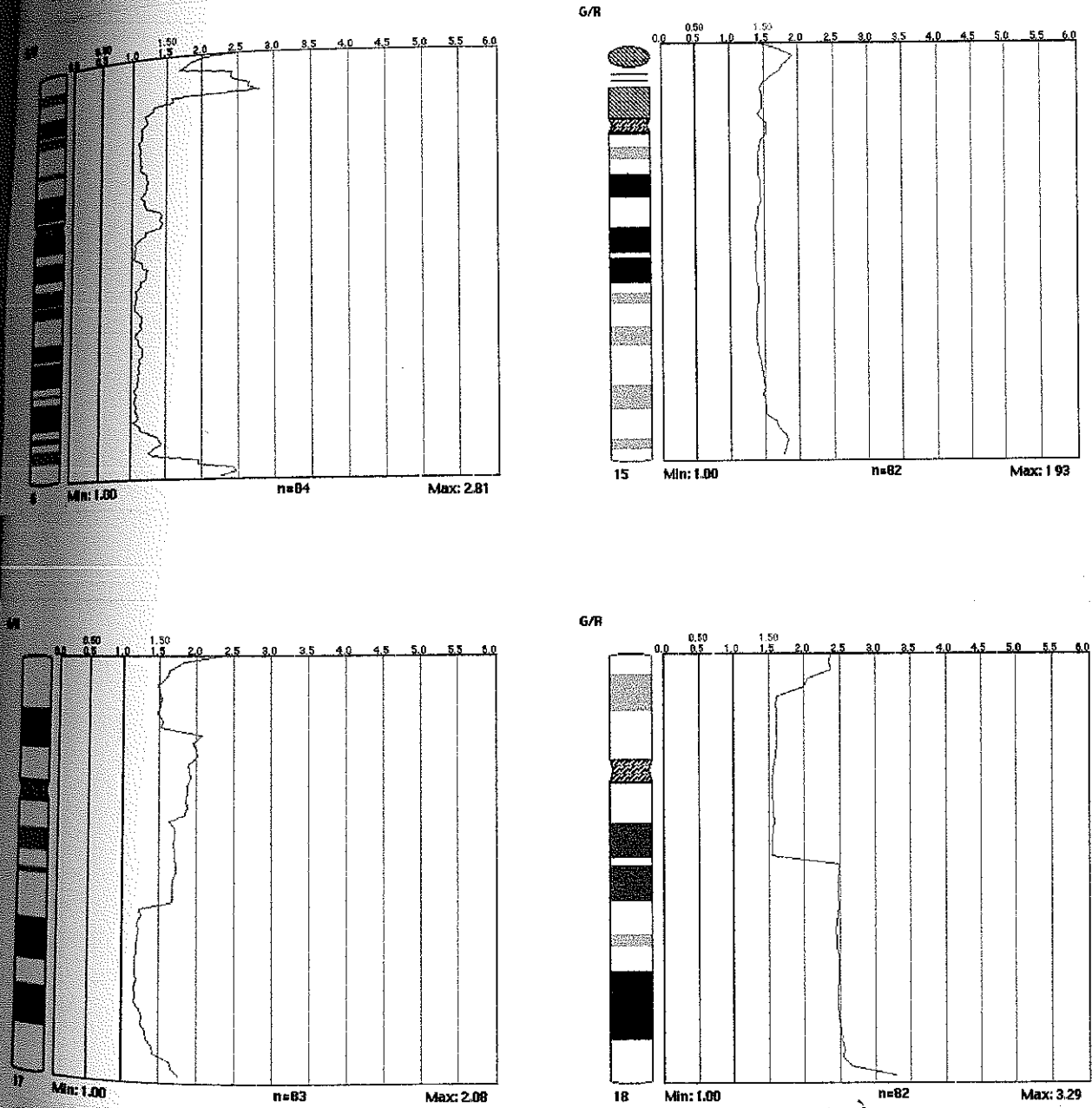
Şekil 3.8. İncelenen 10 metafaz örneğindeki her bir kromozoma ait amplifikasyon ve delesyon oranları. Kırmızı çubuklar delesyonu, yeşil çubuklar amplifikasyonu göstermektedir.

Her bir olgu için incelenen metafazların ortalaması alınarak bütün olgular için amplifikasyon ve delesyon oranları saptandı (Şekil 3.9).

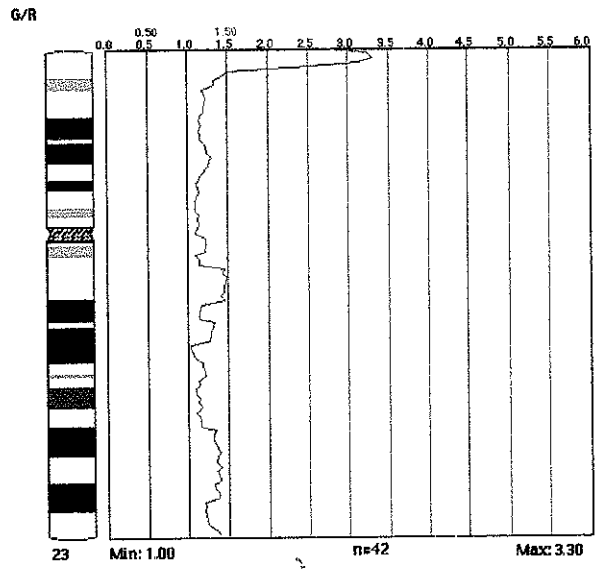
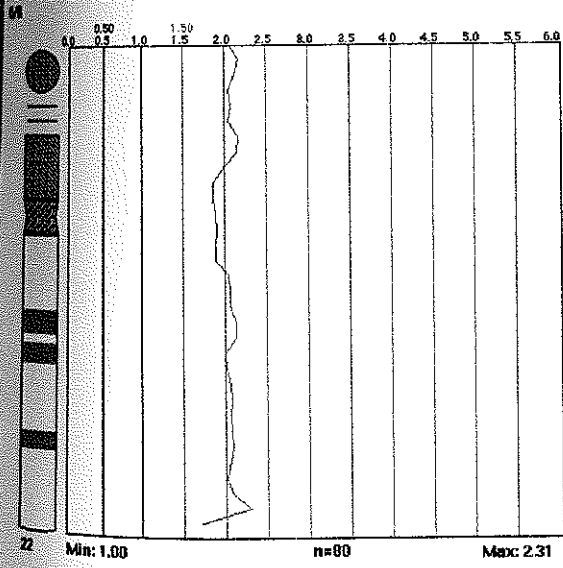
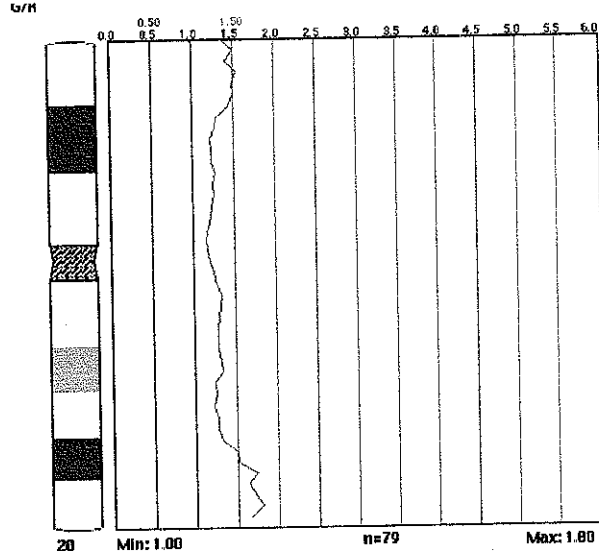


Şekil 3.9. Karyotipteki bütün kromozomlar için elde edilen hibridizasyon oranları. Sol taraf (kırmızı) delesyon, sağ taraf (yeşil) amplifikasyon ve ortadaki mavi çizgi, amplifikasyon/delesyon ortalama değerini göstermektedir.

Elde edilen hibridizasyon oranlarına göre, amplifiye olan kromozomların profilleri, Şekil 3.10'da verilmiştir.

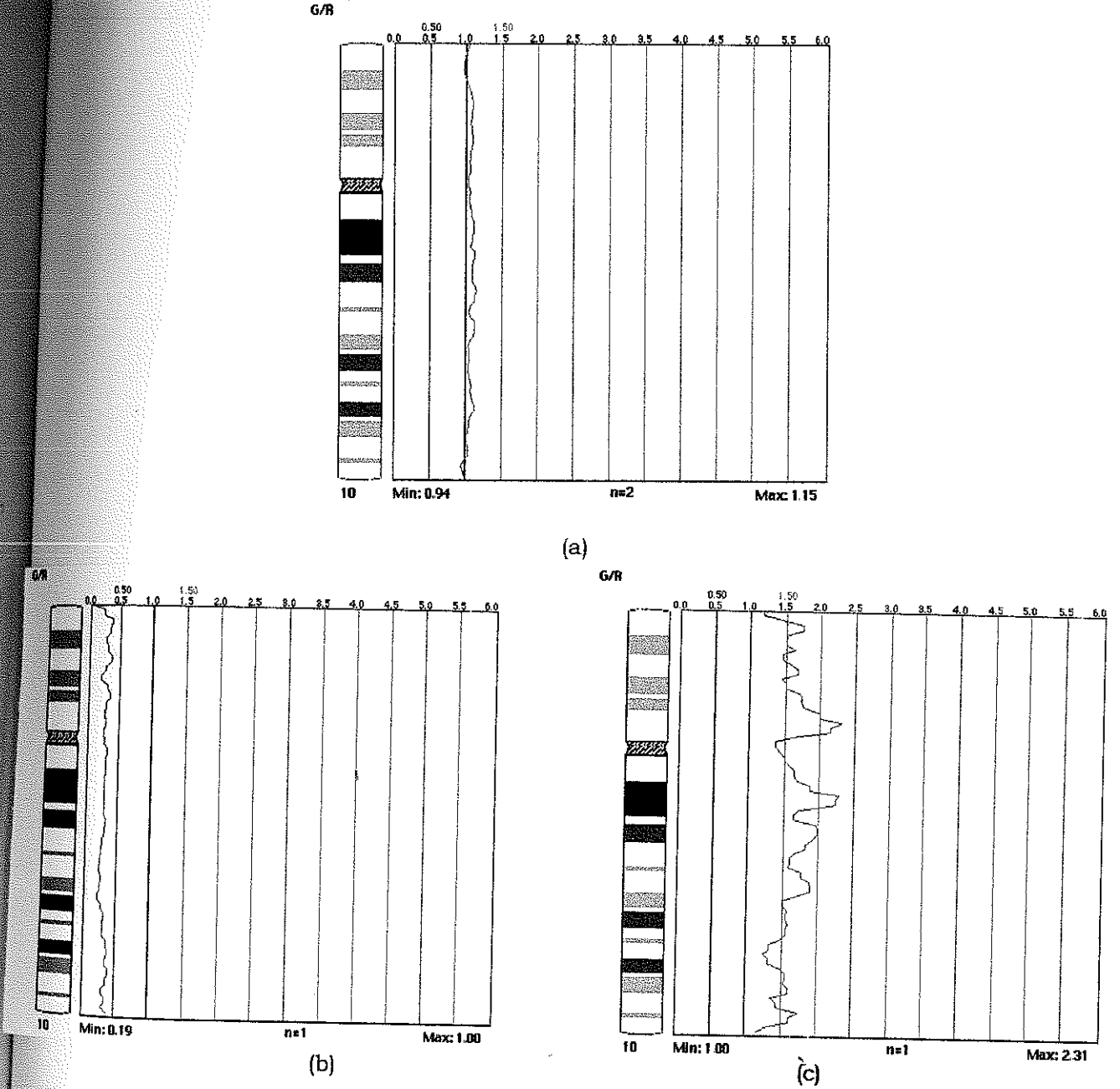


Şekil 3.10 Amplifiye olan kromozomların profilleri



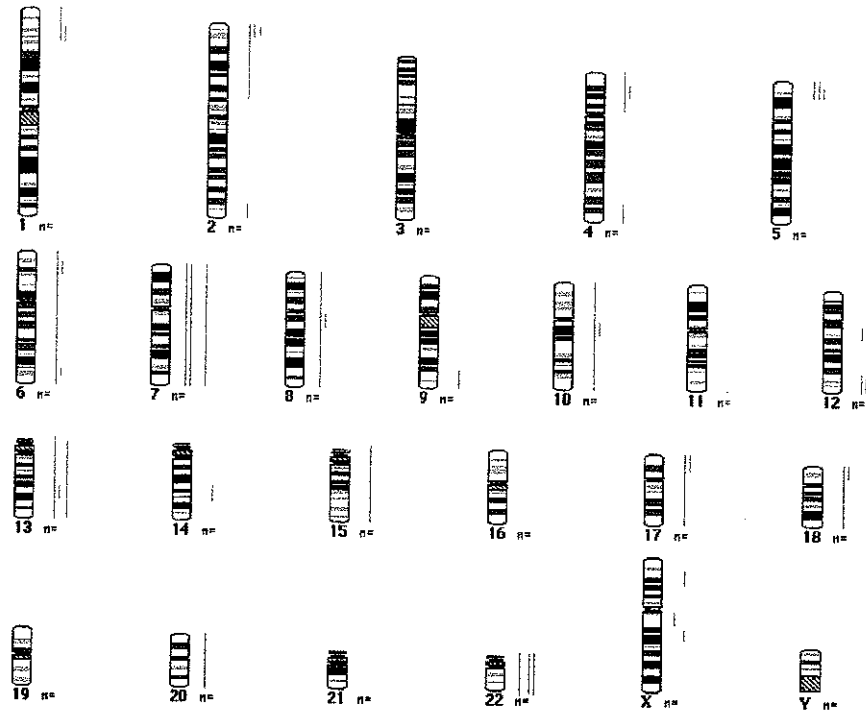
(Şekil 10'un devamı)

Amplifikasyon ve delesyon gözlenen kromozomlar tek tek incelenerek, amplifikasyon ve delesyonların kromozomal bölgeleri saptandı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 4 no lu olguya ait farklı metafazlardaki 10 no.lu kromozomda gözlenen a) normal, b) delesyon ve c) amplifikasyon oranları.

5 olguda gözlenen amplifikasyonlar, kromozomal idiogramlarda gösterilerek, kromozomal lokusları ve yerleşim yerleri belirlendi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Beş olguda gözlenen amplifikasyonların kromozomal idiogramda gösterilmesi.

Çalışmamıza aldığımız 5 olgunun örnekleri aynı çerçevede değerlendirilerek, elde edilen sonuçlar Tablo 3.3'te verilmektedir.

Tablo 3.3 Ganglionöroblastomalı 5 olgunun, yaş, cinsiyet ve KGH sonuçları.

No.	Cinsiyet/Yaş	KGH Sonuçları (Amplifikasyonlar)
1	K/4	4q34-qter, <u>+7</u> , <u>+13</u> , <u>+22</u>
2	E/4	2q37.1-qter, 2p25.1-pter, <u>5p15.1-pter</u> , <u>+13</u> , <u>18p11.31-pter</u> , <u>+20</u> , <u>+22</u>
3	E/6	1p35, <u>5p15.1-pter</u> , 6p23, 12q12-q13.2, 12q24.2-qter, <u>13q22-q31,17p12-p13</u> , Xq21.1-q21.3
4	K/4	2p, 4p15.1, 4q21.2-q22, 6q26, <u>+7</u> , 8q13, 10q11.2-q21.2, Xq12-q13
5	E/1	1p35-pter, 2p24-pter, 4p, <u>5p15.1-p15.3</u> , <u>+6</u> , <u>+7</u> , <u>+8</u> , 9q34.1-qter, <u>+10</u> , 12q24.32- qter, 14q23-q24, <u>+15</u> , <u>+17</u> , <u>+18</u> , <u>+22</u> , Xp11.4-21.2

Beş olguya ait KGH sonuçları incelendiğinde, bazı amplifiye bölgelerin birçok olguda ortak olduğu bulundu. Olgularda ortak olan bölgeler ve 5 olgudaki sıklığı, Tablo 3.4'te verilmektedir.

Tablo 3.4 Beş olguda gözlenen ortak amplifikasyon bölgeleri ve sıklıkları.

Amplifikasyon bölgesi	5 olgudaki sıklığı
2p25.1-pter	3/5
5p15.1-p15.3	3/5
+7	3/5
13q22-q31	3/5
+22	3/5
1p35	2/5
4p15.1	2/5
10q11.2-q21.2	2/5
12q24.32-qter	2/5
+13	2/5
17p12-p13	2/5
18p11.35-pter	2/5

TARTIŞMA

Kanser araştırmalarında ve rutin çalışmalarında, birçok yöntem kullanılmaktadır (14). Son yıllarda geliştirilen moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemler, hem konvensiyonel yöntemlerin zorluklarını aşmayı kolaylaştırmakta, hem de sonuçların güvenilirlik derecesini artırmaktadır.

Konvensiyonel sitogenetik, kanserde hematolojik malignansilerde ve solid tümör çalışmalarında vazgeçilmez bir yöntem olmuştur. Ancak, özellikle solid tümörlerle yapılan çalışmalarda, elde edilen canlı hücre sayısının az olması ve sadece üreyen hücre hattının taşıdığı kromozomal kuruluşu göstermesinden dolayı sitogenetik, kanser teşhisinde kısıtlı sonuç vermektedir (3, 4). Solid dokulardan elde edilen bu metafazlara, FISH uygulaması da aynı kısıtlı sonucu vermekte, sadece sitogenetik olarak tanımlanamayan marker kromozomlar için spesifik problemler kullanılarak marker kromozom orijinini belirlemede yardımcı olmaktadır (67). Ayrıca, spektral karyotipleme ve M-FISH de FISH ile aynı temelde çalışan yöntemler olup, çok pahalı olmalarından dolayı, ancak özel durumlarda kullanılmaktadırlar (35). Moleküler genetik teknikler ise, genomdaki anormallikleri tek tek gösterdiğinden, kanser araştırmalarında kısıtlı kalmaktadır (3, 4). Buna karşın, moleküler sitogenetik bir yöntem olan KGH, tümör dokusundaki ve hücresindeki toplam genomik DNA'nın normal metafaz ile hibridizasyonu esasına dayandığı için, hem dengesiz anormallikleri hem de sitogenetik olarak tanımlanamayan marker kromozomların orijinlerini belirleyebilmektedir. Bu nedenle, Kallioniemi ve arkadaşlarının FISH prensipleri çerçevesinde geliştirdikleri KGH yöntemi, kanserde geniş bir kullanım alanı bulmuştur (3).

Kanserli olgularda yapılan sitogenetik çalışmaların sonuçları ile KGH analiz sonuçları karşılaştırıldığında, KGH sonuçlarının genellikle sitogenetik bulguların da dahil olduğu birçok kromozomal abnormaliteleri içerdiği bulunmuştur. Örneğin, nöroblastomada yapılan sitogenetik ve FISH çalışmalarında, sıklıkla kromozom 1p delesyonları ve 1p'nin işe karıştığı anormallikleri saptanmıştır (48). Buna karşın, KGH kullanılarak çalışılan 35 nöroblastomalı olguda, esas olarak 1p delesyonu ile birlikte 2p23-24 ve 17q11-23 amplifikasyonu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, kromozom 7, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q ve 15q'da tekrarlayan kromozomal amplifikasyonlar ve delesyonlar belirlenmiştir (58). Yapılan diğer bir KGH çalışmasında, 29 nöroblastoma örneğinde en sık olarak kromozom 17'nin amplifikasyonu ve 1p delesyonu tespit edilmiştir (59). Bu bulgular, toplam genomun incelenmesi açısından KGH'nin, nöroblastomalı olgularda, sitogenetik bulguları da içeren daha detaylı sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Nöronal orijinli bir tümör olan glioblastoma multiformeli 20 olguda yapılan sitogenetik çalışmada, kromozom 10 ve 17p'nin kaybı gözlenmiştir (48). Buna karşın, glioblastoma multiformeli 27 olguda yapılan KGH çalışmasında, kromozom 7'nin polizomisi, 7p, 11q, 12q'nun amplifikasyonları ile 9p, 10 ve 13'ün delesyonları tanımlanmıştır (61). Bu iki çalışma bize, sitogenetik çalışmanın kısıtlı olduğunu, KGH çalışmasının ise bütün dengesiz kromozomal düzensizlikleri tespit ettiğini göstermektedir. Çünkü, solid dokudan kurulan kültürde, tümör içindeki sayısı az olmasına rağmen, sadece üreyen bu hücrelerden kromozomlar elde edilmiş olabilir. Buna karşın, KGH çalışmasında tümörlü dokunun bütün hücrelerinin genomik DNA'sı prob olarak kullanıldığından, meydana gelmiş olan dengesiz kromozomal anormalliklerin tümü tespit edilebilmektedir.

Gliomalı olguların %40'ında sitogenetik bulgu olarak trizomi 7 ve 9p, 9, 10, 22 ve Y kromozomunun kaybı gözlenmiştir (58).

Glioma hücre hatlarında, KGH ile yapılan çalışma sonucunda, kromozom 1, 4, 6, 9, 9p, 10, 11, 13, 14, 18 ve X'te kayıplar ile, kromozom 7'de amplifikasyon olduğu görülmüştür (62). Burada, kromozom 7 artışı ve kromozom 9p, 9, 10'un kayıplarının her iki yöntemle de tespit edilmişken, KGH çalışmasında daha fazla kromozom kaybının olduğu bulunmuştur.

Ganglionöroblastomalı 5 olguda yaptığımız KGH çalışmasında, 5 olgunun 3'ünde görülen, kromozom 2p25.1-pter, 5p15.1-p15.3, +7, 13q22-q31, +22 bulunmuştur (Tablo 3.4). Ayrıca incelenen 5 olgunun 2'sinde, 1p35, 4p15.1, 10q11.2-q21.2, 12q24.32-qter, +13, 17p12-p13, 18p11.35-pter artışları da gözlenmiştir (Tablo 3.4). Çalışmamızda, 4. ve 5. olgularımızda görülen kromozom 2p ve 2p24-pter amplifikasyonu, nöroblastomalı olgularda en sık görülen amplifikasyon bölgesi olup, N-myc onkogeninin bulunduğu 2p23-p34 bölgesini içine almaktadır (54). Nöroblastomanın birinci varyantı olan ganglionöroblastomada N-myc onkogen aktivasyonunun devam ettiğini göstermektedir.

Kromozom 5p15.1-5p15.3'ün amplifikasyonu, 5 olgumuzun 3'ünde görülmüş olan ortak amplifikasyon bölgesidir (Tablo 3.4). Beyin içi tümörü olan medulloblastomada yapılan KGH çalışmasında, 5p15.3 bölgesinin aşırı amplifiye olduğu bulunmuştur (50, 51). Ayrıca sinir kılıfı hücrelerinin tümörü olan nörinomada +5'in bulunması, bu bölgenin hem beyin içi hem de beyin dışı periferik nöronların tümörizasyonunda işe karıştığını göstermektedir (56). Ganglionöroblastoma da bir periferik nöronal tümör olduğuna göre, bu bölge, bizim olgularımızda da, tümör gelişiminde ve ilerlemesinde işe karışmış olabilir. Çalışmamızda, 5 olgunun 3'ünde görülen kromozom 7 artışı, sitogenetik olarak oligodendroglioma,

ependidoma, nörinoma'da, KGH ile de nöroblastoma, medulloblastoma, glioblastoma multiforme, gliomada olmak üzere hemen hemen bütün nöronal orijinli tümörlerde tespit edilmiştir (48). Olgu sayımızın az olmasına rağmen 3 olguda bulunan kromozom 7 artışının, kromozom 7'nin üzerinde bulunan onkogenlerden (BERB1, EGFR, ARAF2, MYCLK1, RALA, PKS2, TTIM1, MET, EPHT, BRAF1P1, BRAF1 ve TCL) birinin veya birkaçının aktivasyonu sonucu tümör gelişimi ve ilerlemesi sağlanmış olabilir (68). Nöroblastomadan ganglionöroblastomaya geçişte de kromozom 7 artışının bulunması bu abnormalitenin, nöroblastomanın klonal gelişiminde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, nöronal olmayan rabdomiyosarkoma ve miksoid liposarkomada 7p'nin artışının görülmüş olması, burada yerleşen BERB1, EGFR gibi onkogenlerin etkili olduğunun göstergesidir (68). Yine çalışmamızda, 5 olgunun 3'ünde görülmüş olan kromozom 13q22-q31 bölgesinin amplifikasyonu (Tablo 3.4), nöroblastomada yapılan KGH çalışmasında 13q amplifikasyonu olarak belirlenmişken, glioma hücre hattında yapılan KGH çalışmasında ise 13'ün kaybı bulunmuştur (62). Diğer nöronal orijinli tümörlerin kromozom 13 ile ilgili bir abnormalite göstermemelerinden dolayı, kromozom 13'ün q kolundaki artışın periferik nöron tümörlerinde etkili olduğunu, 13'ün kaybının ise beyin içi tümörü olan gliomanın gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bizim olgularımızda görülen 13q22-q31 bölgesinin, nöroblastomada bulunan 13 q bölgesine göre, daha dar bir bölge olması, bu bölgedeki olası onkogenlerin yerleşimlerinin tespiti ve araştırılması bakımından daha çok önem kazanmaktadır.

Çalıştığımız 5 ganglionöroblastomalı olgunun 3'ünde kromozom 22 artışı saptanmıştır (Tablo 3.4). Ancak, nöronal orijinli tümörlerden çoğunlukla malign seyreden glioma, malign ve benign formları bulunan ependidoma ve medulloblastoma ve genelde iyi huylu olan

meningiomada yapılan sitogenetik çalışmalarda kromozom 22 kaybı bulunmuştur (48). Nöronal orijinli tümörlerde yapılan KGH çalışmalarında ise, kromozom 22 kaybı bildirilmemiştir (57-63). Bu bize, sitogenetik analizlerde elde edilen kromozom 22 kaybının, bu anormalliği taşıyan hücrelerin, kültürde çoğalarak oranının yükseldiğini ve klonal kromozom anormalliği olarak tespit edildiğini göstermektedir. KGH çalışmaları ile nöronal orijinli tümörlerde gösterilmeyişi ise, sitogenetik bulgu veren hücrelerin toplam doku içinde az bulunduğunu ve buna bağlı olarak da kullanılan prob tümör DNA içinde bu hücreye ait DNA oranının düşük olduğunu işaret etmektedir. Bizim olgularımızın 3/5'inde (%60) bulunan kromozom 22 artışının, periferik nöron tümörü olan ganglionöroblastomada etkili olduğu, bu tümörün gelişimi ve seyrini ise, üzerinde taşıdığı YESP, SIS, PDGB, NRASL2 onkogenlerinin ürünleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (68). Nöronal orijinli tümörlerde şimdiye kadar kromozom 22 artışının gösterilmemiş olması, bu kromozom artışının ara geçiş evresi olan ganglionöroblastomada, önemli olabileceğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca, olgularımızda tespit edilen 2/5 sıklıktaki amplifikasyon bölgeleri ve her olguya ait tek tek gözlenen kromozomal amplifikasyonların, her olgudaki tümör gelişiminde ve tümörün klonal seyrinde önemli olduğu düşüncesindeyiz. Her bir olgudaki KGH sonuçlarının farklı olması, tümörün ameliyatla çıkarıldığı andaki seyri, alınıp incelenen parçadaki ganglion hücrelerinin proliferasyon evrelerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Bu aynı zamanda tümörlerin kendi aralarında ve kendi içlerinde sınıflandırılmasını da sağlayabilmektedir.

Keser ve arkadaşlarının 5 ganglionöroblastomalı olguda yaptıkları KGH çalışmasında en sık 8p, 9q, 10p, 12p, 17p, 18q artışları ve 1p delesyonu bulunmuştur (64). Bizim çalışmamızla

karşılaştırdığımızda, 8p, 9q, 10p, 12p, 17p, 18q artışları, 5 no.lu olgumuzdaki +8, 9q34.1-qter, +10, +17, +18 ile, 3 no.lu olgumuzdaki 17p12-p13 bölgelerinin ortak amplifikasyon bölgeleri olarak görülmektedir. Keser ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 1 olguda 7p'nin bulunması, bu çalışmamızda bulduğumuz kromozom 7 artışı ile paralellik göstermektedir. Buna karşın, çalışmamızda 1p delesyonu tespit edilememiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Çalışılan 5 olgumuz ile Keser ve arkadaşlarının 5 olguda yaptıkları KGH analiz sonuçlarının karşılaştırılması.

Kromozomlar	Çalışmamız		Keser ve ark.	
	Artış (%)	Azalış(%)	Artış (%)	Azalış(%)
1p	+ (40)	-	-	+ (40)
2p	+ (60)	-	-	-
4p15.1	+ (40)	-	-	-
5p15.1-p15.3	+ (60)	-	-	-
7	+ (60)	-	+ (20)	-
8p	-	-	+ (80)	-
9p	-	-	+ (60)	-
10p	-	-	+ (60)	-
10q11.2-q21.2	+ (40)	-	-	-
12p	-	-	+ (80)	-
12q24.32-qter	+ (40)	-	-	-
13	+ (40)	-	-	-
13q22-q31	+ (60)	-	-	-
17p	+ (40)	-	+ (60)	-
18p11.35-pter	+ (40)	-	-	-
18q	-	-	+ (100)	-
22	+ (60)	-	-	-

Ganglionöroblastomada yapılan bu iki KGH çalışmasında, olgu sayısının az olması istatistiksel açıdan kıyaslamayı engellemektedir. Olgu sayısı arttıkça ganglionöroblastomanın gelişmesi ve ilerlemesinde etkili olan kromozomal bölge ve bulundurdukları onkogen veya tümör supresör genlerin tespiti kaçınılmaz olacaktır.

Sonuç olarak, 5 olgumuzda bulunan kromozomal amplifikasyon bölgelerinde en sık görülenlerden 2p25.1-pter, 5p15.1-p15.3, +7'nin diğer nöronal orijinli tümörlerde de sık olarak bulunduğu, ancak 3 olgumuzda görülen ortak ve dar bir bölge olan 13q22-q31 bölgesinin ganglionöroblastoma için önemli olduğu düşüncesindeyiz.

Ayrıca, 5 olgunun 3'ünde görülen ve nöronal orijinli tümörlerde bulunmayan kromozom 22'ninin tam amplifikasyonunun, kromozom 22 üzerinde bulunan onkogenlerle ganglionöroblastomanın farklılaşmasında önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Kanser çalışmalarında geniş bir alan bulan KGH'un, dengesiz kromozomal anormallikleri tek bir hibridizasyonla göstermesi, bu tekniğin moleküler sitogenetik yöntemler arasında ne kadar güçlü bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Wilson GN., Clinical Genetics. 2000, Wiley Liss.
2. Houldsworth J., et al. Comparative Genomic Hybridization: An Overview. Am J of Pathol. 1994, 145:1253-1260.
3. Kallioniemi A., et al. Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. Science. 1992, 258, 818-821.
4. Kallioniemi OP., et al. Comparative Genomic Hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. Cancer Biology. 1993, Vol 4, 41-46.
5. Karp G. Cell and Molecular Biology; Concepts and Experiments. 1996, John Wiley and Sons.
6. Cooper GM. The Cell. 1997, ASM Press.
7. Thompson MW., et al. Genetics in Medicine. 1991, W.B. Saunders Company.
8. Sherbet GV., et al. The Genetics of Cancer. 1997, Academic Press.
9. Heim S., et al. Cancer Cytogenetics; Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. 1995, Wiley-Liss Inc.
10. Strachan T., et al. Human Molecular Genetics. 1996, BIOS Scientific Pub. Ltd.

11. Lodish H., et al. Molecular Cell Biology, Fourth Edition. 2000, W.H. Freeman and Company.
12. Barbacid M. *ras* genes. Ann. Rev. Biochem. 1987, 56:779-827.
13. Karazüm SB., Akciğer karsinomlarında kurulan doku kültürlerinde sitogenetik çalışmalar. 1995, Doktora Tezi.
14. Trent RJ., Molecular Medicine. 1997, Pearson Professional Limited.
15. Passarge E., et al. Color Atlas of Genetics. Çeviri, Lüleci G., ve ark.
16. Gelehrter T., et al. Principles of Medical Genetics, Second Edition. 1998, Williams & Wilkins.
17. De Vita VT., et al. Cancer; Principles and Practice of Oncology, Vol 2. 1997, Lippincott-Raven Publishers.
18. Spence AP., et al. Human Anatomy and Physiology. 1987, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
19. Wheater PR. Functional Histology. 1987, Longman Group UK Limited.
20. Reardon DA., et al. Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. Cancer Research. 1997, 57: 4042-4047.

21. Martinsson T., et al. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphism. *Cancer Research*. 1995, 55: 5681-5686.
22. Sternberg SS. *Diagnostic Surgical Pathology*. Vol 1, Third Edition. 1999, 608-613.
23. Silverberg et al. *Surgical Pathology 2, Vol II*.
24. Pizzo PA., et al. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 1989, J.B. Lippincott.
25. Piper J., et al. Computer Image Analysis of Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry*. 1995, 19:10-26.
26. Manoir S., et al. Quantitative Analysis of Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry*. 1995, 19:27-41.
27. Liang BC., et al. Gene amplification elucidated by combined chromosomal micro-dissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995, 80:55-59.
28. Bryndorf T., et al. Comparative Genomic Hybridization in Clinical Cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet*. 1995, 57:1211-1220.
29. Testa JR., et al. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet*. 1997, 95:20-32.

30. Morgan K., et al. A rapid and efficient method for DNA extraction from paraffin wax embedded tissue for PCR amplification. *J Clin Path.* 1996, 49:M179- M180.
31. James L., et al. Preparation, labeling and detection of DNA from archival tissue sections suitable for CGH. *Chromosome Res.* 1996, 4:163-164.
32. Mohamed AN., et al. Extra-chromosomal gene amplification in acute myeloid leukemia; characterization by metaphase analysis, comparative genomic hybridization, and semi-quantitative PCR. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 1993, 8:185-189.
33. Lui YS., et al. Single-step direct PCR amplification from solid tissues. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23:1640.
34. Telenius H., et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by single degenerate primer. *Genomics.* 1992, 13:718-725.
35. Fox JL., et al. Fluorescence in situ hybridization: A powerful molecular tool for cancer prognosis. *Clin. Chem.* 1995, 41/11, 1554-1559.
36. Suijkerbuijk RF., et al. Comparative genomic hybridization as a tool to define two distinct chromosome 12-derived amplification units in well-differentiated liposarcomas. *Genes, Chromosomes Cancer.* 1994, 9:292-295.
37. Lüleci G., ve ark. *Sitogenetik Uygulama Yöntemleri.* Meteksan Limited Şirketi, I. Baskı. 1990, Ankara.

38. Kallioniemi OP., et al. Optimizing Comparative Genomic Hybridization for Analysis of DNA Sequence Copy Number Changes in Solid Tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994, 10:231-243.
39. Keser I.: Comparative Genomic Hybridization (CGH) in cancer research. *Tr. J. Of Medical Sciences*. 1999, 29:85-88.
40. Levy B., et al. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genetics Medicine*. 1998, Vol 1, 4-12.
41. Erdel M., et al. Comparative genomic hybridization reveals a partial de novo trisomy 6q23-qter in an infant with congenital malformations: delineation of the phenotype. *Hum Genet*. 1997, 99:596-601.
42. Aubele M., et al. Distinct cytogenetic alterations in squamous intraepithelial lesions of the cervix revealed by laser-assisted microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Cytopathology*. 1998, 375-379.
43. Godbout R., et al. Comparative genomic hybridization analysis of Y79 and FISH mapping indicate the amplified human mitochondrial ATP synthase α -subunit gene (ATP5A) maps to chromosome 18q12-q21. *Cytogenet Cell Genet*. 1997, 77:253-256.
44. Lo R., et al. Cytogenetic abnormalities in two cases of neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994, 74:30-34.
45. Bayani J., et al. Application of a simplified comparative genomic hybridization technique to screen for gene amplification in pediatric solid tumors. *Pediatric Pathology and Laboratory Medicine*. 1995, 15:831-844.

46. Caron H., et al. Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumor suppressor gene locus. *Hum Genet.* 1996, 97:834-837.
47. Knuutila S., et al.: DNA copy number amplifications in human neoplasms. *American Journal of Pathology.* 1998, 152, 5, 1107-1123.
48. Heim S., et al. *Cancer Cytogenetics; Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells.* 1995, Wiley-Liss, Inc.
49. Mohapatra G, et al. Detection of multiple gains and losses of genetic material in ten glioma cell lines by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer.* 1995, 13: 86-93.
50. Reardon DA., et al. Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by CGH. *Can Res.* 1997, 57:4042-4047.
51. Biegel JA., et al. Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromos Cancer* 1: 139-147.
52. Srivatsan ES., et al. Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1993, 7: 32-37.
53. Hayashi Y., et al. Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer.* 1989, 63: 126-132.

54. Seeger RC., et al. Association of multiple copies of the NMYC oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 1985, 313: 1111-1116.
55. Gilbert F., et al. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res.* 1984, 44: 5444-5449.
56. Couturier JD., et al. Assessment of chromosome 22 anomalies in neurinoma by combined karyotype and RFPL analysis. *Can Genet Cyto Genet.* 1990, 45:55-62.
57. Loiseau HA., et al. Comparative genomic hybridization detects many recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumours in children. *British Journal of Cancer.* 1999, 79(11/12), 1843-1847.
58. Brinkschmidt C., et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas -an important methodological approach in paediatric tumour pathology. *Journal of Pathology.* 1997, 181: 394-400.
59. Plantaz D., et al. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 1997, 150: 81-89.
60. Schlegel J., Detection of complex genetic alterations in human glioblastoma multiforme using comparative genomic hybridization. *J Neuropathol, Exp Neurol.* 1996, 55:81-87.
61. Weber RG., Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab Invest.* 1996, 74: 108-119.

62. Feuerstein BG., et al. Molecular cytogenetic quantitation of gains and losses of genetic material from human gliomas. *J Neuro-Oncol.* 1995, 24:47-55.
63. Keser I., et al. Genomic imbalances in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *European Journal of Human Genetics, Suppl.* 1999.
64. Keser I., et al. Gains and losses of DNA sequences in ganglioneuroblastoma by comparative genomic hybridization using double step DOP-PCR. *Eur J. Hum Gen.* 1998, 6 (Suppl 1), 99.
65. Speicher MR., et al. Molecular cytogenetic analysis of formalin fixed, paraffin embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet.* 1993, 2: 1907-1914.
66. Miller SA., et al. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research.* 1988, 16, 1215.
67. Pinkel D., et al. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986, 83: 293-8.
68. Verma R., et al. *Human Chromosomes.* 1995, Mc Graw-Hill, New York. 360-406.

ÖZGEÇMİŞ

Ahter Dilşad TORAMAN, 23.02.1971 tarihinde Ankara'da doğmuştur. 1981-1988 tarihleri arasında orta ve lise öğrenimini Ankara Yükseliş Koleji ve İstanbul Özel Dost Lisesinde tamamlamıştır. 1989-1991 yılları arasında Fayetteville Technical Institute, NC, USA'da tıbbi biyoloji ağırlıklı dersler almıştır. 1993-1997 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde öğrenim görmüştür. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atanmıştır. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Temel Genetik programında lisansüstü eğitimine başlamış ve 2001 yılında mezun olmuştur.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü