

## RHOB Ekspresyonunun Nöroblastomda Moleküler Risk Sınıfları ve Prognoz ile İlişkisinin Değerlendirilmesi\*

Burçin BARAN<sup>1</sup>, Gamze SANLAV<sup>1</sup>, Selen KUM ÖZŞENGEZER<sup>1</sup>,  
Deniz KIZMAZOĞLU<sup>2</sup>, Safiye AKTAŞ<sup>1</sup>, Zekiye ALTUN<sup>1</sup>, Nur OLGUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.

<sup>2</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Pediatrik Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.

### ÖZET

Nöroblastom, gelişmekte olan sinir sisteminden köken alan ve çocukluk çağının en sık görülen solid tümördür. Klinik seyri lokalize veya spontane gerileme gösterebilen hastalıktan, yoğun ve multimodal tedavi rejimlerine dirençli metastatik hastalığa değişen heterojen bir davranış göstermektedir. Ras Homolog Ailesi Üyesi B (RhoB), Rho GTPaz ailesinin bir üyesidir ve sitoskeletet organizasyonunda, reseptör ve sinyal proteinlerinin iletiminde, DNA hasar tamirinde ve apoptozda rol oynar. RhoB ekspresyonu farklı erişkin kanser türlerinde incelenmiş ve farklı kanser türlerinde iyi veya kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Ne var ki, RhoB ekspresyonu aday bir prognostik biyobelirteç olarak pediatrik kanserlerde daha önce çalışılmamıştır. Yapılan çalışmamızda, RhoB protein ekspresyonu nöroblastom hastalarında immün histokimyasal boyama yöntemiyle incelenmiştir. RhoB ekspresyonu ile düşük, orta ve yüksek risk gruplarındaki nöroblastom hastalarının genel sağ kalımı ve olaysız sağ kalımları karşılaştırılmış ve RhoB ekspresyonu ile hastaların klinikopatolojik özellikleri Spearman's korelasyon analizi ile incelenmiştir. Her ne kadar çalışmamızdaki hasta örneklem sayısı az olsa da çalışmamızda RhoB ekspresyonunun NB hastaları için iyi prognostik bir biyobelirteç olabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Nöroblastom. Çocukluk Çağı Kanseri. Biyobelirteç. Sağ kalm. Prognostik faktörler.

### Evaluation of the Association of RHOB Expression with Molecular Risk Classes and Prognosis in Neuroblastoma

### ABSTRACT

Neuroblastoma is the most common solid tumor of childhood originating from the developing nervous system. It shows a heterogeneous behavior with a clinical course ranging from localized or spontaneously regressive disease to metastatic disease resistant to intensive and multimodal treatment regimens. Ras Homolog Family Member B (RhoB) is a member of the Rho GTPase family and plays a role in cytoskeleton organization, receptor and signaling protein transmission, DNA damage repair and apoptosis. RhoB expression has been studied in different adult cancer types and has been found to be associated with good or poor prognosis in different cancer types. However, RhoB expression has not been studied as a candidate prognostic biomarker in pediatric cancers before. In our study, RhoB protein expression was examined in neuroblastoma patients by immunohistochemical methods. Overall survival and event-free survival of neuroblastoma patients in low, intermediate and high-risk groups were compared with RhoB expression and clinicopathological features of patients were examined with Spearman's correlation analysis. Although the number of patients in our study was small, our study revealed that RhoB expression may be a good prognostic biomarker for NB patients.

**Keywords:** Neuroblastoma. Childhood cancers. Biomarker. Survival. Prognostic factors.

**Geliş Tarihi:** 14.Mayıs.2024

**Kabul Tarihi:** 22.Kasım.2024

Dr. Burçin BARAN  
Dokuz Eylül Üniversitesi,  
Onkoloji Enstitüsü,  
Temel Onkoloji Anabilim Dalı,  
İzmir, Türkiye  
Tel: 0232 412 82 01  
E-posta: burcin.baran@deu.edu.tr

\* VIII. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu'nda (29 Kasım-1 Aralık 2023, İzmir) Sözel Bildiri olarak sunulmuştur.

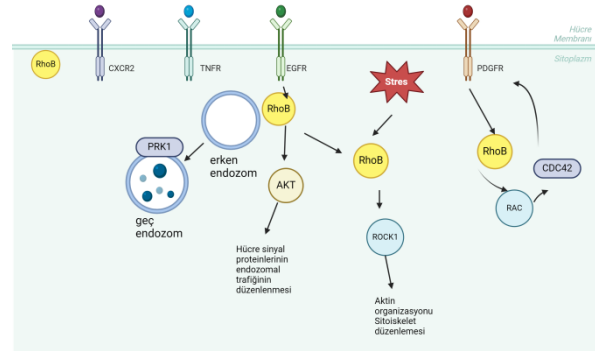
### Yazarların ORCID Bilgileri:

Burçin BARAN: 0000-0002-0917-5443  
Gamze SANLAV: 0000-0003-4256-8326  
Selen KUM ÖZŞENGEZER: 0000-0002-7068-5979  
Deniz KIZMAZOĞLU: 0000-0003-3349-7140  
Safiye AKTAŞ: 0000-0002-7658-5565  
Zekiye ALTUN: 0000-0002-1558-4534  
Nur OLGUN: 0000-0001-9591-0207

Nöroblastom (NB), tüm çocukluk çağı kanserleri arasında %10'luk dilimde olsa da çocukluk çağı kanserlerine bağlı ölümlerin %10-15'inden sorumludur<sup>1</sup>. Sıklıkla 5 yaş altında (>%90) görülen bu hastalık, klinikte oldukça heterojen bir davranış sergilemektedir<sup>2</sup>. Hastalığın prognozunu öngörebilmek için risk sınıflandırılması kullanılmaktadır ve buna göre hastalara tedavi uygulanmaktadır<sup>2</sup>. Risk sınıflandırılması kriterleri arasında yaş, evre, Shimada histolojisi, MYCN amplifikasyonu, DNA ploidi ve diğer kromozomal değişimler (1p36 kaybı, 11q23 kolu kaybı vb.) yer almaktadır<sup>3</sup>. Bu kriterlere göre hastalar düşük, orta ve yüksek risk gruplarına ayrılmaktadırlar<sup>4</sup>. 5 yıllık sağkalım oranları düşük ve orta risk grubundaki hastalar için %85-90 civarında iken bu oran, yüksek risk grubundaki hastalar için uygulanan cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi kombine tedavi rejimlerine rağmen %50 civarındadır<sup>5-7</sup>.

Rho GTPaz ailesi, içerdiği Rho bölgesi ile karakterize Ras süper ailesinin bir üyesidir<sup>8</sup>. Rho GTPaz ailesi 20 üyeden oluşmakta ve tüm bu üyeler 8 alt grup altında toplanmaktadır<sup>8</sup>. Rho GTPaz aktivitesi Ras proteinlerinde olduğu gibi GTP bağlanınca aktif, GDP bağlanınca inaktif olmaktadır<sup>9</sup>. Rho GTPaz ailesi sikoiskelet yapısında, aktin ve mikrotübüllerin organizasyonunda, hücre polaritesinde, hücre göçünde, vezikül taşınımında ve gen ekspresyonunun regülasyonunda rol oynamaktadır<sup>9</sup>. Rho GTPaz ailesinin üyeleri RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 ve Cdc42 yüksek oranda benzerlik göstermekte ve karsinogenez sürecinde onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmektedirler<sup>10</sup>. Kanser Genom Atlas (The Cancer Genome Atlas) çalışmasına göre Rho GTPazlar yüksek oranda amplifikasyon, delesyon ve nokta mutasyonu gibi genomik değişimler içermektedirler<sup>11</sup>. RhoA, RhoB ve RhoC benzerlik gösterse de tümörigenez sürecinde oynadıkları roller farklı olabilmektedir<sup>12</sup>. Bir çok tümör tipinde RhoA ve RhoC onkogen olarak davranıp, bu genlerin ekspresyonlarında artış gözlenirken; RhoB'nin ise tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğü ve bir çok tümör tipinde ekspresyonunda azalış gözlemlendiği bildirilmiştir<sup>12,13</sup>. RhoA ve RhoC genelde hücre membranında bulunurken, RhoB ise endozom, multiveziküler cisimcikler ve nükleus kısımlarında yer almaktadır<sup>13</sup>. RhoB, membran taşınımı, hücre proliferasyonu, hücre göçü, aktin organizasyonu, DNA tamiri ve hücre ölümü gibi farklı süreçlerde rol oynamaktadır<sup>14</sup>. RhoB'nin ekspresyonu, UV radyasyonu, enflamatuvar sitokinler gibi hücrel stres faktörleri, hipoksi ve EGF gibi büyüme faktörlerinden tetiklenmektedir<sup>15</sup>. RhoB, homoloji gösterdiği RhoA ve RhoC'den farklı olarak hücre sinyal yolları ile etkileşebilmekte ve epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), Trombosit Faktörü Büyüme Reseptörü (PDGFR), SRC ve AKT farklı sinyal

proteinlerinin hücre içi trafiğini kontrol etmektedir<sup>15,16,17</sup>. RhoB, EGFR'nin endositoz trafiğini önleyerek<sup>18</sup>, EGFR'nin fosforile edilmiş formunun plazma membranında kalmasını ve EGFR'ye bağlı AKT sinyallemesini sürdürmesini sağlar<sup>19,20</sup>. RhoB, RAS ve MYC gibi yollarla etkileşerek hücre yapısını ve davranışını etkiler<sup>21</sup>. Aynı zamanda DNA çift zincir kırık tamirinde rol oynar<sup>22</sup>. Tüm bunlar RhoB'nin tümörleşme sürecinde önemli rol üstlenebileceğini göstermektedir (Şekil 1).



**Şekil 1:**

*RhoB'un Hücre İçi Fonksiyonu ve Etkileştiği Sinyal Yolları*

RhoB ekspresyonunun tümör prognozu üzerindeki etkisi farklı çalışmalarla incelenmiştir. Meme kanserinde RhoB ve E-kadherin ekspresyonunun azalmasının radyoterapi direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>23</sup>. Mide hücrelerinde RhoB ekspresyonu hücre çoğalmasımı, göçünü ve invazyonunu anlamlı şekilde engellediği gösterilmiştir<sup>24</sup>. Over kanseri hücrelerinde yüksek evrelerde RhoB ekspresyonunun azaldığı ve hatta kaybı gösterilmiştir<sup>25</sup>. RhoB ekspresyonunun küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında azalış gösterdiği ve düşük RhoB ekspresyonunun bu hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır<sup>26</sup>. Meme kanseri hastalarında yüksek RhoB ekspresyonunun iyi prognoz, yüksek olaysız sağ-kalım oranları ve azalan metastaz oranlarıyla ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>27</sup>. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında RhoB kaybı Rac1 bağımlı mezenkimal hücre invazyonunu arttırmıştır<sup>28</sup>. Yine aynı grup tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise ileri evre akciğer kanseri hastalarında RhoB ekspresyon kaybı gösterilmiştir<sup>29</sup>.

Bununla beraber bazı yayınlarda RhoB ekspresyonunun kemoterapi yanıtını azalttığı da belirtilmiştir<sup>30</sup>. Kolorektal kanseri hastalarında RhoB ekspresyonu kemoterapi yanıtı ve sağ kalımla negatif korele olduğu gösterilmiştir<sup>31</sup>. EGFR mutant küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında yüksek RhoB ekspresyonunun EGFR tirozin kinaz inhibitörü yanıtını negatif olarak etkilediği ve hastalarda tedavi yanıtını azaltıcı yönde etki ettiği gösterilmiştir<sup>32</sup>.

## Nöroblastomda RhoB Ekspresyonu

RhoB'nin tümör oluşum sürecinde genel olarak tümör baskılayıcı işlev gördüğü belirtilse de tümör oluşum (inisyasyon, invazyon, metastaz) sürecine bağlı olarak etkinliğinin değişkenlik gösterebileceği ve onkogen işlevine de bürünebileceğini az da olsa ileri süren yayınlar da mevcuttur<sup>33,34</sup>.

RhoB ekspresyonu farklı yetişkin kanser türlerinde çalışılmış olsa da pediatrik tümörler çeşitlerinden biri olan nöroblastomda daha önce incelenmemiştir. Yapılan çalışmada, RhoB protein ekspresyonunun hem NB hastalarının klinikopatolojik özellikleri ile ilişkisi, hem de farklı risk gruplarındaki NB hastalarının prognozu üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, RhoB protein ekspresyonu NB hastalarının parafin doku örneklerinde immünohistokimyasal boyamalar ile incelenip, RhoB protein ekspresyon düzeyleri ile hastaların sağ kalımları ve diğer klinikopatolojik özellikleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak incelenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

### Hasta Popülasyonu

Çalışmaya 2018-2022 yılları arasında NB tanısı konulan 56 olgunun parafin örnekleri dahil edilmiştir. Çalışmadaki hastalar TPOG Nöroblastom NB-2020 protokolüne göre risk gruplarına sınıflandırılmışlardır<sup>35</sup>. Çalışma için alınan etik kurul onayı etik kurul beyanında belirtilmiştir.

### Doku Örneklerinin İmmün histokimyasal Boyamaları

Parafin bloklardan 5µm boyutunda kesitler lamaların üzerine alınmıştır. Dokudan parafini uzaklaştırmak için; kesitler bir gece boyunca 60°C'de bekletildi. Rehidrasyon için kesitler öncelikle 30 dakika ksilen (Merck, Almanya) içerisinde bekletildi ve yüksekten düşüğe doğru (%100-> %60) etanol serilerinden geçirildi. Antijen geri kazanımı için kesitler 20mM sitrat tamponuna (pH 6.0) yerleştirildi, mikrodalgada 2-3 dakika ısıtıldı ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kesitler, endojen peroksit aktivitesini engellemek için hidrojen peroksit ile işleme tutuldu. Kesitler distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında CM inhibitörü (Roche, Almanya) ile muamele edildi. Kesitler gece boyunca RhoB (1:1000, Affinity Bioscience, ABD) primer antikoruna boyandı. Ertesi gün kesitler iki defa 1X fosfat salin tamponu (PBS) (pH 7.4) (GIBCO, ABD) ile yıkandı. Kesitler bir saat boyunca sekonder antikor (Roche) ile boyandı. Kesitler tekrardan PBS ile 2 defa yıkandı. Daha sonra kesitler 3',3-Diaminobenzidin (DAB) (Roche) reaktifi ile mikroskop altında renk değişimi gözlenene kadar işleme tabi tutuldu ve distile su ile durulandı. Devamında kesitler 1 dakika hematoksilen (Merck) içerisinde yerleştirildi, musluk suyu ile durulandı ve

distile su içerisinde yerleştirildi. Kesitler kademeli olarak düşükten yükseğe doğru (%60-> %100) etanol serisinden geçirildi. En son aşamada ksilen (Merck) içerisinde alınıp 2 saat boyunca bekletildi. Kesitler, entellan (Merck) ile kapatıldı. Boyamalar patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmiştir. Buna göre pozitif boyama gösteren NB hücreleri sayılarak toplam NB hücre sayısına oranlanmıştır ve buna göre kesitlerdeki boyama yüzdeleri belirlenmiştir. Kesitlerdeki NB pozitif hücre sayısı %10'dan az ise boyama negatif olarak kabul edilmiş, eğer (>=) %10'dan fazla ise pozitif olarak kabul edilmiştir.

### İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS programı v22.0 (SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. P değerleri 0,05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Genel sağkalım ve olaysız sağ kalım oranları Kaplan-Meier analizi ve log-rank testi kullanılarak hesaplanmıştır. RhoB protein ekspresyonu ve hastanın klinik ve patolojik özellikleri arasındaki ilişki Spearman's Korelasyon analizi yapılarak incelenmiştir.

## Bulgular

### NB Hastalarının Klinikopatolojik Özellikleri

Bu çalışmada NB tanısı alan 56 hastadan oluşan bir örneklem kullanıldı. Hastaların yaşı 1-191 ay arasında değişmektedir. Hastalar risk gruplarına ayrıldığında; hastaların 18 hasta (%32,4) düşük risk grubunda, 12 hasta (%21,4) orta risk grubunda, 26 hasta (%46,4) ise yüksek risk grubunda yer almaktadır. Hastaların 30'u kadın (%53), 26'sı erkektir (%46,4). On iki hasta (%21,4) Evre I, 5 hasta (%8,9) Evre II, 8 hasta (%14,3) Evre III ve 31 hasta (%55,4) Evre IV olarak sınıflandırılmıştır. Hastaların %21,4'ünde kötü prognostik belirteç olan MYCN geni amplifikasyonu saptanmıştır. Yüksek risk grubundaki hastaların 12'sinde (%46,2) MYCN amplifikasyonu gözlenmiştir. MYCN amplifikasyonu gösteren hastalar, tüm hasta grubunun %21,4'ünü oluşturmaktadır. Yirmi beş hasta 1p36 kaybı (%44,6), 18 hasta 11q delesyonu (%32,1), 25 hasta 17q21 kolu kazanımı (%44,6) göstermektedir. Hastaların 25'sinde (%44,6) metastaz mevcut iken 22 hastada ise metastaz yoktur (%39,3) ve 9 hastanın metastaz durumu bilinmemektedir (Tablo I)

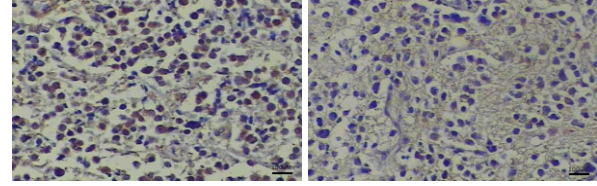
### Hastalarda RhoB Protein Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi ve Prognozla Karşılaştırılması

NB doku kesitleri RhoB primer antikoruna boyanmıştır. RhoB ekspresyonu hastaların %51,8'sinde negatif ve %42,9'ünde pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 2). Üç hastada ise RhoB boyaması çalışmamıştır. Risk grupları arasında hastalığın prognozu ve hastaların sağ kalım oranları oldukça

farklı olduğundan, RhoB ekspresyonu ve hastaların sağkalımları arasındaki ilişki her risk grubu içerisinde ayrı olarak değerlendirilmiştir. RhoB ekspresyonu ile hastaların sağkalımları arasındaki ilişki Kaplan Meier analizleri ile incelenmiştir. Tüm risk gruplarında RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların sağkalım süreleri ve ortalama sağkalımları, RhoB ekspresyonu negatif olan hastalardan daha yüksek bulunmuştur. Ancak RhoB ekspresyonu açısından farklı iki grubun sağkalımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

**Tablo I.** NB Hastalarının Klinikopatolojik Karakteristikleri (n=56)

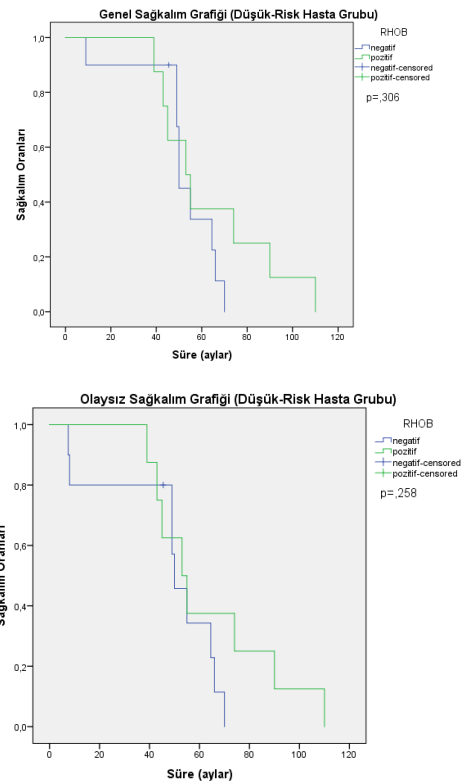
Değişkenler	Tüm Hasta	Düşük-Risk	Orta-Risk	Yüksek Risk
<b>Vaka Sayısı (Oranları)</b>				
	56 (%100)	18 (%32,4)	12 (%21,4)	26 (%46,4)
<b>Hastaların Yaşı (min-mak)</b>				
	(1-191 ay)	(1- 132 ay)	(2-120 ay)	(1,5-191 ay)
<b>Cinsiyet</b>				
Kız	30 (%53,6)	9 (%50)	7 (%58,3)	14 (%53,8)
Erkek	26 (%46,4)	9 (%50)	5 (%41,7)	12 (%45,2)
<b>Evre</b>				
I	12 (%21,4)	11 (%61,1)	0 (%0)	1 (%3,8)
II	5 (%8,9)	4 (%22,2)	0 (%0)	1 (%3,8)
III	8 (%14,3)	0 (%0)	4 (%33,3)	4 (%15,4)
IV	31 (%55,4)	3 (%15,7)	8 (%66,7)	20 (%76,9)
<b>MYCN Amplifikasyonu</b>				
Pozitif	12 (%21,4)	0 (%0)	0 (%0)	12 (%46,2)
Negatif	44 (%78,6)	18 (%100)	12 (%100)	14 (%53,8)
<b>1p36 Delesyonu</b>				
Pozitif	25 (%44,6)	7 (%38,9)	6 (%50)	12 (%46,2)
Negatif	30 (%53,6)	11 (%61,1)	6 (%50)	13 (%50)
Bilinmeyen	1 (%1,8)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%3,8)
<b>11q Delesyonu</b>				
Pozitif	18 (%32,1)	6 (%33,3)	6 (%50)	6 (%23,1)
Negatif	38 (%57,9)	12 (%66,7)	6 (%50)	20 (%76,9)
<b>17q Kazanımı</b>				
Pozitif	25 (%44,6)	5 (%27,8)	5 (%41,7)	15 (%57,7)
Negatif	30 (%53,6)	13 (%72,2)	6 (%50)	11 (%42,3)
Bilinmeyen	1 (%1,8)	0 (%0)	1 (%8,3)	0 (%0)
<b>Metastaz Varlığı</b>				
Var	25 (%44,6)	4 (%21,0)	7 (%58,3)	15 (%57,7)
Yok	22 (%39,3)	14 (%73,7)	2 (%16,7)	6 (%23,1)
Bilinmeyen	9 (%16,1)	1 (%5,2)	3 (%25,0)	5 (%19,2)
<b>RhoB Boyaması</b>				
Pozitif	24 (%42,9)	8 (%44,4)	4 (%33,3)	12 (%46,2)
Negatif	29 (%51,8)	10 (%55,6)	8 (%66,7)	11 (%42,3)



**Şekil 2.**

NB doku kesitlerinde RhoB'nin immünohistokimyasal boyanması. **1A.** Yüksek RhoB ifadesini (RhoB-pozitif) gösteren NB doku kesitleri. **1B** Düşük RhoB ekspresyonu gösteren doku kesitleri (<%10 pozitiflik) (RhoB-negatif) (100X büyütme, Bar: 100µm)

Düşük risk grubundaki hastalarda; RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 63,625 ay (%95 CI: 46,016-81,234) ve RhoB ekspresyonu negatif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 47,664 ay (%95 CI: 33,541-61,788) olarak bulunmuştur. Düşük risk grubundaki hasta popülasyonunda RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların sağkalım süreleri RhoB ekspresyonu negatif olan hastalara göre daha uzun olmasına rağmen, RhoB ekspresyonu pozitif olan ve negatif olan hastaların genel sağkalımları ( $p=0,306$ ) ve olaysız sağ kalımları arasında ( $p=0,245$ ) anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 3).

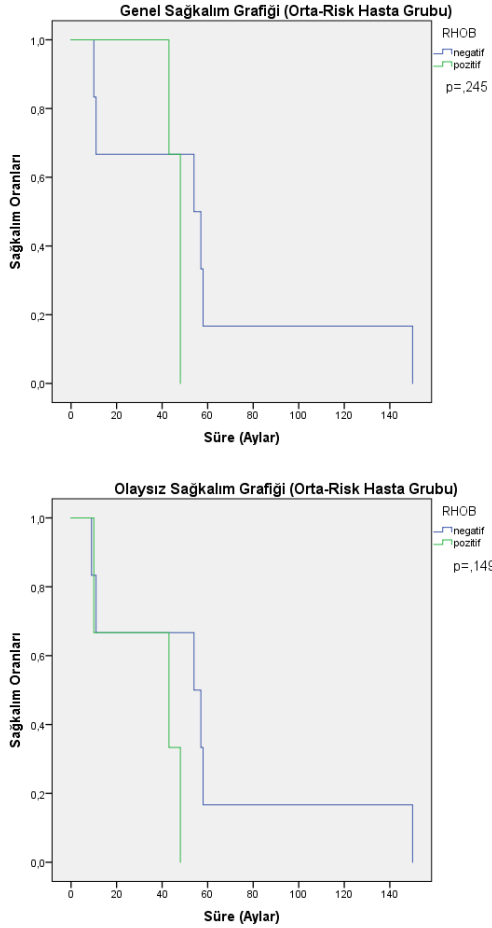


**Şekil 3.**

Düşük risk grubundaki NB Hastalarında a) Genel Sağkalım (OS) ( $p= 0,306$ ) ve b) Olaysız Sağkalım (EFS) ( $p=0,258$ )

## Nöroblastomda RhoB Ekspresyonu

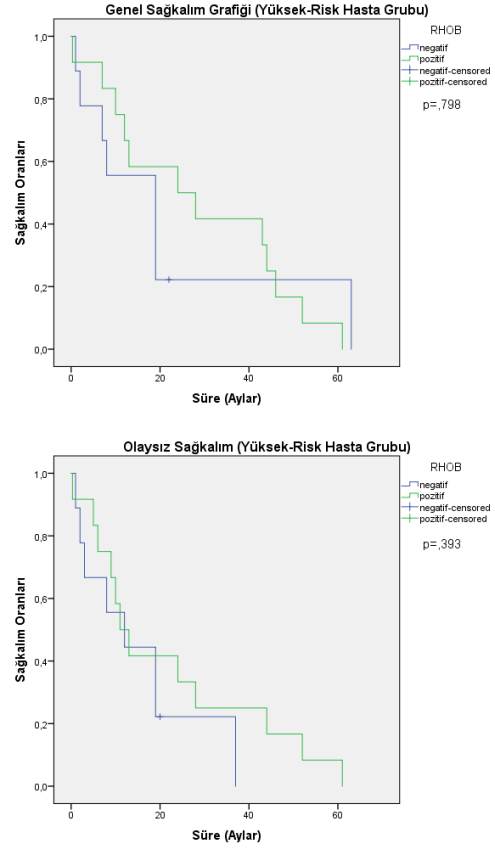
Orta risk grubundaki hastalara bakıldığında, RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 56,667 ay (%95 CI: 15,892-97,441) ve RhoB ekspresyonu negatif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 46,333 ay (%95CI: 15,892-97,441) olarak bulunmuştur. RhoB ekspresyonu açısından bu iki gruptaki hastaların genel sağkalımları ( $p=0,245$ ) ve olaysız sağkalımları ( $p=0,149$ ) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4).



### Şekil 4.

Orta risk grubundaki NB Hastalarında a) Genel Sağkalım (OS) ( $p=0,245$ ) ve b) Olaysız Sağkalım (EFS) ( $p=0,149$ )

Yüksek risk grubundaki hastalarda ise RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 28,358 ay (%95 CI: 16,917-39,799) ve RhoB ekspresyonu negatif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 22,333 ay (%95 CI: 6,458-38,209) olarak bulunmuştur. Bu hastaların genel sağkalımları ( $p=0,798$ ) ve olaysız sağkalımları ( $p=0,393$ ) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 5)



### Şekil 5.

Orta risk grubundaki NB Hastalarında a) Genel Sağkalım (OS) ( $p=0,798$ ) ve b) Olaysız Sağkalım (EFS) ( $p=0,393$ )

### Hastalarda RhoB Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Hastaların yaş, cinsiyet (K/E), nüks (relaps) durumu (pozitif/negatif), sağ kalımı (yaşiyor/ölü), MYCN amplifikasyonu varlığı (pozitif/negatif), 1pLOH varlığı (pozitif/negatif), 17q21 kazanımı (var/yok), risk grupları (düşük, orta, yüksek) ve RhoB ekspresyonu (pozitif/negatif) arasındaki ilişki Spearman's korelasyon analizi ile incelenmiştir (Tablo II). Bu analize göre hastaların sağkalımı nüks oluşumu ( $p<0,01$ ), risk grupları (düşükten yükseğe) ( $p=0,042$ ) ve MYCN amplifikasyonun varlığı ( $p=0,049$ ) ile negatif korele olarak bulunmuştur.

**Tablo II.** Nöroblastom Hastalarının Klinik ve Patolojik Özellikleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

	Yaş	Cinsiyet	Risk	Evre	MYCN/Amp	1pLOH	11q DEL	17q Gain	RHOBekp	Nüks	Sağkalım
Yaş											
Cinsiyet	-0.124		0.279	-0.05	0.017	-0.381	0.117	-0.15	0.22	0.209	0.154
Risk	0.279	-0.026		0.606	0.523	0.073	-0.123	0.262	0.08	0.271	-0.229
Evre	-0.05	0.151	0.606		0.15	0.109	0.029	0.411	-0.03	0.233	-0.0039
MYCN/Amp	0.017	0.05	0.523	0.15		0.137	-0.08	0.137	0.095	0.208	-0.227
1pLOH	-0.381	-0.12	0.073	0.109	0.137		0.064	0.141	0.176	0.322	-0.172
11q DEL	0.117	0.027	-0.123	0.029	-0.08	0.064		0.18	0.068	0.217	0.113
17q Gain	-0.15	0.027	0.262	0.411	0.137	0.141	0.18		0.004	0.042	0.069
RHOBekp	0.22	0.01	0.08	-0.03	0.095	0.176	0.068	0.004		-0.282	0.295
Nüks	0.209	-0.87	0.271	0.233	0.208	0.322	0.217	0.042	-0.282		-0.726
Sağkalım	0.154	-0.215	-0.229	-0.039	-0.227	-0.172	0.113	0.069	0.295	-0.726	

Yüksek risk grubu hastalar ( $p=0,023$ ), yüksek evre hastalar ( $p=0,013$ ) ve 1p LOH kaybı gösteren hastalar ( $p=0,010$ ) ile nüks oluşumu pozitif korele olarak bulunmuştur. Yani hasta grubumuzdaki yüksek risk ve yüksek evredeki hastalar ile 1p LOH kaybı gösteren hastalarda nüks daha çok gözlenmiştir. Yüksek risk grubundaki hastalar, düşük risk grubundaki hastalara göre anlamlı derece yaşlı bulunmuşlardır ( $p=0,039$ ). Yüksek risk grubundaki hastalar, yüksek evre ( $p<0,01$ ) ve MYCN amplifikasyonu ( $p<0,01$ ) yüksek oranda koreledir. Bu durum risk sınıflandırmasında yaş ve MYCN amplifikasyonunun kriterlerden biri olması ile alakalıdır. Yine yüksek evre hastalarda 17q kazanımı ( $p=0,02$ ) daha fazla iken 1p LOH kaybı ise genç hastalarda ortaya çıkma eğilimindeydi ( $p=0,04$ ). Hastalarda RhoB ekspresyonu ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki incelendiğinde, RhoB ekspresyonunun hastalarda nüks oluşumu negatif korele ( $p=0,041$ ) ve sağkalım pozitif korele ( $p=0,032$ ) olarak olduğu bulunmuştur. (Tablo II) RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların sağkalımlarının daha uzun olduğu ve RhoB ekspresyonu ile sağkalımın pozitif ilişkili olduğu saptanmıştır. Yine RhoB ekspresyonu pozitif olan hastalarda daha az nüks oluşumu gözlenmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Rho GTPazlar, hücre göçünü, çoğalmasını, hayatta kalmasını ve ölümünü düzenleyen sinyal yollarındaki önemli sinyal dönüştürücülerdir. Tüm bu hücrenel süreçler normal dokuların korunması için çok önemlidir, ancak aynı zamanda kanserin ilerlemesine de katkıda bulunurlar<sup>36</sup>. RHO proteinlerinin kanserdeki rolü göz önüne alındığında, iyi terapötik hedefler olabilecekleri düşünülmektedir<sup>37</sup>. İnce NB hasta kohortunda yapılan çalışmada da hastaların yaklaşık %30'unda Rho/Rac sinyal yolağında en az bir mutasyon veya genetik aberasyon saptanmıştır<sup>38</sup>. Rho/Rac sinyal yolağının NB hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır<sup>38</sup>. Çalışmamızda ele aldığımız RhoB, Rho/Rac sinyal yolağının bir üyesidir. RhoB, Rac veya Cdc42 gibi diğer Rho GTPazlarını plazma membranına hedefleyerek PDGF veya inflamatuvar yanıtları iletir<sup>14</sup>. RhoB ekspresyonu tümör prognozu üzerindeki etkisi daha önce osteosarkom, mesane, pankreas, böbrek ve mide gibi farklı tümör tiplerinde çalışılmış ve çoğunlukla bu hastalarda iyi prognozla ilişkilendirilmiştir<sup>39</sup>. Buradan yola çıkılarak RhoB'nin NB prognozunda önemli bir rol oynayabileceği düşünüldü. RhoB'nin NB prognozuna etkisinin araştırılabilmesi için NB hasta grubundaki RhoB protein ekspresyon düzeyleri ile hastaların genel ve olaysız sağ kalımları karşılaştırılmıştır. NB prognozunu belirlemede risk gruplarından yararlanılmaktadır ve bu risk gruplarında özellikle düşük, orta ve yüksek risk grubu hastaların

sağ kalımları arasında ciddi fark vardır<sup>40</sup>. Bu nedenle NB hastaları risk grupları bazında incelenmiş ve her bir risk grubunda RhoB ekspresyonu ve hasta sağkalımları arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Tüm risk gruplarında RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların sağkalımlarının daha uzun olduğu saptanmıştır. Ne var ki hastaların sağkalımları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak gruplardaki hasta sayısının az olması bu duruma sebebiyet verebilmektedir. Nöroblastom hastalığı, nadir tümörlerden biri olduğu için bu hasta örneklerinin toplanması ve toplana bu örneklerden büyük bir örneklem oluşturulması zordur. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından birisi de çalışmanın 56 hasta örneği ile yapılmış olmasıdır. Kaplan Meier analizlerine ilaveten RhoB ekspresyonu ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki Spearman's korelasyon analizi ile incelenmiştir. Korelasyon analizine göre hasta sağkalımları ile RhoB ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki vardır. Yani RhoB ekspresyonu pozitif olan hastaların sağkalımları daha yüksektir. Yine RhoB ile nüks oluşumu arasında negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar RhoB ekspresyonunun, osteosarkom, mesane, pankreas gibi farklı tümör tiplerinde olduğu gibi nöroblastom için de iyi bir prognostik belirteç olabileceğine işaret etmektedir.

## Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu  
Onay Tarihi: 27.04.2022  
Karar No: 2022/16-03

## Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: B.B., G.S., S.K.Ö., Z.A., N.O.; Veri toplama ve işleme: B.B., G.S., S.K.Ö., D.K., S.A.; Analiz ve verilerin yorumlanması: B.B., G.S., S.K.Ö., D.K., S.A., Z.A., N.O.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: B.B., Z.A., N.O.

## Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar DEU Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü tarafından 2021.KB.SAG.044 proje numarası ve Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu (TUBİTAK) tarafından 2214-A programı 2018/2 1059B141801571 proje numarası ile desteklenmiştir." Türk Pediatrik Onkoloji Grubuna (TPOG) destekleri için teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

## Kaynaklar

1. Shawraba F, Hammoud H, Mrad Y et al. Biomarkers in Neuroblastoma: An Insight into Their Potential Diagnostic and Prognostic Utilities. *Curr Treat Options Oncol.* 2021; 27;22(11):102.
2. Qiu B, Matthay KK. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022; 19(8):515-533.
3. Irwin MS, Naranjo A, Zhang FF et al. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2021; 10;39(29):3229-3241.

## Nöroblastomda RhoB Ekspresyonu

- Cohn SL, Pearson AD, London WB et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;10;27(2):289-97.
- Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2015; 20;33(27):3008-17.
- Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017;17(4):369-386.
- Olgun N, Cecen E, Ince D et al. Dinutuximab beta plus conventional chemotherapy for relapsed/refractory high-risk neuroblastoma: A single-center experience. *Front Oncol.* 2022; 23; 12:1041443.
- Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 2008; 18;582(14):2093-101.
- Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(8):496-510.
- Svensmark JH, Brakebusch C. Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene.* 2019;38(50):7447-7456.
- The Cancer Genome Atlas Research Network., Weinstein, J., Collisson, E. *et al.* The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 2013; 45, 1113–1120.
- Gómez del Pulgar T, Benitah SA, Valerón PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumorigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays.* 2005; 27(6):602-13.
- Zaoui K, Duhamel S. RhoB as a tumor suppressor: It's all about localization. *Eur J Cell Biol.* 2023;102(2):151313. doi: 10.1016/j.ejcb.2023.151313.
- Vega FM, Ridley AJ. The RhoB small GTPase in physiology and disease. *Small GTPases.* 2018; 3;9(5):384-393.
- Ellis S, Mellor H. Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol.* 2000;10(3):85-8. doi: 10.1016/s0962-8924(99)01710-9.
- Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC, Benjamin LE. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev.* 2003; 1;17(21):2721-32. doi: 10.1101/gad.1134603.
- Sandilands E, Cans C, Fincham VJ et al. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell.* 2004;7(6):855-69. doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.019.
- Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol.* 1999; 9;9(17):955-8. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80422-9.
- Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 2005;30;280(52):43257-63. doi: 10.1074/jbc.M508650200.
- Tillemont V, Lajoie-Mazenc I, Casanova A, Froment C, Penary M, Tovar D, Marquez R, Monsarrat B, Favre G, Pradines A. Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp Cell Res.* 2008;10;314(15):2811-21. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.06.011
- Kroon J, Tol S, van Amstel S, Elias JA, Fernandez-Borja M. The small GTPase RhoB regulates TNF $\alpha$  signaling in endothelial cells. *PLoS One.* 2013; 26,8(9):e75031.
- Gutierrez E, Cahatol I, Bailey CAR et al. Regulation of RhoB Gene Expression during Tumorigenesis and Aging Process and Its Potential Applications in These Processes. *Cancers (Basel).* 2019; 13,11(6):818.
- Mamouni K, Cristini A, Guirouilh-Barbat J et al. RhoB promotes  $\gamma$ H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2014; 34(16):3144-55.
- Lei C, Li S, Fan Y et al. LncRNA DUXAP8 induces breast cancer radioresistance by modulating the PI3K/AKT/mTOR pathway and the EZH2-E-cadherin/RHOB pathway. *Cancer Biol Ther.* 2022;31;23(1):1-13.
- Zhou J, Zhu Y, Zhang G et al. A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *Int J Cancer.* 2011; 1;128(5):1057-68.
- Liu Y, Song N, Ren K et al. Expression loss and revivification of RhoB gene in ovary carcinoma carcinogenesis and development. *PLoS ONE* 2013; 8, e78417.
- Sato N, Fukui T, Taniguchi T et al. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer.* 2007;1,120(3):543-51.
- Bousquet E, Calvayrac O, Mazières J et al. RhoB loss induces Rac1-dependent mesenchymal cell invasion in lung cells through PP2A inhibition. *Oncogene.* 2016;7;35(14):1760-9. doi: 10.1038/onc.2015.240.
- Mazieres J, Antonia T, Daste G et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2004;15;10(8):2742-50. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0149. PMID: 15102679.
- Ju JA, Godet I, Di Giacomo JW, Gilkes DM. RhoB is regulated by hypoxia and modulates metastasis in breast cancer. *Cancer Rep (Hoboken).* 2020;3(1):e1164.
- Kopsida M, Liu N, Kotti A et al. RhoB expression associated with chemotherapy response and prognosis in colorectal cancer. *Cancer Cell Int.* 2024; 15;24(1):75.
- Calvayrac O, Mazières J, Figarol S et al. The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol Med.* 2017; 9(2):238-250.
- Kazerounian S, Gerald D, Huang M et al. RhoB differentially controls Akt function in tumor cells and stromal endothelial cells during breast tumorigenesis. *Cancer Res.* 2013; 1;73(1):50-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3055.
- Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer.* 2007;27; 7:55. doi: 10.1186/1471-2407-7-55.
- Olgun N, İnce D, Çeçen E et al. The Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma Treatment Protocol-2020 1st edition. *İnciraltı-İzmir, TPOG,* 2020: 1-354.
- Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases.* 2016;7(4):207-221.
- Sahai, E., Marshall, C. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 133–142.
- Dyberg C, Fransson S, Andonova T, Sveinbjörnsson B, Lännerholm-Palm J, Olsen TK, et al. Rho-associated kinase is a therapeutic target in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2017; 8;114(32): E6603-E6612.
- Ju JA, Gilkes DM. RhoB: Team Oncogene or Team Tumor Suppressor? *Genes (Basel).* 2018; 30;9(2):67.
- MacFarland S, Bagatell R. Advances in neuroblastoma therapy. *Curr Opin Pediatr.* 2019;31(1):14-20.

