

SEZEN ATASOY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**OSTEOSARKOM TANILI HASTALARDA GENETİK VE
KROMOZOM DEĞİŞİMLERİNİN METASTAZ İLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

SEZEN ATASOY

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA SIRMA EKMEKCİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**OSTEOSARKOM TANILI HASTALARDA GENETİK VE
KROMOZOM DEĞİŞİMLERİNİN METASTAZ İLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

SEZEN ATASOY

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA SIRMA EKMEKCİ**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. AYHAN DEVİREN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Sezen ATASOY tarafından Prof. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ'nin danışmanlığında hazırlanan "Osteosarkom Tanılı Hastalarda Genetik ve Kromozom Değişimlerinin Metastaz İle İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 21/10/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. N. Şahin ABACI
İÜ. ASDETAE. Genetik A.D.

Jüri-Danışman
Prof. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ
İÜ. ASDETAE. Genetik A.D.

Jüri
Doç. Dr. Yelda ARGÜDEN
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri
Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KIRAN
Bezmialem Üni. Tıp Fak. Tıbbi Patoloji A.D.

Jüri
Dr. Öğr. Üyesi Mehveç POĞDA
İÜ. ASDETAE. Genetik A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sezen Atasoy

İTHAF

*Başta annem, teyzelerim ve kardeşim olmak üzere, üzerimde emeği olan tüm kadınlara
ithaf ediyorum...*

TEŞEKKÜR

Bütün lisansüstü eğitimim ve çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen, her zaman desteklerini hissettiğim başta değerli hocam Prof. Dr. Ayhan DEVİREN'e ve değerli tez danışmanım Prof. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ'ye, yıllardır büyük bir mutlulukla beraber çalıştığım, bir sürü güzel anılar paylaştığım ve üzerimde büyük emekleri olan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sitogenetik laboratuvarı ailesine, lisansüstü eğitimim süresince her türlü olanağından yararlandığım ve çalışmalarımı sürdürdüğüm İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarım ve çok kıymetli hocalarıma, çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde ve yürütülmesinde en büyük desteklerden birini veren ve ihtiyacım olan tüm imkanları kullanmamı sağlayan başta Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KIRAN olmak üzere, Öğr. Gör. Burcu GÜL'e, Öğr. Gör. Seval TURNA'ya, Uzm. Bio. Güzin GÖKAY'a ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na, tüm çalışmalarımда fikirlerinden ve yardımlarından yararlandığım Doç. Dr. Onur BAYKARA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Emrah YÜCESAN'a, bu zorlu süreçte güler yüzü ve arkadaşlığıyla motivasyonumu yüksek tutan, imkansızlıklar içinde bana her türlü imkanı yaratan, yardımını ve desteğini hiç eksik etmeyen Dr. Beyza GÖNCÜ'ye, her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan, insani ve ahlaki değerleriyle bana örnek olan, beraber çalışmaktan gurur duyduğum Doç. Dr. Aydan DAĞ'a, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde birlikte çalışmaktan keyif duyduğum bütün değerli hocalarım ve çok sevdiğim asistan arkadaşlarıma, bana dostluklarıyla destek olan, her koşulda yardımına koşan güzel kalpli arkadaşlarım Başak Aslaneli Çakmak, Bengisu Gökkaya, Melis Erdoğan, Sede Öden Sürücü ve Selin Coşkun Gider'e ve son olarak, bütün yaşantım boyunca bana her koşulda destek olan, tüm zorlukları aşabileceğime inandıran, maddi ve manevi desteklerini her daim hissettiren, emeklerini ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım aileme,

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğimle teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	3
BEYAN.....	4
İTHAF.....	5
TEŞEKKÜR.....	6
İÇİNDEKİLER	7
TABLolar LİSTESİ.....	10
ŞEKİLLER LİSTESİ	11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	15
ÖZET	19
ABSTRACT.....	20
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	21
2. GENEL BİLGİLER	23
2.1. KEMİK DOKU	23
2.1.1. KEMİĞİN SINIFLANDIRILMASI	24
2.1.2. KEMİĞİN HÜCRESEL ELEMANLARI.....	25
2.1.2.1. OSTEOLASTLAR	25
2.1.2.2. OSTEOSİTLER	27
2.1.2.3. OSTEOKLASTLAR	28
2.2. KEMİK GELİŞİMİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	30
2.2.1. KEMİĞİN BOYUNA BÜYÜMESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER.....	32
2.2.1.1. SİSTEMİK FAKTÖRLER.....	32
2.2.1.2. LOKAL FAKTÖRLER.....	34
2.2.1.3. MEKANİK FAKTÖRLER	35
2.2.2. KEMİĞİN ENİNE BÜYÜMESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER.....	35
2.3. KEMİK HASTALIKLARI	35
2.3.1. KEMİK TÜMÖRLERİ	37
2.4. OSTEOSARKOM.....	39
2.4.1. EPİDEMİYOLOJİ	41
2.4.1.1. İNSİDANS	41
2.4.1.2. YAŞ.....	42

2.4.1.3. CİNSİYET.....	43
2.4.1.4. ETNİK KÖKEN	44
2.4.1.5. TUTULUM YERİ.....	44
2.4.1.6. MORTALİTE.....	45
2.4.1.7. SAĞKALIM.....	47
2.4.2. ETİYOLOJİ	47
2.4.3. HİSTOPATOLOJİ	48
2.4.4. TANI	50
2.4.5. PROGNOSTİK ÖZELLİKLER.....	51
2.4.6. EVRELENDİRME.....	51
2.4.7. TEDAVİ.....	53
2.5. OSTEOSARKOMUN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ.....	54
2.6. SIKLIĞI BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ 3 (CDKN3).....	57
2.7. SİTOKİNEZİN PROTEİN DÜZENLEYİCİSİ 1 (PRC1)	57
2.8. RİBONÜKLEOTİT REDÜKTAZ KATALİTİK ALT ÜNİTESİ M1 (RRM1)....	59
2.9. FİBULİN BENZERİ EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİN 2 İÇEREN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EFEMP2)	60
2.10. ÖKARYOTİK TRANSLASYON BAŞLATICI FAKTÖR 4 GAMA 2 (EIF4G2)	60
2.11. MELANOMA İLİŞKİLİ ANTİJEN 3 (MAGEA3).....	61
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	64
3.1. GEREÇLER.....	64
3.1.1. KULLANILAN CİHAZLAR	64
3.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR VE TİCARİ KİTLER.....	65
3.1.3. KULLANILAN SARF MALZEMELER	69
3.2. YÖNTEMLER.....	69
3.2.1. DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	69
3.2.2. FFPE DOKU BLOKLARINDAN RNA SENTEZİ.....	70
3.2.3. KOMPLEMENTER DNA (cDNA) SENTEZİ.....	71
3.2.4. GRADIENT POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE OPTİMİZASYON.....	72
3.2.5. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR).....	74

3.2.6. İMMÜNOHİSTOKİMYA (İHK)	75
3.2.7. FLUORESAN IN SITU HİBRİDİZASYONU (FISH)	76
3.2.8. IN VITRO ÇALIŞMALAR	77
3.2.8.1. HÜCRE HATLARININ PASAJLANMASI VE SAKLANMASI	78
3.2.8.2. TRANSFEKSİYON ÇALIŞMALARI.....	79
3.2.8.3. siRNA'LARININ TRANSFEKSİYONU	80
3.2.8.4. RNA İZOLASYONU VE GZ-PZR	81
3.2.8.5. TRANSFEKSİYON VERİMLİLİĞİNİN HESAPLANMASI	81
3.2.8.6. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ	82
3.2.8.7. APOPTOZ ANALİZİ.....	83
3.2.8.8. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ	84
3.2.8.9. PROTEİN İZOLASYONU VE WESTERN BLOT	84
3.3. İSTATİKSEL ANALİZLER	86
4. BULGULAR.....	87
4.1. OLGULARA AİT DEMOGRAFİK BİLGİLER	87
4.2. OS VE MOS DOKULARINDA GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ	90
4.3. OS VE MOS DOKULARINDA PRC1'İN İHK DEĞERLENDİRMELERİ.....	98
4.4. OS VE MOS DOKULARINDA FISH DEĞERLENDİRMELERİ	102
4.5. TRANSFEKSİYON VERİMLİLİĞİ VE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ	105
4.6. APOPTOZ VE HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN FLOW SİTOMETRİK ANALİZLERİ	108
5. TARTIŞMA	115
KAYNAKLAR	123
ETİK KURUL KARARI	135
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	137
ÖZGEÇMİŞ	138

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Osteoblast farklılaşması ve fonksiyonunda görev alan moleküller	27
Tablo 2. Osteoklast farklılaşması ve fonksiyonunda görev alan moleküller	29
Tablo 3. Kemiklerin boyuna ve enine gelişimini etkileyen faktörler	31
Tablo 4. Kemik hastalıklarının sınıflandırılması	36
Tablo 5. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kemik tümörlerinin sınıflandırılması	38
Tablo 6. Kemik ve eklem tümörlerinin 2020 yılı için tahmini yeni vaka ve ölüm sayısı	42
Tablo 7. 2017 ve 2018 yılında Türkiye'deki ölüm nedenlerinin dağılımı ve sayıları	46
Tablo 8. Kemik tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılan sistemler	53
Tablo 9. 2X RT master karışımının içeriği	72
Tablo 10. GZ-PZR için kullanılan primer dizileri	73
Tablo 11. PZR için uygulanan termal protokol	73
Tablo 12. GZ-PZR için karışım içeriği	74
Tablo 13. GZ-PZR için uygulanan termal protokol (Üç adımlı GZ-PZR)	74
Tablo 14. Saos-2 hücre hattının özellikleri	78
Tablo 15. Genlerin baskılanmasında kullanılan hedef diziler	79
Tablo 16. Transfeksiyon karışımının hazırlanması	80
Tablo 17. Transfeksiyon verimliliğinin hesaplanması	82
Tablo 18. Olguların genel bilgileri	88
Tablo 19. Rölatif mRNA ekspresyon seviyelerinin ortalama $\pm$ SD değerleri	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kemiğin yapısı; (A) Süngerimsi kemik, (B) Kompakt kemik, (C) Büyüme plağının kuşakları.....	24
Şekil 2. Osteoblast ve osteoklastların farklılaşması.....	26
Şekil 3. Kemik büyümesinin düzenlenmesinde GH/IGF-1 sinyalizasyonu	32
Şekil 4. Osteoblast farklılaşmasının düzenlenmesinde T3'ün rolü	33
Şekil 5. Kemik tümörleri için 1975-2011 yılları arasında 5 yıllık sağkalım yüzdeleri (“Surveillance Research Program, National Cancer Institute” SEER*Stat software)....	41
Şekil 6. Tanı yaşına göre OS insidansı	43
Şekil 7. Cinsiyetlere göre OS görülme insidansı	43
Şekil 8. Etnik köken ve cinsiyete göre yeni vaka sayısı	44
Şekil 9. Anatomik bölgelere göre OS tutulum yerleri	45
Şekil 10. 2018 yılı dünyadaki ölüm nedenlerinin dağılımı ve sayıları	46
Şekil 11. (A) Yoğun osteoid (siyah ok), tümör hücreleri (sarı ok) ve çok sayıda malign hücre (turkuaz ok). (B) Eozinofilik osteoid (sarı ok) ve pleomorfik, malign stromal hücreli (turkuaz ok) konvansiyonel OS. (C) Stromada dev hücreler (sarı ok) ve osteoid (turkuaz ok). (D) Telanjiektatik OS'de büyük, atipik mitoz gösteren hücre (siyah ok), kan ve/veya hemosiderin içeren boşluklar (sarı ok) [66].....	49
Şekil 12. Osteosarkomagenezdeki genetik mutasyonlar [79]	55
Şekil 13. PRC1 proteininin antiparalel mikrotübül organizasyonundaki rolü.....	58
Şekil 14. RRM1'in tümorogenezdeki rolü	59
Şekil 15. Translasyon başlatılması sırasında ökaryotik translasyon başlatıcı faktörlerin rolleri.....	61
Şekil 16. <i>MAGEA3</i> gen ekspresyonunun metilasyon ile çeşitli hücrelerdeki düzenlenmesi	62
Şekil 17. İHK uygulama basamakları	76
Şekil 18. FISH Uygulama Basamakları	77
Şekil 19. Saos-2 hücre hattının faz kontrast mikroskopunda görüntüsü (sırasıyla x50,x100 ve x200 büyütme)	77
Şekil 20. (a) OS1, (b) OS7 ve (c) OS14 olgularına ait HE boyama örnekleri (x100 büyütme)	87

Şekil 21. Olgulara ait cinsiyet, tutulum yeri, tanı, evre, tümör çapı ve metastaz bilgileri	89
Şekil 22. OS ve MOS gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi	89
Şekil 23. İncelenen bütün olgulardaki rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri (** $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ göstermektedir)	91
Şekil 24. İncelenen bütün olgularda <i>PRC1</i> , <i>RRM1</i> , <i>EFEMP2</i> , <i>EIF4G2</i> , <i>MAGEA3</i> ve <i>CDKN3</i> genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri (** $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)	92
Şekil 25. OS grubunda <i>PRC1</i> , <i>RRM1</i> , <i>EFEMP2</i> , <i>EIF4G2</i> , <i>MAGEA3</i> ve <i>CDKN3</i> genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri (* $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$ 'i göstermektedir)	93
Şekil 26. MOS grubunda <i>PRC1</i> , <i>RRM1</i> , <i>EFEMP2</i> , <i>EIF4G2</i> , <i>MAGEA3</i> ve <i>CDKN3</i> genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri (* $p < 0,05$ ve **** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)	94
Şekil 27. İncelenen bütün olgularda <i>PRC1</i> ve <i>EFEMP2</i> genlerinin kat değişimleri (Mor noktalar OS grubundaki olguları, pembe noktalar MOS grubundaki olguları, siyah çizgi ise medyan değeri temsil etmektedir)	95
Şekil 28. Bütün olgularda düşük ve yüksek <i>PRC1</i> gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi	96
Şekil 29. Bütün olgularda düşük ve yüksek <i>EFEMP2</i> gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi	96
Şekil 30. Düşük ve yüksek <i>PRC1</i> gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi	97
Şekil 31. Düşük ve yüksek <i>EFEMP2</i> gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi	97
Şekil 32. (a) OS17 ve (b) OS14 olgularında İHK ile değerlendirilen <i>PRC1</i> boyamasına ait örnekler (x200 büyütme)	98
Şekil 33. (a) OS grubunda yüksek <i>PRC1</i> protein skoruna sahip OS2 olgusunun (Skor:6) x100 ve (b) x200 büyütmedeki görüntüleri, (c) MOS grubunda yüksek <i>PRC1</i> protein skoruna sahip OS4 olgusunun (Skor:12) x100 ve (d) x200 büyütmedeki görüntüleri ...	99
Şekil 34. Bütün olgularda <i>PRC1</i> protein ekspresyon skorunun istatistiksel analizi (** $p < 0,01$ 'i göstermektedir)	100

Şekil 35. OS grubunda PRC1 protein ekspresyon skorunun istatistiksel analizi.....	100
Şekil 36. MOS grubunda PRC1 protein ekspresyon skorunun istatistiksel analizi (***) p≤0,001'i göstermektedir)	101
Şekil 37. Bütün olgularda düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon skoru gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi (** p<0,01'i göstermektedir)	102
Şekil 38. Düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon skoru gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi (* p<0,05'i göstermektedir).....	102
Şekil 39. (a) OS14 olgusunda PRC1 proteinin İHK boyanması (x100 büyütme), (b) aynı olgunun 15. kromozom sentromerinin FISH ile boyanması (x100 büyütme), (c) normal hücre (sarı ok), monozomik hücre (beyaz ok), trizomik hücre (pembe ok), tetrazomik hücre (mavi ok) ve pentazomik hücrelerde (kırmızı ok) sinyal görüntüsü (x200 büyütme), (d) 15. kromozom sentromerinin gen lokasyonu.....	103
Şekil 40. FISH analizi sonrası incelenen gruplarda kopya sayısına göre sayılan hücrelerin dağılımı	104
Şekil 41. FISH yöntemiyle sayılan hücrelerdeki ortalama anormal hücre yüzdelерinin gruplar arasındaki dağılımı (* p<0,05'i göstermektedir).....	105
Şekil 42. Farklı konsantrasyonlardaki siRNA uygulamalarının <i>PRC1</i> gen ekspresyonu üzerine etkisi	106
Şekil 43. Saos-2 hücre hattında kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında PRC1 ve Beta aktin protein seviyeleri	107
Şekil 44. Kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında rölaf PRC1 protein ekspresyonu	107
Şekil 45. siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarındaki hücre canlılık yüzdeleri.....	108
Şekil 46. siRNA-PRC1, siRNA-NK ve Kontrol gruplarında canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri (**** p≤0,0001'i göstermektedir)	109
Şekil 47. Kontrol, siRNA-NK ve siRNA-PRC1 gruplarında apoptoz ve popülasyon profilleri	110
Şekil 48. Saos-2 hücre hattında kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında PARP1, kesilmiş PARP ve Beta aktin protein seviyeleri	111
Şekil 49. siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında PARP1 ve kesilmiş PARP rölaf protein seviyelerinin kontrol grubuna göre karşılaştırılması (* p<0,05 , ** p<0,01 ve *** p≤0,001'i göstermektedir)	112

Şekil 50. siRNA-PRC1, siRNA-NK ve Kontrol gruplarında hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre yüzdeleri (**** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)	113
Şekil 51. Kontrol, siRNA-NK ve siRNA-PRC1 gruplarında DNA içerik indeksi ve popülasyon profilleri.....	114
Şekil 52. (a) <i>PRC1</i> gen ekspresyon seviyelerinin metastaz yapmayan ve yapan olgular ile (b) normal ve tümör dokuları arasında karşılaştırılması (*** $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)	116
Şekil 53. (a) <i>PRC1</i> protein ekspresyon skorlarının metastaz yapmayan ve yapan olgular ile (b) normal ve tümör dokuları arasında karşılaştırılması (** $p < 0,01$ 'i göstermektedir)	117
Şekil 54. Kontrol olarak muamele edilmeden kültüre edilen Saos-2 hücre hattı (a) ile <i>PRC1</i> geni ile transfekte edildikten sonra kültüre edilen Saos-2 hücre hattının faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü (x200 büyütme).....	120

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A: Amper

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACTB: Beta aktin

AJCC: Amerikan Ortak Kanser Komitesi

ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

ANOVA: Tek yönlü varyans analizi

BMP: Kemik morfogenezik proteini

bp: Baz çifti

BT: Bilgisayarlı tomografi

Cbfa1: Pre-osteoblast hücrelerinde kora bağlanan faktör alfa 1

CDK4: Siklin bağımlı kinaz 4

CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A

CDKN3: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 3

cDNA: Komplementer deoksiribonükleik asit

cis-Pt: Sisplatin

CSF-1: Koloni stimüle edici faktör-1

Ct: Cycle Threshold

c-fms: Makrofaj koloni stimüle edici faktör-1 reseptörü

DAB: 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklörür

DAPI: 4',6,6-diamidino-2-fenilindol

DC-STAMP: Dendrosit-spesifik transmembran proteini

dH₂O: Distile su

dk: Dakika

DMEM-F12: Ham's F12 Medium:Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

DOX: Dokсорubisin

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EB1: Uç bağlayıcı protein

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EFEMP2: Fibulin benzeri ekstrasellüler matriks protein-2 içeren epidermal büyüme faktörü

EIF4G2: Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4 gama 2

ERBB4: Erb-B2 tirozin kinaz reseptörü-4

ESM: Ekstrasellüler matriks

F: Forward

FBS: Fetal sığır serumu

FFPE: Formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü

FISH: Floresan in situ hibridizasyonu

FITC: Floresan izotiyosiyanat

g: Gram

GH: Büyüme hormonu

GTPaz: Guanozin trifosfat nükleotit hidroliz enzimi

GZ-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

HE: Hematoksilen-eozin

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IGF: İnsülin-benzeri büyüme faktörü

IGFR: İnsülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü

Ihh: Indian hedgehog

İHK: İmmünohistokimya

kDa: Kilodalton

L: Litre

MAGEA3: Melanoma ilişkili antijen 3

MDM2: Fare double minute 2 homologu

MFH: Malign fibröz histiyositoma

mg: Miligram

mL: Mililitre

MMP: Matriks metalloproteinazlar
MOS: Metastatik osteosarkom
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
MRG: Manyetik rezonans görüntüleme
MSTS: Kas-İskelet Tümörleri Birliği
MT: Mikrotübül
MTT: [3-(4,5- dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
MTX: Metotreksat
m²: Metrekare
NCI: Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü
NF-κB: Nükleer faktör kappa B
ng: Nanogram
NK: Negatif kontrol
nm: Nanometre
nM: Nanomolar
NuMA: Nükleer mitotik apart proteini
PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI: Propidyum iyodür
PRC1: Sitokinezin protein düzenleyicisi 1
PTHrP: Paratiroid hormon ilişkili peptid
PVDF: Polivinilidin diflorür
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R: Reverse
RANKL: Nükleer faktör kappa B ligandı reseptör aktivatörü
RB1: Retinoblastoma
RecQL4: RecQ benzeri helikaz 4
RNA: Ribonükleik asit
RRM1: Ribonükleotit redüktaz katalitik alt ünitesi M1
RUNX2: Runt- ilişkili transkripsiyon faktörü-2

SATB2: AT-zengin dizilere bağlanan protein-2

SD: Standart sapma

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi

SEER: The Surveillance, Epidemiology, and End Results

siRNA: Küçük interferans ribonükleik asit

SSC: Salin sodyum sitrat

TBST: Tris tampon tuzu ve Tween 20

Thr: Treonin

TNF: Tümör nekroz faktörü

TP53: Tümör protein 53

TSG: Tümör baskılayıcı gen

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

T3: Triiodotironin

T4: Tiroksin

OPG: Osteoprotegerin

OS: Osteosarkom

OSX: Osteriks

sn: Saniye

V: Voltaj

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WRN: Werner sendromu ATP-bağımlı helikaz

7-AAD: 7-amino aktinomisin D

^{99m}Tc: Teknesyum-99m

°C: Derece santigrad

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

ÖZET

Atasoy, S. (2020). Osteosarkom Tanılı Hastalarda Genetik Ve Kromozom Değişimlerinin Metastaz İle İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Osteosarkom (OS) primitif osteojenik mezenkimal hücrelerden köken alan primer kemik tümörüdür. OS'ler çoğunlukla kötü prognoz ve yüksek mortalite ile seyretmektedir. Metastaz varlığı, yüksek nüks oranı ve fiziksel hareket kısıtlılığı OS'nin önemli bulgularındandır. Tedavide esas kemoterapi olmasına rağmen, etkinliği yetersizdir. Metastatik OS (MOS) hastalarında ise, tedavi etkinliğinin düşük olmasının yanında prognoz da kötü seyretmektedir. Bu nedenle, OS ve MOS'daki moleküler mekanizmalarının aydınlatılarak farklı tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi, hastaların klinik seyirlerinin iyileştirilmesinde oldukça önemlidir. Bu amaçla; siklin bağımlı kinaz inhibitörü 3 (CDKN3), sitokinezin protein düzenleyicisi 1 (PRC1), ribonükleotit redüktaz katalitik alt ünitesi M1 (RRM1), fibulin benzeri ekstrasellüler matriks protein-2 içeren epidermal büyüme faktörü (EFEMP2), ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4 gama 2 (EIF4G2) ve melanoma ilişkili antijen 3 (MAGEA3) genlerinin OS ve MOS olgularındaki gen ekspresyon seviyeleri incelendi. Rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında PRC1 ve EFEMP2 gen ekspresyonlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla; $p<0,0001$ ve $p=0,0008$). PRC1'in rolünün daha iyi anlaşılması için olgularda protein seviyeleri immünohistokimya ile ve diğer yandan 15. kromozomun sayısal anomalileri ise floresan in situ hibridizasyonu metodu ile incelendi. MOS grubunda yüksek PRC1 protein ekspresyonu kısa sağkalım süresi ile ilişkilendirildi. Aynı zamanda, MOS grubunda 15. kromozomun kopya sayısı artışlarının anlamlı şekilde yükseldiği bulundu. Saos-2 hücre hattında in vitro RNA interferans deneyleriyle PRC1 baskılandığında, hücrelerde canlılığın azaldığı, G2/M fazında birikme olduğu ve apoptozun indüklendiği gösterildi. Sonuç olarak, PRC1'in klinikopatolojik ve özellikle metastaz ile olan ilişkisi nedeniyle hastalığın patogenezindeki rolü gösterilerek, prognostik bir belirteç olarak OS'nin tedavisinde yüksek potansiyel taşıdığı bulundu.

Anahtar Kelimeler : Kemik hastalıkları, Osteosarkom, Metastaz, Sitokinezin protein düzenleyicisi 1, Fibulin benzeri ekstrasellüler matriks protein-2 içeren epidermal büyüme faktörü

ABSTRACT

Atasoy, S. (2020). Investigation of the Relationship of Genetic and Chromosome Changes with Metastasis in Osteosarcoma Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetic. Doctoral Thesis. İstanbul.

Osteosarcoma (OS) is a primary bone tumor originating from primitive osteogenic mesenchymal cells. OS usually has poor prognosis and high mortality. The presence of metastasis, high recurrence rate and limitation of movement are among the important clinical findings of OS. Although chemotherapy is essential, its effectiveness is low. Metastatic OS (MOS) patients' prognosis is severe along with the response to treatment. Therefore, clarifying molecular mechanisms and determining different treatment approaches are important for improving the clinical course. For this purpose, cyclin-dependent kinase inhibitor-3 (CDKN3), protein regulator of cytokinesis-1 (PRC1), ribonucleotide-reductase catalytic subunit-M1 (RRM1), epidermal growth factor containing fibulin-like extracellular matrix protein-2 (EFEMP2), eukaryotic translation initiation factor-4-gamma-2 (EIF4G2) and melanoma associated-antigen-3(MAGEA3) genes in OS and MOS cases were evaluated. Relative mRNA expression levels were showed that PRC1 and EFEMP2 expressions elevated and statistically significant ($p < 0.0001$ and $p = 0.0008$, respectively). For better understanding of PRC1's role, protein levels by immunohistochemistry and chromosome 15 numerical anomalies by fluorescent in situ hybridization were examined. High PRC1 protein expression was associated with shortened survival time in MOS. It was also found that copy number of chromosome 15 significantly increased in MOS. In vitro RNA interference assays showed that silencing PRC1 in the Saos-2 cell line led cell cycle arrest at the G2/M phase and induced apoptosis. In conclusion, due to its clinicopathological and metastasis relation, the role of PRC1 in the pathogenesis of OS has been shown and it has been found that it has a high potential in the treatment of malignancy as a prognostic marker.

Key Words: Bone diseases, Osteosarcoma, Metastasis, Protein regulator of cytokinesis-1, Epidermal growth factor containing fibulin-like extracellular matrix protein-2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Özel bir bağ dokusu olan kemik dokusu; organları koruyan, eklem, tendon ve ligamentler için mekanik destek sağlayan, aynı zamanda minerallerin depolanması ve hematopoez için mikroçevre oluşturan önemli bir yapıdır. Kemik dokusu, yaşam boyunca sürekli yenilenen, onarılan, şekli değişen ve büyüyen dinamik bir yapıdır. Kemik ilişkili hücreler birçok faktörün etkileşimiyle gelişir ve büyürler. Kemik gelişiminde rol oynayan faktörlerdeki bozukluklar sonucunda çeşitli kemik hastalıkları ve rahatsızlıkları ortaya çıkmaktadır. Kemik dokusu maligniteleri primer ya da sekonder (metastatik) olarak sınıflandırılmaktadır. Primer kemik ve eklem tümörleri bütün neoplazmlar arasında yaklaşık % 0,2'lik oranla nadir görülen mezenkimal kökenli tümörlerdir. Çok aşamalı karsinogenez gösteren epitel tümörlerinden farklı olarak, mezenkimal tümörlerde hiçbir prekürsör tanımlanamamıştır.

Osteosarkom (OS), kemik tümörlerinin arasında en yaygın görülen primer kemik malignitesidir. OS lezyonlarının ayırıcı özelliği osteoid üretiminin olmasıdır ve düzensiz kalsifiye doku üreten osteoblast benzeri tümör hücreleri ile karakterizedir. OS, herhangi bir kemikte ortaya çıkabilmesine rağmen, daha çok uzun kemiklerin metafizlerinde yerleşmektedir. En yaygın görülen tipi konvansiyonel OS'dir ve tüm vakalarının %85'ini oluşturmaktadır. Hastalarda en sık lokal ağrı bulgusu görülmekte fakat tümörün küçük olduğu durumlarda çoğunlukla herhangi bir klinik bulgu gözlenmemektedir. OS tedavisinde çoklu yaklaşımla, hem cerrahi hem de sistemik kemoterapi uygulanmaktadır. Son 40 yılda uygulanan tedaviler sonucunda OS hastalarının prognozunda önemli değişiklikler olmasına rağmen primer OS ve akciğer metastazı bulunan hastaların prognozunu çok kötü olduğu ve 5 yıllık sağkalımın sadece %25 oranına ulaştığı görülmektedir. Başvuran hastaların %15'inde radyolojik olarak gözlenen metastaz bulgularına rastlanılmaktadır. Bu yüzden OS hastalarında akciğer metastazı en önemli mortalite sebeplerinden biridir. Metastatik OS (MOS) hastalarının prognozu, yalnızca primer tümörü olan hastalara oranla daha kötü seyretmektedir. OS hastalarında her bir metastatik akciğer lezyonu mortaliteyi %43 oranında arttırmaktadır.

Günümüzde OS için en ideal tedavi uygulamasının nasıl olacağı hala tartışmalıdır. Hastaların sağkalımlarının artırılması için tanı ve prognozda etkili moleküler hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir. Tedavi etkinliğinin çok düşük olduğu

MOS hastalarında ise metastazın altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve hastalar için yeni tedavi stratejileri oluşturulması gerekmektedir. Metastaz mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılması için, gen ekspresyonunu etkileyerek tümör transformasyonunu indükleyen ve hücre proliferasyonunu arttıran çeşitli sinyal yollarının incelenmesi önem göstermektedir. Hücre bölünmesi, büyümesi, yapışması ve hücre iskeleti oluşumu gibi önemli fonksiyonları düzenleyen gen ve proteinlerin OS'nin invazyonu ve metastazı sırasında önemli roller oynadığı düşünülmektedir.

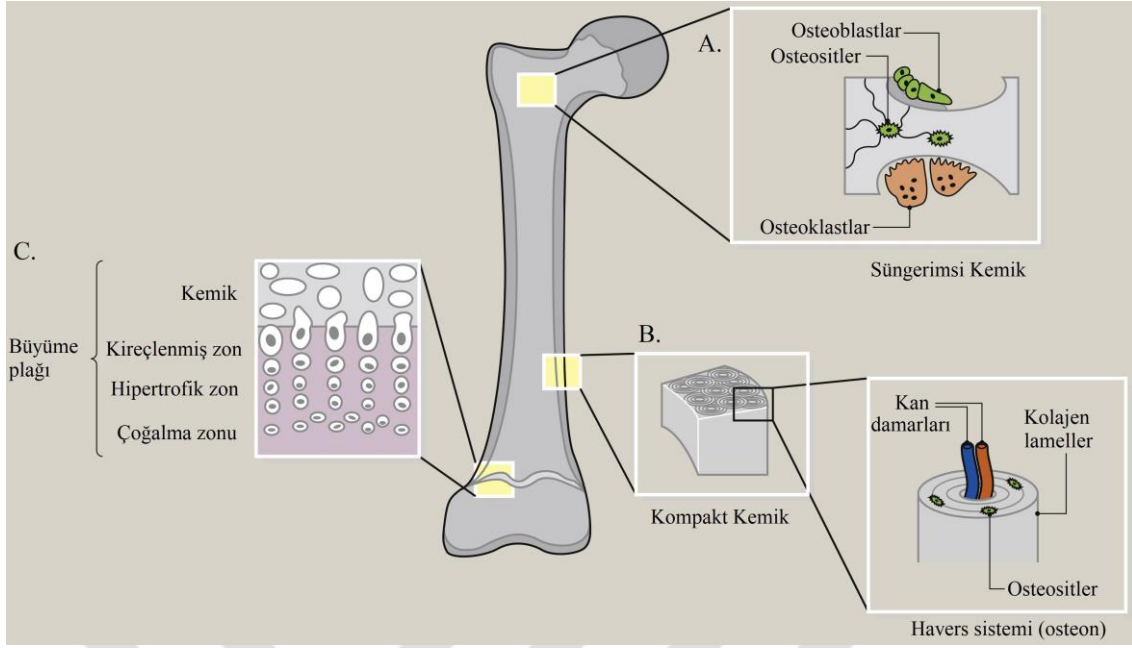
Klinik olarak çok önemli olmasına rağmen OS metastazının genetik ve biyokimyasal faktörleri hakkında bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu eksikliği tamamlamak amacıyla, çalışmamızda metastazla ilişkisi olabileceği düşünülen farklı yollardaki anahtar genler seçilerek OS metastazındaki fonksiyonları araştırıldı. Hücre bölünmesinde rol oynayan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 3 (*CDKN3*) ve sitokinezin protein düzenleyicisi 1 (*PRC1*), hem hücre bölünmesinde hem de DNA tamirinde görev yapan ribonükleotit redüktaz katalitik alt ünitesi M1 (*RRM1*), bağ dokusu gelişimi için gerekli olan ve kemik gelişimi için gerekli kalsiyum bağlayıcı alanlar içeren fibulin benzeri ekstrasellüler matriks protein-2 içeren epidermal büyüme faktörü (*EFEMP2*), protein biyosentezinde mRNA translasyonu mekanizmasında görev yapan ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4 gama 2 (*EIF4G2*) ve çeşitli kanserler için tümör spesifik protein olarak değerlendirilen melanoma ilişkili antijen 3 (*MAGEA3*) genlerinin ekspresyon seviyeleri OS ve MOS hastaları arasında karşılaştırıldı ve genel sağkalım analizleri yapıldı. Analizler sonucunda iki hasta grubunda gen ekspresyonları arasındaki farkı istatistiksel olarak en anlamlı bulunan *PRC1* geninin hasta dokularındaki protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. *PRC1* gen ve protein seviyesindeki değişimlerin kromozom artışı ya da azalışıyla olan bağlantısının belirlenmesi için ise, 15. kromozomun sayısal anomalileri incelendi ve son olarak in vitro deneylerle OS hücre hattında (Saos-2) *PRC1* geninin anlatımı baskılanıp, hücre döngüsü, canlılığı ve apoptozu üzerindeki etkileri belirlendi. Yapılan tüm bu analizler ile incelenen genin agresif tümör gelişimi ve metastazla bağlantısının gösterilmesi hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKU

Bağ doku; vücuttaki organları destekleyen, çeşitli dokular arasında bağlantı ve devamlılığı sağlayan mezenkimal kökenli hücre topluluklarıdır. Epitel hücrelerinin aksine, etraflarında yaygın bir şekilde ekstrasellüler matriks (ESM), sinirler, kan ve lenf damarları bulunmaktadır [1]. Özel bağ dokusu tiplerinden biri olan kemik dokusu ise; vital organları koruyan, eklem, tendon ve ligamentler için mekanik destek sağlayan, aynı zamanda minerallerin depolanması ve hematopoez için mikroçevre oluşturan önemli bir dokudur. Kemik dokusu yaşam boyunca sürekli yenilenen, onarılan, şekli değişen ve büyüyen dinamik bir yapıdır [2]. İnsan iskeletinin temel ögesi olan kemiklerin organizasyonu vücutta; aksiyal iskelet (kafatası, vertebra, kaburgalar, pelvis) ve apendiküler iskelet (alt ve üst ekstremiteler, parmaklar) olmak üzere iki bölümde incelenir.

Kemik dokusu; kolajen matriks, hidroksiapatit kristalleri ve kolajen olmayan proteinlerden oluşan canlı bir yapıdır (Şekil 1). Organik (%35) ve inorganik (%65) bileşiklerden oluşan kemik matriksinin en önemli proteini; tip I kolajendir [3]. Kemikğin inorganik matriksi; ESM'nin kalsiyum ve fosfat tuzları ile doyunlaşıp, mineralleşmesiyle oluşur ve kemik dokunun sert yapısını meydana getirir [4]. Kemikte matriks haricinde, laküna denilen boşluklarda osteositler, matriksin organik bileşenlerinin sentezini yapan osteoblastlar ve howship oyuklarında kemik dokusunun yıkımında görev yapan osteoklastlar da bulunmaktadır. Kemik modelleme (kemikğin oluşumu ve şekillenmesi) ve yeniden şekillenmeleri (eski kemikğin yenilenmesi) bu hücreler aracılığıyla yapılmaktadır [5]. Erken çocukluk döneminde; hem kemik modellenmesi, hem kemik yeniden şekillenmesi, çocukluk çağında; kemik modellenmesi ve yetişkinlerde ise; kemik yeniden şekillenmesi süreçleri görülmektedir [6].



Şekil 1. Kemik yapısı; (A) Süngerimsi kemik, (B) Kompakt kemik, (C) Büyüme plağının kuşakları

Kemik gelişimi (osteogenez, ossifikasyon) fetal ve postnatal dönemde; bağ dokusu (intramembranöz kemikleşme, primer) ve kıkırdak dokusu aracılığıyla (endokondral kemikleşme, sekonder) gerçekleşmektedir. Daha çok süngerimsi kemiklerde gözlenen intramembranöz kemikleşme, primitif bağ dokusu ya da mezenkimal hücrelerin matriksine minerallerin birikmesiyle oluşan hızlı bir kemikleşmedir. Uzun kemiklerde olduğu gibi, önce kıkırdak dokusu şeklinde oluşan yapının kemik matriksi birikimi ile kompakt kemik dokusu haline gelmesi ise; endokondral kemikleşmedir. Her iki yolda da, kemik gelişimi benzer şekilde başlar; ortaya çıkan ilk kemik dokusu birincil kemiktir ve geçici bir dokudur, kısa zaman içerisinde lameller veya ikincil kemik dokusu ile yer değiştirir [1, 5]. Kemik gelişiminde beslenme, hormonlar ve mekanik uyarılar gibi birçok çevresel ve genetik faktörün karmaşık etkileşimleri önemli bir yer tutar [7].

2.1.1. KEMİĞİN SINIFLANDIRILMASI

Genel olarak kemik yapısı; kompakt kemik (kortikal, substantia compacta) ve süngerimsi kemik (trabeküler, substantia spongiosa) olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır (Şekil 1). Kemik kesitleri çıplak gözle incelendiğinde, sert bir kesit olarak gözlenen ve aralarında boşluk olmayan alanlar; kompakt kemik, birbirine açılan

boşluklardan oluşan ve ağ dokusu gibi gözlenen alanlar ise; süngerimsi kemiktir. Femur, fibula ve humerus gibi uzun kemiklerde epifiz olarak adlandırılan uç kısımlar, kompakt kemik tabakası ile örtülü süngerimsi kemikten oluşmaktadır. Uzun kemiklerin merkezindeki diyafiz ise, az miktarda süngerimsi kemik içeren kompakt kemikten oluşmaktadır. Diyafizin içindeki süngerimsi boşlukların duvarlarını örten endosteum osteojenik potansiyele sahiptir. Karpallar ve tarsallar gibi kısa kemikler ise, genellikle merkezinde süngerimsi kemik bulunan ve etrafı kompakt kemik ile çevrilmiş yapılardır [1, 5].

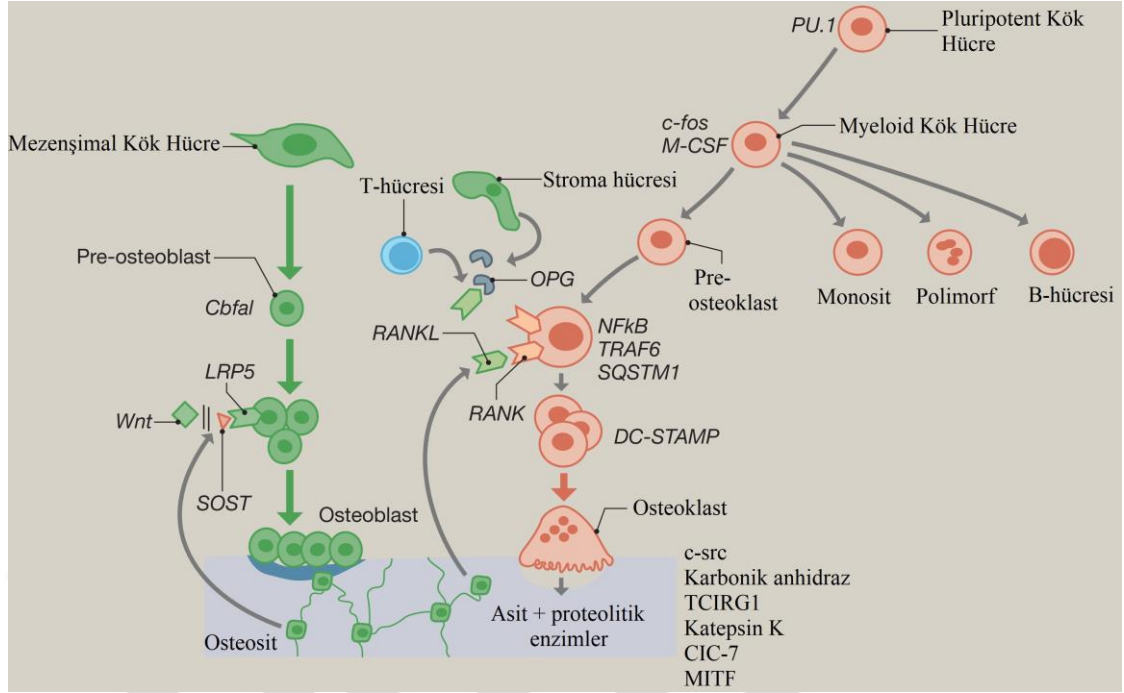
Kemik ESM'nin mikroskopik organizasyonu açısından değerlendirildiğinde ise; lamelli (birincil, olgunlaşmamış) kemik ve örgümsü (ikincil, yetişkin) kemik olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Lamelli kemik; bol miktarda matriks ve osteosit içeren, embriyogenezin ilk aşamalarında ve kırık iyileşmesinde görülen, geçici lamellerden meydana gelen kemik dokusudur. Örgümsü kemik ise daha çok erişkinlerde görülen, paralel ya da dairesel formda sıralanmış kolajen lifleri içeren ve gelişen kemiklerde gözlenen kemik dokusudur. Lamelli kemik geçici bir dokudur ve kısa sürede örgümsü kemik ile yer değiştirmektedir [1, 5].

2.1.2. KEMİĞİN HÜCRESEL ELEMANLARI

Kemik, farklı soylardan gelen hücreleri içeren özel bağ dokusudur; bu soylar çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip mezenkimal kökenli osteoprogenitör hücre soyu ve fagositoz yapma özelliğine sahip monosit-makrofaj progenitör hücre soyudur. Farklı özelliklere sahip hücrelerin görev yaptığı kemik yapımı ve yıkımı mekanizmalarının arasında önemli bir denge vardır. Osteoporoz, multipl myeloma, sarkom ve kanser metastazları gibi iskelet sistemi hastalıklarının çoğu bu dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır [8].

2.1.2.1. OSTEOLASTLAR

Kemik yapımından sorumlu olan hücreler; osteoblastlar, kemik iliği stroması ve periosteal yüzeylerde tek katlı epiteli andırır şekilde yan yana bulunan mezenkimal hücrelerdir (Şekil 2). Bu hücreler, aktif kemik yapımının olduğu bütün bölgelerde bulunurlar. Kemik oluşumu, bu hücrelerin yıkım olan bölgede birikmesiyle başlar. Bağ dokusunun temel hücrelerine farklılaşabilen pluripotent mezenkimal kök hücreler, karakteristik osteoblast hücre yüzey belirteçlerini eksprese eden pre-osteoblastları



Şekil 2. Osteoblast ve osteoklastların farklılaşması

oluştururlar [9]. Pre-osteoblast hücrelerinde kora bağlanan faktör alfa 1 (Cbfa1), osteriks (OSX), transkripsiyon faktörleri ve kemik morfogenezik proteini (BMP) gibi büyüme faktörleri; osteokalsin, tip 1 kolajen ve alkalın fosfataz gibi osteoblast-spesifik genlerin promoterlarına bağlanarak, osteogenez ile ilgili genleri aktifleştirir, olgun osteoblastları meydana gelir. Olgun osteoblastlar, kalsifiye olmamış kemik matriksinin (osteoid) içinden kemik yüzeyine doğru hareket ederek kalsifikasyonu başlatır ve yaklaşık 10 günlük süreç içerisinde mineralize, olgun kemik oluşumu tamamlanır [2]. Osteoblast gelişimi; çoğalma, farklılaşma ve arrest gibi çok sayıda sinyal yolağını içeren karmaşık bir süreçtir. Bunların arasında; Runt- ilişkili transkripsiyon faktörü-2 (RUNX2), Wnt/ β -katenin, BMP, OSX, Twist, Hippo/YAP, Erb-B2 tirozin kinaz reseptörü-4 (ERBB4), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve reseptörü (FGFR), insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) ve reseptörü (IGFR) ile matriks metalloproteinazlar (MMP) bulunmaktadır (Tablo 1). Osteoblast fonksiyonu aynı zamanda sempatik sinir sistemi aracılığı ile de düzenlenir. Osteoblast hücrelerinin membranlarında β adrenerjik reseptörler bulunmaktadır. Bu reseptörler aktifleştğinde, kemik oluşumunun baskılanıp, kemik yıkımının artmasıyla, kemik kütlesinin azaltılması sağlanır [6]. Osteosarkom

(OS) hastalığının gelişiminde bu yolların ve moleküllerin fonksiyonu bozulur, olgunlaşmamış osteoblast hücre fenotipi ile beraber malignite gözlenir [10].

Tablo 1. Osteoblast farklılaşması ve fonksiyonunda görev alan moleküller

<u>Molekül</u>	<u>Fonksiyonu</u>	<u>Klinik etkileri</u>
Cbfa1	Transkripsiyon faktörü	Kemik dokusu yokluğu
OSX	Transkripsiyon faktörü	Osteoblast farklılaşmasında bozukluk ve kemik dokusu yokluğu
SOST	LRP5 antagonisti	Osteoskleroz, artmış kemik kitlesi
LRP5	Reseptör	Erken menopoiz ve retinopati
WNT	LRP5'in ligandları	Kemik yapımında azalma, düşük kemik kütlesi
B-katenin	Transkripsiyon faktörü	Kemik yapımında azalma, düşük kemik kütlesi

2.1.2.2. OSTEOSİTLER

Osteositler; kemikteki bütün hücrelerin %95'ini oluştururlar. Kemik gelişimi sırasında terminal farklılaşmaya uğramış olan osteoblastlar, mineralize olmamış osteoidlerin içinde kaybolarak, mineralizasyon sonrası osteositleri oluştururlar. Osteositler mineralize olan kemik dokusunun lakünalarında yer alırlar ve morfolojileri osteoblastlardan tamamen farklıdır. Osteoid içerisinde organel ve sitoplazmalarının %70'ini kaybeden osteoblastlar, dendritik-benzeri, uzun ve yıldız şeklinde bir görünüm kazanarak osteositleri meydana getirirler. Dendritik süreçler osteoidde bulunan kanaliküller boyunca devam eder; diğer osteositler veya kemik yüzeyindeki osteoblastların etkileşimi laküner-kanaliküller ağını oluşturur. Bu ağ, sinyalleri

başlangıç noktasından etki noktasına kadar iletim de önemlidir. Hareket halindeyken mekanik kuvvetler mineralize kemik üzerinde mikroskopik kırıklara yol açar. Bu mikro-hasarlar osteositler tarafından tespit edilerek, hasarlı bölgenin onarılması ve yeniden şekillenmesi süreci başlatılır. Mekanik sinyallerin yanı sıra, metabolik sinyaller de osteositler üzerinde etkilidir. Östrojen azalması ve yaşlanma ile beraber artan kemik yeniden şekillenmesi süreci ve düşük kemik yoğunluğu osteositlerin ölümüne yol açar [6].

2.1.2.3. OSTEOKLASTLAR

Kemikte yer alan bir diğer hücre tipi ise; kemik yüzeylerinde yer alan ve fagositoz özelliğine sahip osteoklastlardır. Büyük ve çok çekirdekli özelleşmiş makrofajlar olan osteoklastlar, mononükleer prekürsör hücreler tarafından oluşturulurlar [6, 9] (Şekil 2). Osteoklastlar kemik matriksini yıkabilme özelliğine sahip, bilinen tek hücrelerdir. Koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-1) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ligandı reseptör aktivatörü (RANKL) pre-osteoklastların yaşaması, yayılması ve farklılaşması için çok önemli sitokinlerdendir (Tablo 2). Yüksek affinite ile RANKL'ye bağlanarak, RANK'ın bağlanmasını engelleyen osteoprotegerin (OPG) osteoklast farklılaşmasını ve fonksiyonu belirleyen bir faktördür. Osteoklast farklılaşması, mononükleer prekürsör hücrelerdeki RANK ekspresyonunu düzenleyen makrofaj koloni stimüle edici faktör-1 reseptörü (c-fms) sinyal yolağına bağlıdır. Bir başka kritik molekül ise, mononükleer pre-osteoklastların çok çekirdekli osteoklastlara transformasyonunu sağlayan dendrosit-spesifik transmembran proteini (DC-STAMP)'dir [2]. RANK ekspresyonundaki artış, osteoklast genlerinin regülasyonu aracılığıyla olgun çok çekirdekli osteoklastların oluşmasını sağlar. Osteoklastların aktive olması ve kemik yıkımının başlaması için, polarize olmayan olgun osteoklastların kemik matriksine bağlanması gerekir. Bağlandıktan sonra polarize olan osteoklastlar perifer yüzeylerinden podozomları oluştururlar. Podozomlar, integrin ve sitoplazmik iskelet proteinlerinden oluşan bir halka kompleksi ile çevrili, aktinden zengin, yapışkan yapılardır. Mineralize kemik matriksine yapışan osteoklastlardan salgılanan hidroklorik asit, MMP ve kolajenini parçalayan katepsin K gibi proteolitik enzimler yıkımı başlatır. Osteoklastlar hidroklorik asitin ESM'ye salınmasından sorumlu özel proton ve klorür pompalarına sahiptirler. Normal koşullarda asit hidroksiapatiti çözerek, proteolitik enzimlerin kemik matriksine geçmesini sağlar ve kemiğin temel bileşenleri enzimler

aracılığıyla parçalanır. Osteoklastlar, kemik yıkımından sonra parçalanmış kolajen fragmentlerini, kalsiyumu ve fosfatı endositoz ile hücre içine alarak kan dolaşımına aktarırlar. Kemik yıkımı bittikten sonra osteoklastlar kemik yüzeyinde uzaklaşarak apoptoza girerler [1, 2, 5]. Kemik yıkımındaki süreçler küçük guanozin trifosfat nükleotit hidroliz enzimleri (GTPaz) tarafından düzenlenir. GTPaz'lar aktifleşmek için izoprenilasyon ile post-translasyonel modifikasyona uğrarlar. Eğer izoprenilasyonda görev yapan enzimler bifosfonatlar tarafından inaktive edilirse, kemik yıkımı da inhibe edilir. Bifosfonat grubu ilaçlar, kemik yıkımının yüksek olduğu osteoporoz, Paget hastalığı gibi durumlarda veya kanser-ilişkili kemik hastalıklarında sıklıkla kullanılmaktadır [6].

Tablo 2. Osteoklast farklılaşması ve fonksiyonunda görev alan moleküller

Molekül	Fonksiyonu	Klinik etkileri
c-fos	Transkripsiyon faktörü	Osteopetrozis, osteoklast yokluğu, artmış makrofaj sayısı
M-CSF	Sitokin	Osteopetrozis, osteoklast ve makrofaj yokluğu
RANK	Reseptör	Osteopetrozis, osteoklast ve lenf nodül yokluğu
RANKL	RANK ligandı	Osteopetrozis, osteoklast ve lenf nodül yokluğu
DC-STAMP	Transmembran reseptörü	Osteopetrozis, olgun osteoklast yokluğu
TRAF6	Sinyal molekülü	Osteopetrozis, osteoklast yokluğu, sitokin sinyalizasyonunda bozukluk

SQSTM1	Sinyal molekülü	Hatalı osteoklast aktivitesi
OPG	RANKL'nin aldatıcı reseptörü	Osteoporoz, artmış kemik yıkımı, vasküler kalsifikasyon
c-src	Sinyal molekülü	Osteopetrozis, anormal osteoklast membran yapısı
Katepsin K	Proteolitik enzim	Osteopetrozis, kemik matrik proteinini sindiremeyen osteoklastlar
TCIRG1	Proton pompası ünitesi	Osteopetrozis, asit salgılayamayan osteoklastlar
CIC-7	Klor pompası	Osteopetrozis, asit salgılayamayan osteoklastlar

2.2. KEMİK GELİŞİMİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Postnatal kemik dokusunu meydana getiren iskelet kök hücreleri; kemik iliğinde bulunan, kemiğin gelişimi, büyümesi ve tamirinde görev yapan mezodermal kökenli hücrelerdir. Postnatal iskelet kök hücrelerinin konumları ve işlevleri hala tam olarak tanımlanmamış olsa da, ilk kökenlerinin kemik iliğindeki kan damarı ilişkili, perisit benzeri CD146 pozitif hücreleri olduğu ve özelleşmiş kemik hücrelerini meydana getiren kemik iliği stroma hücrelerinin, iskelet kök hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir [11]. Birbirinden farklı, çeşitli aşamaları içeren ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş sinyal yolları bu hücrelerin özelleşmesini sağlamaktadır [12]. Kemik ilişkili hücreler birçok genetik, hormonal ve çevresel faktörün etkileşimleri ile büyüme ve gelişme aşamalarını geçirirler (Tablo 3).

Tablo 3. Kemiklerin boyuna ve enine gelişimini etkileyen faktörler

KEMİĞİN BOYUNA BÜYÜMESİ		KEMİĞİN ENİNE BÜYÜMESİ	
<u>Pozitif Etki</u>	<u>Negatif Etki</u>	<u>Pozitif Etki</u>	<u>Negatif Etki</u>
Büyüme hormonu	Glukokortikoidler	Androjenler	Östrojenler
İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1	Östrojenler	Paratiroid hormonu	
Triiodotironin	Paratiroid hormon ilişkili peptid	Mekanik kuvvetler	
Tiroksin	Basınç		
Androjenler			
Indian hedgehog			
Fibroblast büyüme faktörü			
Kemik morfogenetik proteinleri			
Vasküler endotelial büyüme faktörleri			
Gerilme			
Basınç			
İnervasyon			

Kemiğin boyuna büyümesi; sistemik-lokal hormonlar ve lokal mekanik faktörler tarafından kontrol edilir. Kemiğin enine büyümesinin kontrolünde ise mekanostat teorisi (periostal yerleşimi düzenleyen mekanik şartlar) ve sizostat hipotezi (mekanik

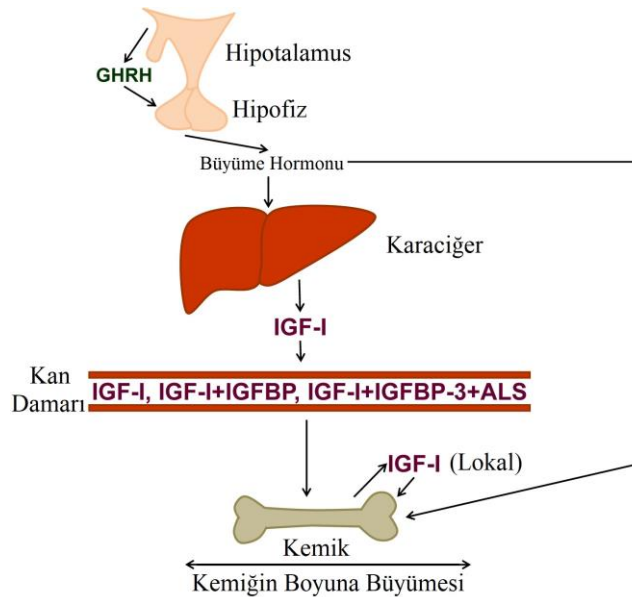
şartlardan bağımsız olarak, temel gen ya da genlerin enine büyümeyi düzenleyerek önceden programlanan boyuta ulaştırması) öne sürülmüştür [13].

2.2.1. KEMİĞİN BOYUNA BÜYÜMESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Kemiğin boyuna büyümesi; genetik, hormonal, ve çevresel faktörler tarafından düzenlenir. Bu düzenleme 3 kademe gerçeşmektedir [13]. İlk kademe, büyüme hormonu (GH), cinsiyet hormonları ve glukokortikoidler tarafından yapılan sistemik kontroldür. Çocukluk döneminde; kemiğin boyuna büyümesini kontrol eden temel sistemik hormonlar; GH, insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), tiroid hormonları (triiodotironin; T3 ve tiroksin; T4) ve glukokortikoidlerdir. Ergenlik döneminde ise; cinsiyet steroidleri önemli bir rol oynamaktadır [14]. İkinci kademe, Indian hedgehog (Ihh), paratiroid hormon ilişkili peptid (PTHrP) ve FGF moleküllerini içeren lokal kontroldür. Üçüncü kademe ise, mekanik kontrol aşamalarıdır.

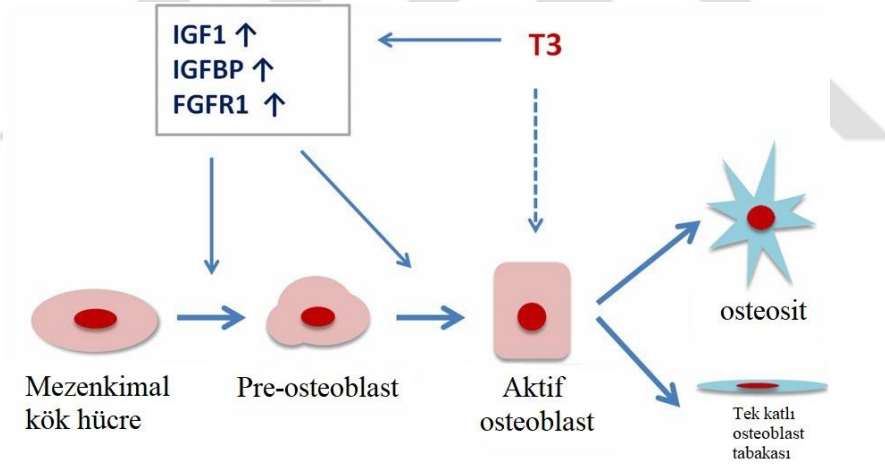
2.2.1.1. SİSTEMİK FAKTÖRLER

Doğumdan sonra GH kemiğin boyuna büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Bu dönemde GH, IGF-1 ile beraber, hipotalamus-hipofiz-büyüme plağı aksında düzenleyici olarak görev yaparlar [14]. Somatomedin hipotezine göre; GH, IGF-1'in hepatik üretimini uyarır ve bu doğrudan epifiz kıkırdağındaki büyümeyi tetikler. GH, dinlenme kuşağındaki kondrositlere etki eder, aynı zamanda lokal IGF-1 üretiminden sorumludur [15] (Şekil 3).



Şekil 3. Kemik büyümesinin düzenlenmesinde GH/IGF-1 sinyalizasyonu

Tiroit hormonlarının da kemik büyümesinde ciddi rolleri bulunmaktadır. T3 ve daha az olarak T4, normal kemik gelişiminde yer alırlar. Çocukluk çağında hipotiroidizm büyüme geriliğine neden olmaktadır [16]. Diğer taraftan, çocukluk çağında hipertiroidizm artmış metabolik hız ile karakterize olsa da, büyüme plağının füzyonu sonucu azalan kemik mineral yoğunluğu ve yüksek kemik yaşına sebep olmaktadır [17]. Tiroit hormonlarından biri olan T4, dolaşımda yüksek oranda bulunan bir pro-hormondur ve biyolojik olarak daha etkin olan T3'e çevirilmektedir. T3, büyüme plağında dinlenme halindeki kondrosit progenitör hücrelerini uyarıp, hipertrofik farklılaşmayı başlatırken, daha sonraki kondrosit proliferasyonunu baskılar (Şekil 4). Alkalın fosfataz ve kolajen X gibi hipertrofik kondrosit farklılaşması belirteçlerinin ekspresyonlarını arttırarak, kıkırdak matriks mineralizasyonunu indükler. Aynı zamanda IGF-1, Wnt, Ihh/PTHrP ve FGFR3 gibi birçok sinyal yolağıyla etkileşim halindedir [18].



Şekil 4. Osteoblast farklılaşmasının düzenlenmesinde T3'ün rolü

Glukokortikoidler, GH/IGF-1 sinyal yolağı üzerinde çeşitli etkiler göstererek kemik büyümesini baskırlar [19]. Glukokortikoid reseptörleri büyüme plaklarında özellikle hipertrofik kondrositlerde bulunmaktadır [20]. Glukokortikoid seviyelerindeki artış; kemik yıkımını arttırmakta, osteoblast aktivitesini inhibe etmekte ve kemik matriks üretimini azaltmaktadır (Şekil 4) [21, 22]. Aynı zamanda glukokortikoidler, cinsiyet hormonları üretimini azaltması ve D vitamini metabolizmasını değiştirmesi sebebiyle büyüme ve iskelet sistemi üzerinde zararlı etkilere sahiptir [23].

Glukokortikoidlerdeki artış; GH/IGF-1 sinyal yolağını etkilenmesi ve büyümenin baskılanması ile ilişkili iken, düşük seviyeleri uzun boya sebep olmaktadır [24].

Kemiğin boyuna büyümesi, özellikle ergenlik dönemlerinde cinsiyet hormonlarıyla da ilişkilidir. GH yokluğunda, östrojen kemiğin büyümesini baskılar [25-27]. Androjenler ise büyüme plağını direkt olarak etkileyebilme özelliğine sahiptirler, bu aynı zamanda erkekler ile kadınlar arasındaki iskelet sistemi farklılıklarını da açıklamaktadır. Östrojenlerin tersine, androjenler kemiğin boyuna büyümesini uyarmaktadır [28, 29].

2.2.1.2. LOKAL FAKTÖRLER

Kemik gelişiminin ana düzenleyicisi olan Ihh; endokondral kemikleşmeyi koordine eden, kondrosit çoğalması ve farklılaşması ile osteoblast farklılaşmasını düzenleyen, kondrogenез ve osteogenез arasındaki bağlantıyı kuran önemli bir proteindir. Ihh, embriyonik patern ve gelişimde rol oynayan hedgehog protein ailesinin bir üyesidir ve kondrositler üzerinde doğrudan proliferatif etkiye sahiptir [30, 31].

PTHrP'nin öncelikli görevi, kondrositleri proliferasyon bölgesinde tutmaktır. Gelişmekte olan endokondral kemikte ve büyüme plağında kondrositlerin farklılaşmasını düzenler. PTHrP düzeylerindeki farklılıklar büyüme plağındaki kondrosit farklılaşmasını bozarak, kıkırdağın küçülmesine sebep olmaktadır.

FGF ailesi, bilinen en az 22 üyesi ile embriyonik kemik gelişiminin temellerini oluşturmaktadır. Cüceliğin sık rastlanan tiplerinden biri olan akondroplazi, FGF reseptör 3 (FGFR3) genindeki bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Aynı zamanda, FGF18 eksikliği gecikmiş kemik oluşumuna ve azalmış osteojenik belirteç ekspresyonuna neden olmaktadır.

BMP'ler embriyolojide büyüme, farklılaşma ve morfogenezin önemli düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Ihh ve BMP'ler arasındaki sinyalizasyon normal kondrosit gelişimi için gereklidir, ek olarak Ihh/PTHrP sinyal yolağından bağımsız olarak kondrosit farklılaşmasını baskırlar.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) endotel hücreleri için güçlü bir kemoatraktandır. VEGF, endokondral kemikleşmenin son basamağındaki kilit moleküllerden birisidir ve kondrosit farklılaşmasının son aşamasında, vasküler

invazyonda, kondrositlerin apoptozu ile kondrositlerin kemiğe dönüşümünde rol oynamaktadır.

2.2.1.3. MEKANİK FAKTÖRLER

Mekanik faktörler kemiğin gelişim ve adaptasyon süreçlerini etkilemektedir. Normal kemik yapısının gelişimiyle oluşan değişikliklere karşı gelişen kemik adaptasyonu üç kural ile açıklanır; ilki kemik adaptasyonu dinamik yüklenme ile yönlendirilir. İkincisi, edinilmiş cevabı başlatmak için kısa bir mekanik yüklenme gerekmektedir. Son olarak, kemik hücreleri mekanik yüklenme ortamına uyum sağlamaktadır [32]. Ayrıca sempatik sinir sistemi kemik gelişiminin leptin-bağımlı kontrolü aracılığıyla kemik fizyolojisinde çok önemli rol oynamaktadır [33].

2.2.2. KEMİĞİN ENİNE BÜYÜMESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Kemik genişliği büyüme çağından sonra çok az değişim gösterdiği için, kemiğin boyuna büyümesi yaşam boyunca kemik kuvvetinin en önemli belirleyicisi olmuştur. Fakat kemik enine genişlemeden, sürekli boyuna büyürse stabil kalmaz ve kırılır. Histolojik olarak, kemik uzadıkça mineralize tabakalar apozisyon büyüme ile kemik yüzeyinin dış tabakasına eklenir ve böylece kalınlık artar [34]. Bu şekilde diyafizin enine büyümesi periosteal kemik gelişimi olarak da adlandırılır. Periosteal kemik gelişimi, sistemik olarak androjen ve GH tarafından uyarılırken, östrojenler tarafından baskılanır. Aynı zamanda, paratiroid hormonu, yüksek kalsiyum ile beslenme ve fazla fiziksel aktivite erişkinlerde hızlı periosteal büyüme ile ilişkilidir [35, 36]. Lokal, kalıtsal ve mekanik faktörler, sistemik faktörlere göre periosteal büyümede daha önemli oyuncularlardır.

2.3. KEMİK HASTALIKLARI

Kemik büyümesi ve gelişiminde rol oynayan faktörlerdeki anomaliler sonucu çeşitli kemik hastalıkları ve rahatsızlıkları ortaya çıkmaktadır. Bunlar, prenatal ya da postnatal genetik anomaliler ve gelişimsel kusurlar olabileceği gibi, yaşamın ilerleyen süreçlerinde iskelet sisteminin hasar görmesi ile de olabilmektedir. Bunlara ek olarak, mineral metabolizmasını etkileyerek kemik yapısını dolaylı olarak bozan birçok hastalık bulunmaktadır [37] (Tablo 4).

İlerleyen yaşla birlikte en sık görülen kemik hastalığı olan osteoporoz; genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimleri, menopozda östrojen seviyelerinin düşmesi,

dengelesiz beslenme gibi durumların sonucunda kemik yıkımı ile yapımı arasındaki dengelesizlik sonucu oluşmaktadır. Paget hastalığı da benzer şekilde artmış kemik metabolizması ile karakterizedir, fakat bu kronik hastalıkta anomaliler iskelet sisteminde spesifik kemik odaklıdır. Paget hastalığı, hastanın genetik yapısıyla çok ilişkilidir. Osteoklast farklılaşmasında rol oynayan CSF1, DCSTAMP, RANK ve SQSTM1 gibi genlerdeki polimorfizm ve mutasyonlar, anormal osteoklast aktivasyonu ile Paget hastalığına yol açar [2, 38]. Kemik metastazları tümör hücreleri tarafından salınan; IL-1, tümör nekroz faktörü (TNF) ve PTHrP gibi osteoklast aktivitesini arttırıcı faktörler sebebiyle, odaksal osteoklastik kemik yıkımının artışı ile ilişkilidir. Kemik dokusu maligniteleri; primer ya da sekonder (metastatik) olarak görülmektedir. Metastatik kemik tümörleri, primer kemik tümörlerine göre 200 kat daha fazla yaygındır, yetişkinlerdeki kemik tümörlerinin çoğu çeşitli kanserlerin metastazlarıdır [39].

Tablo 4. Kemik hastalıklarının sınıflandırılması

• DEFORMİTELER	• YUMUŞAK DOKU HASTALIKLARI
Konjenital deformiteler	Yumuşak dokunun inflamatuvar lezyonları
Kazanılmış deformiteler	Yumuşak doku tümörleri
• İSKELET SİSTEMİNİN GENEL HASTALIKLARI	• EKLEM HASTALIKLARI
Kemik displazileri	Artrit
Metabolizmanın kalıtsal hastalıkları	Dislokasyon ve subluksasyon
Metabolik kemik hastalıkları	İnternal rahatsızlıklar
Hormon bozuklukları	
• KEMİĞİN LOKAL HASTALIKLARI	• NÖROLOJİK BOZUKLUKLAR
	Poliomyelit

Kemik enfeksiyonları	Serebral palsi
Kemik tümörleri	Spina bifida
Osteokondrit	Periferik sinir lezyonları
Kistik değişiklikler	
Osteoid osteoma	

2.3.1. KEMİK TÜMÖRLERİ

Kemik ve eklem tümörleri nadir görülen hastalıklardır, insan neoplazm tiplerinin içerisinde yaklaşık % 0,2'lik bir oranla görülmektedir [40]. Fakat çocuklarda görülme sıklığı yüksektir ve etiyolojisi büyük ölçüde bilinmemektedir [41]. Radikal cerrahi ve kemoterapi nedeniyle, çocuklar ve ergenlerin yaşam kalitesinde önemli derecede düşüşe sebep olmaktadır [39].

Kemik tümörlerinin histolojik ve genetik olarak sınıflandırılması için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kemik tümörleri, neoplastik hücrelerin farklılaştıkları hücre soyuna ve dengi olan normal hücreye benzerliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu kriterler kıkırdak ya da kemik yapıcı tümörlere kolayca uygulanabilirken, Ewing sarkomu gibi normal dokuyla eşleştirilebilecek, ayırt edici bir farklılaşmaya sahip olmayan tümörler için zordur. Bir diğer önemli husus ise; mezenkimal tümörlerin kökenlerinin bilinmiyor olmasıdır. Çok aşamalı karsinogenez süreci gösteren epitelyal tümörlerden farklı olarak, mezenkimal tümörlerde hiçbir prekürsör lezyon tanımlanmamıştır. Sarkomagenезin spesifik bir fenotiple sonuçlanan, neoplastik farklılaşma ile mezenkimal kök hücreleri etkileyen moleküler değişiklikler sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) primer kemik tümörlerini sınıflandırmak için histogenez ve tümör hücresinin kökeni parametrelerini kullanmaktan vazgeçerek, morfoloji, fenotip ve genotipi içeren parametrelerin kombinasyonuna odaklanmıştır (Tablo 5) [42].

OS, %35'lik oranla en yaygın primer malign kemik tümörüdür, ardından kondrosarkom (%25) ve Ewing sarkomu (%16) gelmektedir. Kordoma ve malign fibröz histiyositoma (MFH) sırasıyla %8 ve %5'lik oranlarla en az görülen kemik tümörü tipleridir. Çoğu primer kemik tümörleri de novo oluşsa da, bazıları çeşitli lezyonlara

bağlantılı olarak gelişmektedir. Bunlardan bazıları malign transformasyona yatkın olan neoplastik olmayan lezyonlardır. Diğerleri ise, malign neoplastik sürecin kaynağı olabilecek iyi huylu neoplazmlardır. Paget hastalığı, radyasyon hasarı ve benign kıkırdak displazileri tümör gelişiminde rol oynamaktadır. Hem OS, hem de MFH Paget hastalığı, radyasyon hasarı, kemik enfarktüsü, fibröz displazisi, kronik osteomyelit ve bazı genetik sendromlar gibi önceden sahip olunan hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [41].

Tablo 5. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kemik tümörlerinin sınıflandırılması

1. KIKIRDAK TÜMÖRLERİ	5. EWİNG SARKOMU/PNT*
Osteokondrom	Ewing Sarkomu
Kondrom	6. HEMATOPOETİK TÜMÖRLER
<i>Enkondrom</i>	Plazma hücreli myeloma
<i>Periostal kondrom</i>	Malign lenfoma, NHL **
<i>Multipl kondromatozis</i>	7. DEV HÜCRELİ TÜMÖR
Kondroblastom	Dev hücreli tümör
Kondromiksoid fibrom	8. NOTOKORDAL TÜMÖRLER
Kondrosarkom	Kordoma
<i>Merkezi, primer ve sekonder</i>	9. VASKÜLER TÜMÖRLER
<i>Perifer</i>	Hemanjiyom
<i>Dediferansiye</i>	Anjiyosarkom
<i>Mezenkimal</i>	10. DÜZ KAS TÜMÖRLERİ
<i>Berrak hücreli</i>	Leiomyom
2. OSTEOJENİK TÜMÖRLER	Leiomyosarkom
Osteoid osteom	11. LİPOJENİK TÜMÖRLERİ
Osteoblastom	Lipom
Osteosarkom	

<i>Klasik (Konvansiyonel)</i>	Liposarkom
<i>Kondroblastik</i>	12. NÖRAL TÜMÖRLER
<i>Fibroblastik</i>	Nörolemma
<i>Osteoplastik</i>	13. DİĞER TÜMÖRLER
<i>Nadir histolojik formlar</i>	Adamantinom
<i>Telanjiektatik</i>	Metastatik malignite
<i>Küçük hücreli</i>	14. DİĞER LEZYONLAR
<i>Düşük gradlı santral</i>	Anevrizmal kemik kisti
<i>Sekonder</i>	Basit kist
<i>Parosteal</i>	Fibröz displazisi
<i>Periosteal</i>	Osteofibröz displazi
<i>Yüksek gradlı yüzeysel</i>	Langerhans hücreli histiyositozis
3. FİBROJENİK TÜMÖRLER	Erdheim-Chester hastalığı
Desmoplastik fibrom	Göğüs duvarı hamartomu
Fibrosarkom	15. EKLEM LEZYONLARI
4. FİBROHİSTİYOSİTİK TÜMÖRLER	Sinoviyal kondromatozis
Benign fibröz histiyositom	
Malign fibröz histiyositom	

* Primitif nöroektodermal tümör, ** Non-Hodgkin lenfoma

2.4. OSTEOSARKOM

Osteojenik sarkom olarak da adlandırılan OS, en yaygın görülen primer kemik tümörüdür. Kemikteki tüm malign tümörlerin yaklaşık %19'u, kemikteki primer malign tümörlerin ise %30-60'ı OS ile ilişkilidir. Ergenlikte en sık görülen solid tümör, çocukluk çağında üçüncü en sık görülen malignite iken, adölesan tümörlerin %7'sini oluşturmaktadır [43, 44].

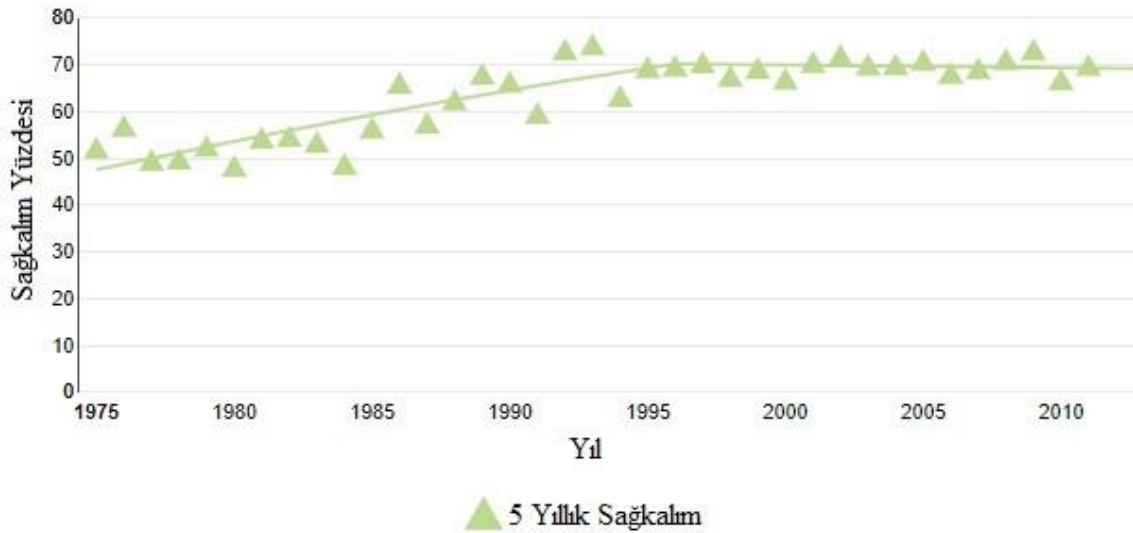
OS'nin en ayırıcı özelliği osteoid üretiminin olmasıdır; osteoid ve kemik dahil olmak üzere, düzensiz kalsifiye doku üreten osteoblast benzeri tümör hücreleri ile karakterizedir. OS tümörleri, az miktarda osteoid üretimi ile fazla sayıda hücreli veya fazla miktarda kalsifiye osteoid matriks ile seyrek hücreli olabilirler. Osteoblastik tümörler tipik olarak anormal mineralize matriks ile seyrek hücrelidir ve doğal trabeküler ile kortikal kemiğe bitişiktir [43]. Bazı OS'lerde epitel benzeri hücrelere rastlanılmıştır. Bu bulgu, bazı OS'lerin primitif pluripotent mezenkimal kök hücrelerden kaynaklandığını göstermektedir [45, 46]. Diğer OS'ler, rabdomiyosarkom benzeri veya lipomatoz benzeri özellikleri olan mezenkimal hücrelerden ya da kararlı osteoprogenitör soy hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Hücre tipleri çeşitlilik göstermesine rağmen, OS'ler sitolojik olarak pleomorfizm, hiperkromatizm ve yüksek oranda atipik mitoz gibi ortak özelliklere sahiptirler. OS'nin diğer histopatolojik özellikleri arasında, küçük yuvarlak hücre ve dev osteoklast benzeri hücre varyasyonları sayılabilmektedir [43].

DSÖ tarafından histopatolojik özelliklerine göre; klasik (konvansiyonel), telanjiektatik, küçük hücreli, yüksek gradlı yüzey, sekonder, düşük gradlı santral, parosteal ve periosteal varyantları şeklinde sınıflandırılmaktadır (Tablo 5) [41]. Genel olarak; kemik içinde (intramedüller) ve kemik yüzeyinde oluşan tümörler olarak sınıflandırılabilir. Çoğu intramedüller OS yüksek dereceli malign tümörlerdir ve sıklıkla ergenlik döneminde ortaya çıkarlar. Buna karşılık, kemik yüzeyinde meydana gelen OS'lerin çoğu agresif değildir ve iyi ya da orta diferansiye olmaktadır. OS, herhangi bir kemikte ortaya çıkabilmektedir, ancak daha çok uzun kemiklerin metafizlerini tutmaktadır. En sık distal femur, proksimal tibia ve proksimal humerusta görülmektedir. İleri yaşlarda görülen OS'lerde tutulum bölgeleri daha değişkendir, genellikle aksiyal iskelet ve kafatasını içermektedir [40]. Çoğu kemik tümörü distal femur ve proksimal tibiada oluşmasına rağmen intramedüller OS sıklıkla uzun kemiklerin metafiz kısmına lokalize olur.

Çocukluk ve ergenlik döneminde en yaygın görülen tipi; konvansiyonel OS'dir ve tüm OS vakalarının %85'ini oluşturur. Konvansiyonel OS, spesifik hücre tiplerinin karakterlerine göre çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır (osteoblastik, fibroblastik, kondroblastik vb.). Bazı alt tipleri kendilerine özgü genetik yapı ve biyolojik davranışlar gösterse de moleküler temelleri hala tam olarak anlaşılamamıştır [40]. Diğer mezenkimal neoplazmlara benzer şekilde, OS'lerde hematojen yol ile metastaz yaparlar

ve asıl ölüm nedenleri; pulmoner metastazlarıdır. Bu özelliği ile epitel kanserlerden net bir şekilde ayrılırlar; insanlarda en sık görülen kanserlerin %95'i lenfatik yolla metastaz yaparlar [47].

OS hastaları, alt tipleri fark etmeksizin, klinikte aynı şekilde tedavi edilmektedir. 1970'lerden itibaren kemoterapötik kullanımı ve ameliyat tekniklerinin gelişmesiyle beraber uzun süreli sağkalımda yüksek oranlarda artış görülmesine rağmen son 40 yılda oranlarda değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 5). Çoğunlukla akciğer metastazı olan hastaların 5 yıllık sağkalım oranı çok düşüktür [40].



Şekil 5. Kemik tümörleri için 1975-2011 yılları arasında 5 yıllık sağkalım yüzdeleri
 ("Surveillance Research Program, National Cancer Institute" SEER*Stat software)

2.4.1. EPİDEMİYOLOJİ

2.4.1.1. İNSİDANS

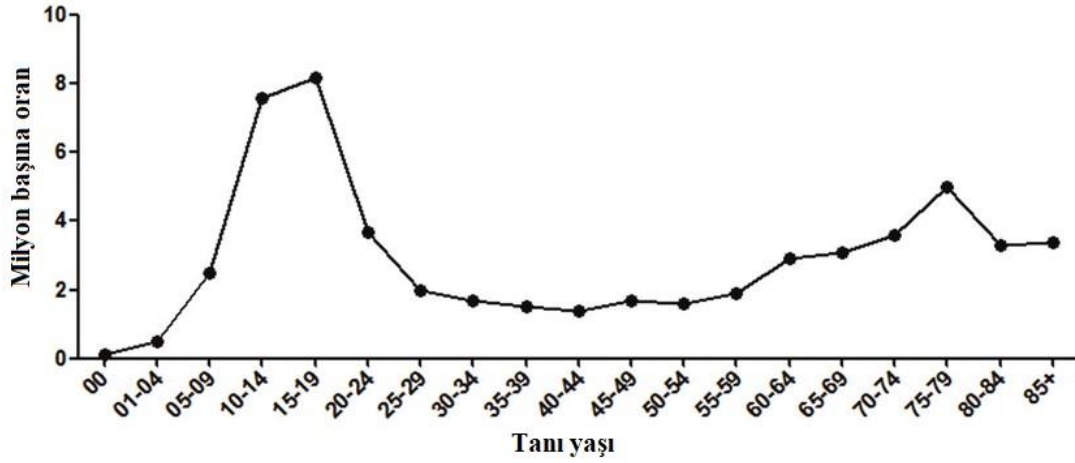
OS, yaygın görülen bir hastalık değildir (Tablo 6). Her yıl dünya çapında bir milyonda 3,4 vaka tanı almaktadır. Tanı alan vakaların yarısı çocuklar ve gençlerden oluşmaktadır. Ergenlik döneminde en sık görülen üçüncü malignite olup, 15 yaşın altındaki çocuklarda ise yılda bir milyonda 5,6 vaka tanı almaktadır [48]. Gençler bu hastalıktan en çok etkilenen gruptur, ancak herhangi bir yaştaki insanlarda da OS gelişebilir. Tüm OS'ların yaklaşık %10'u 60 yaş üzerinde görülmektedir.

Tablo 6. Kemik ve eklem tümörlerinin 2020 yılı için tahmini yeni vaka ve ölüm sayısı

Sıra	Malignite	Tahmini Yeni Vaka Sayısı (2020)	Tahmini Ölümler (2020)
1.	Meme kanseri	276.480	42.170
2.	Akciğer ve Bronş Kanseri	228.820	135.720
3.	Prostat Kanseri	191.930	33.330
4.	Kolorektal Kanser	147.950	53.200
5.	Melanoma	100.350	6.850
	-	-	-
29.	Kemik ve Eklem Tümörleri	3.600	1.720

2.4.1.2. YAŞ

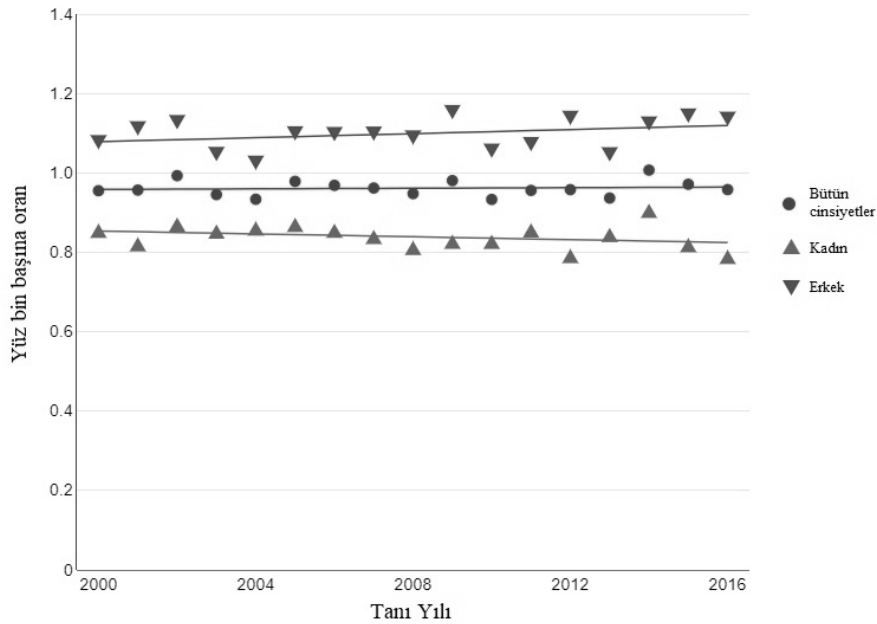
OS, 10-20 yaş arasındaki çocuklarda ve ergenlerde en sık görülen kemik tümörü iken 10 yaşından küçük çocuklarda Ewing Sarkomu daha yaygındır [49]. OS'de yaş dağılımı iki şekildedir; ilk pik ergenlik döneminde, ikinci pik ise yaşlı erişkinlerdedir (Şekil 6). OS, 5 yaşından küçük çocuklarda nadiren görülür, hastaların sadece %2'si bu gruptadır [50, 51]. İnsidans oranlarında, 5-10 yaş aralarında bir artış görülmekte ve 11-15 yaşları ile beraber bu oranlar gittikçe yükselmektedir. OS genel olarak 10-14 yaşları arasında ortaya çıkmakta ve ergenlik döneminden sonraki yaşlarda ise görülme sıklığı düşmektedir [52]. Ergenlik çağındaki bu artış, pubertal büyüme atılımıyla olan ilişkiyi göstermektedir. OS'nin ergen hastalarda büyümenin en aktif olduğu yerlerde oluşması, osteoblast aktivitesi ve tümörögenез arasında bir ilişki olduğunu akla getirmektedir [47]. OS insidansının ikinci zirvesi ise 65 yaşından büyük yetişkinlerde gözlenmekte olup, sekonder gelişen malignite olarak görülme olasılığı yüksektir (Paget hastalığı gibi) [52]. Türkiye Kanser İstatistikleri'ne göre; kemik tümörleri ülkemizde 0-14 yaş gruplarındaki erkek çocuklarda %4,6 , kız çocuklarda ise %4,4 oranında görülmektedir. 15-24 yaş gruplarındaki erkeklerde %7,7 , kadınlarda ise %3,1 oranında görülmektedir.



Şekil 6. Tanı yaşına göre OS insidansı

2.4.1.3. CİNSİYET

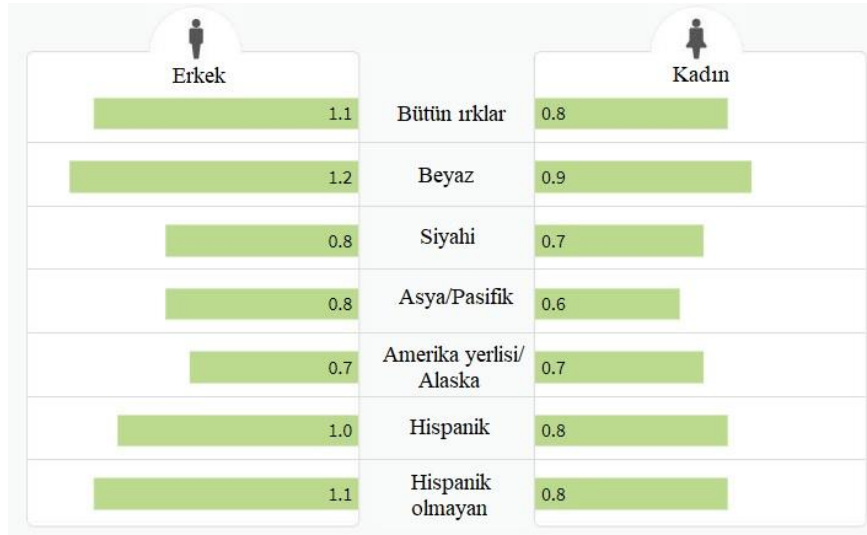
Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (National Cancer Institute; NCI) yürüttüğü bir program olan “The Surveillance, Epidemiology, and End Results” (SEER)'de yayınlanan istatistiklere göre, bütün cinsiyetlerde kemik ve eklem tümörlerinin insidans oranı 1/100.000 iken, kadınlarda bu oran 0,8/100.000, erkeklerde ise 1,1/100.000'dir. OS'nin görülme sıklığı kadınlara göre erkeklerde daha yüksektir (Şekil 7).



Şekil 7. Cinsiyetlere göre OS görülme insidansı

2.4.1.4. ETNİK KÖKEN

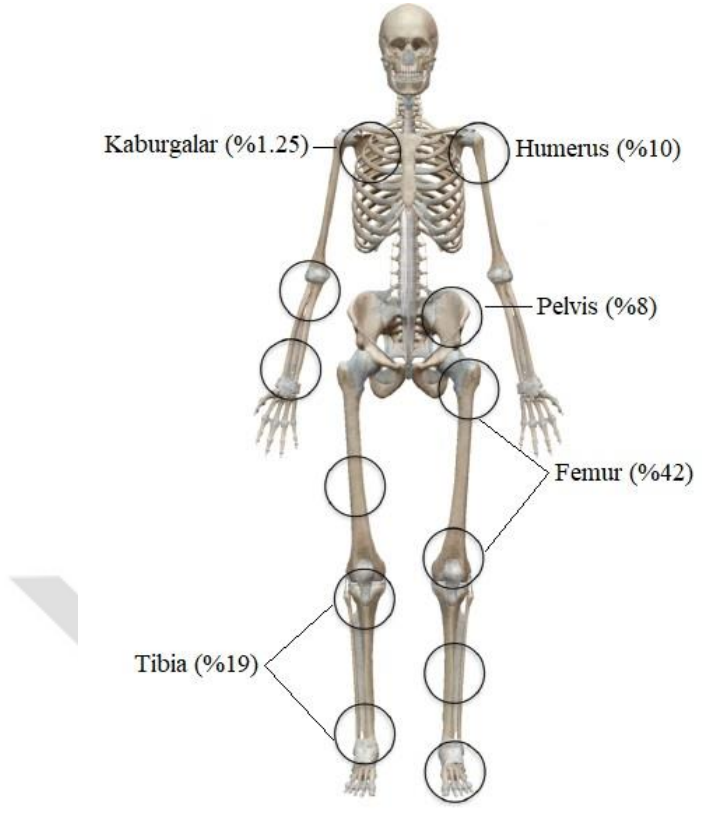
SEER'de yer alan 2012-2016 verilerine göre OS görülme sıklığı beyaz ve hispanik etnik kökenlilerde (sırasıyla 1,1/100.000 ve 0,9/100.000) göreceli olarak diğer etnik kökenlere göre daha yüksektir (Şekil 8).



Şekil 8. Etnik köken ve cinsiyete göre yeni vaka sayısı

2.4.1.5. TUTULUM YERİ

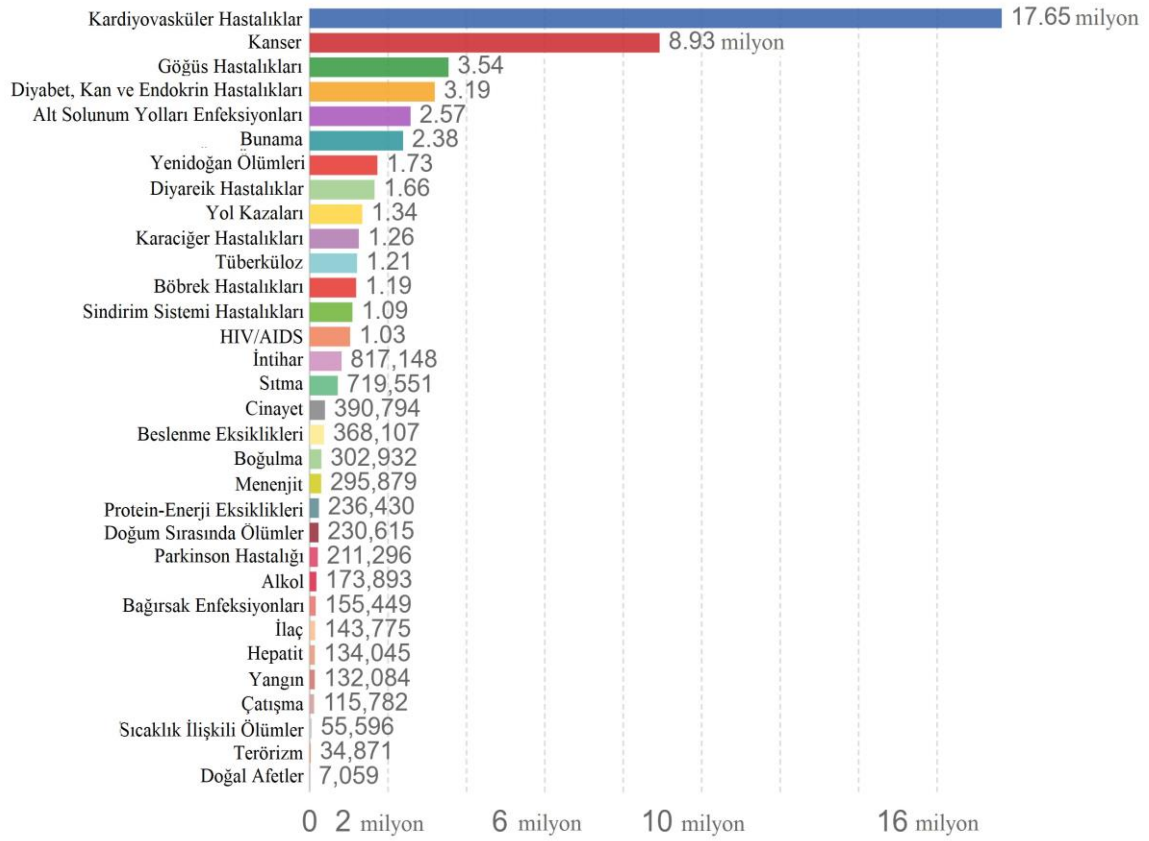
OS, çoğunlukla ekstremitelerdeki uzun kemiklerin metafiz büyüme plağı yakınlarında görülmektedir. Tümörlerin %42'sine femurda (%75'i distalinde), %19'una tibiada (%80'i proksimalinde) ve %10'una humerusta (%90'ı proksimalinde) rastlanılmaktadır. Bunların dışında, %8'i kafatası ya da çenede, %8'i pelviste ve çok düşük bir oranı ise kaburgalarda oluşur (Şekil 9) [53].



Şekil 9. Anatomik bölgelere göre OS tutulum yerleri

2.4.1.6. MORTALİTE

Dünya'daki ölüm nedenlerinin en önemlisi kalp ve damar hastalıklarıdır, kanser ise ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 10) [54]. Benzer şekilde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 'nın 2018 verilerine göre; dolaşım sistemi hastalıklarından sonra kanser %19,7 oranla ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde kanser, bütün ölümlerin altıda birini oluşturmaktadır (Tablo 7).



Şekil 10. 2018 yılı dünyadaki ölüm nedenlerinin dağılımı ve sayıları

	2017 ⁽ⁿ⁾		2018	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Toplam	423 878	100,0	421 164	100,0
Dolaşım sistemi hastalıkları	167 267	39,5	161 920	38,4
İyi huylu ve kötü huylu tümörler (benign ve malign neoplazmlar)	81 886	19,3	83 163	19,7
Solunum sistemi hastalıkları	50 224	11,8	52 568	12,5
Sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları	20 623	4,9	20 766	4,9
Endokrin (iç salgı bezi), beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar	20 219	4,8	20 074	4,8
Dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler	21 533	5,1	18 462	4,4
Diğer (enfeksiyon ve parazit hastalıkları, mental ve davranışsal bozukluklar, kas-iskelet sistemi ve bağ dokusunun hastalıkları vb.)	62 126	14,7	64 211	15,2

Tablo 7. 2017 ve 2018 yılında Türkiye'deki ölüm nedenlerinin dağılımı ve sayıları

Son 40 yılda OS hastalarının prognozunda önemli değişiklikler olmuştur; etkili kemoterapi ajanlarının geliştirilmesiyle metastatik hastalık ve mortalite insidansı azalmasına rağmen, hala hastaların %80'i pulmoner veya ekstra-pulmoner metastazlar sebebiyle kaybedilmektedir [55]. Akciğer metastazı olan hastaların çoğunda uzun süre klinik semptomlar görülmemektedir. Primer OS ve akciğer metastazı bulunan hastaların prognozu çok kötüdür ve 5-yıllık sağkalımı sadece %25'tir. Bu nedenle, OS hastalarında akciğer metastazı en önemli mortalite sebeplerinden biridir. OS hastalarında her bir metastatik akciğer lezyonunun mortaliteyi %43 oranında arttırdığı bildirilmiştir [56].

2.4.1.7. SAĞKALIM

1970'lerden önce OS tedavisinde, sadece etkilenen bölgenin cerrahi rezeksiyonu yapılmış ve hastaların çoğu metastatik lezyonlar sebebiyle hayatını kaybetmiştir [57]. Daha sonrasında ilk olarak metotreksat (MTX), sonrasında doksorubisin (DOX), sisplatin (cis-Pt) ve bleomisin gibi kemoterapötik ajanların kullanımı ile OS hastalarının sağkalımlarında yükselme sağlanmıştır. 1970'lerde ameliyat sonrası kemoterapötik ajanlarının kullanımı ile sağkalım %20'den %40'a, 1980'lerde ise ajanların çeşitli kombinasyonları ile sağkalım %60'lara kadar çıkmıştır [58].

Tümörün evresi, anatomik yeri ve boyutu, metastaz ya da nüks varlığı ve kemoterapiye yanıt sağkalımı etkileyen önemli faktörlerdendir. OS hastalarında sağkalımı etkileyen en önemli etken, erken tanıdır; erken evredeki hastalarda etkili kemoterapi ile sağkalım artmaktadır. Tümörün yerleşimi de sağkalım oranlarını etkilemektedir. Lomber omurga ve pelvisi tutulan hastalarda sağkalım oranı %32 iken, skapula ve omuz için %45, proksimal femur için %62'dir. En yüksek sağkalım oranları ise proksimal tibia (%78) ve distal femura (%73) lokalize olmuş tümörlerde görülmektedir. Primer OS hastalarında en düşük sağkalım kaburgaları tutan tümörlerde görülmektedir (%15). Hastaların yaşı da sağkalım üzerinde etkilidir; ileri yaştaki hastalar daha düşük sağkalım oranlarına sahiptir [49].

2.4.2. ETİYOLOJİ

Kemiğin primer tümörleri için bilinen, kesin bir etiyolojik faktör bulunmamaktadır. Kemikte tümör oluşumuna; çevresel faktörler ve genetik yapı bozuklukları etki etmektedir. Günümüzde OS gelişimi ile bağlantılı olduğu bilinen risk faktörleri; iyonize edici radyasyon, alkilleyici ajanlar, Paget hastalığı, kalıtsal

retinoblastom, Rothmund-Thompson sendromu ve ailevi Li–Fraumeni sendromudur [49].

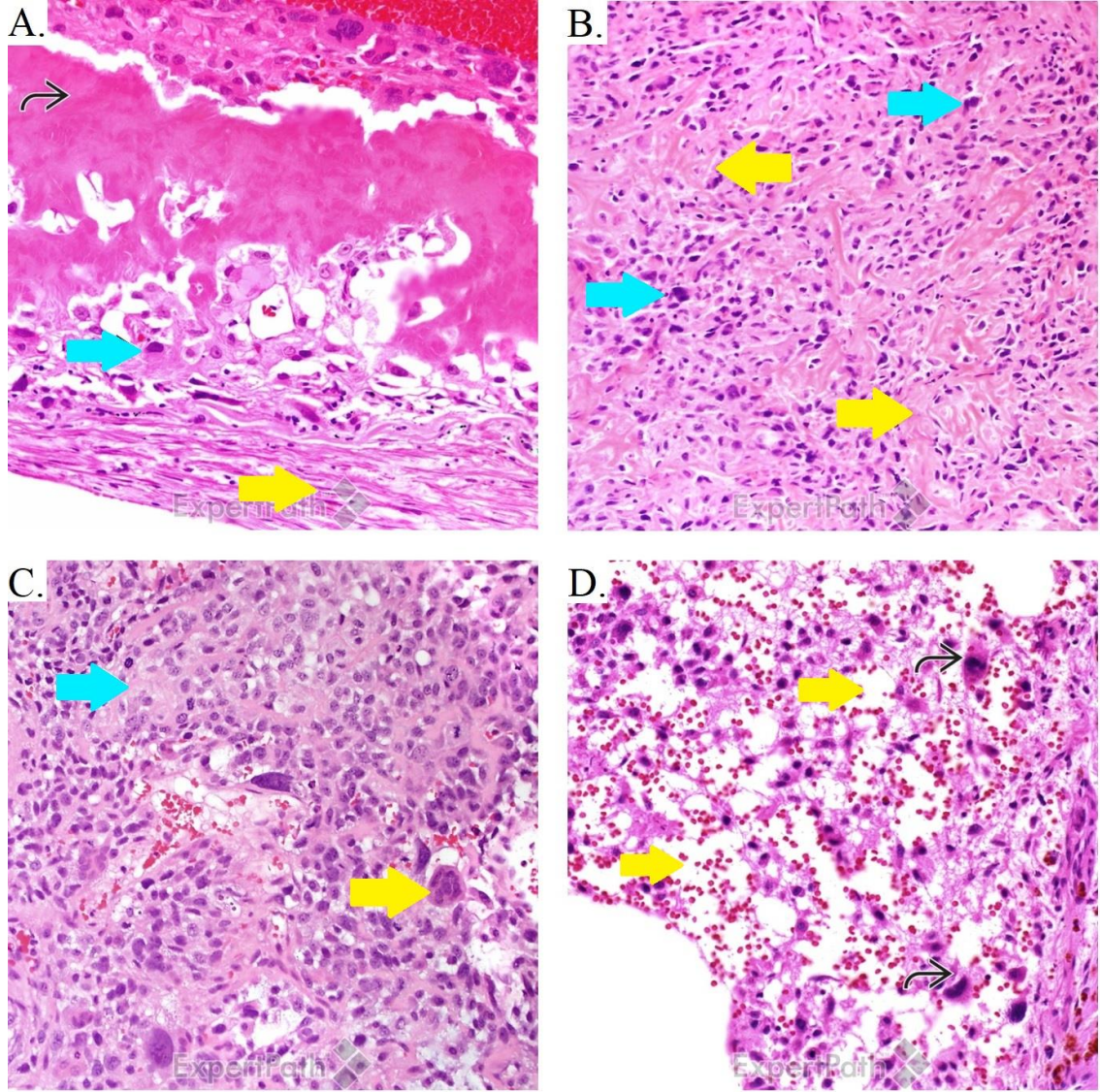
OS oluşumunda rol oynayan etiyolojik ajanlar ve hastalığı başlatıcı faktörler; iyonize edici radyasyon, alkileyici ajanlar (azot hardalları, siklofosfamid, fosfamid ve antrasiklinler), perinatal faktörler, virüsler ve travma hikayesi olarak sınıflandırılabilir [59]. Plütonyum, ağır metaller ve fizyon ürünleri gibi radyoaktif maddeler kemikte lokalize olma eğilimindedir ve biyolojik toksisiteleri tümör oluşturmaktadır. Finkel, Biskis ve Jinkins tarafından bulunduktan sonra FBJ olarak adlandırılan bir virüs, farelerde sarkom oluşmasına neden olmuştur ve son derece güçlü bir OS indükleyicisi olduğu gösterilmiştir [60]. FBJ virüsü dayanıklı bir virüstür ve sürekli olarak sadece kemikte tümör üretmektedir. Çok kez, seyreltilse bile, farelerin tamamında kemik tümörü oluşturmakta, aynı zamanda çoğunlukla kemik metastazına da yol açmaktadır [61]. OS oluşumunda rol oynayan, hasta özellikleriyle ilgili diğer faktörler ise; yaş, cinsiyet, etnik köken, büyüme ve boy, genetik-ailevi faktörler ve kemiğin var olan hastalıkları (Paget hastalığı, osteokondrom, Ollier hastalığı, fibröz displazi, kronik osteomyelit gibi)'dır [49].

2.4.3. HİSTOPATOLOJİ

OS tanısında prensip; kalsifiye doku, osteoid ya da kemiksi doku üreten sarkomatöz, iğ şekilli hücrelerin tanımlanmasıdır [62]. OS'ler genellikle anaplastik malign tümöral yapı göstermektedirler; epiteloid, plazmasitoid, fuziform, oval, küçük ve yuvarlak ya da dev hücreler şeklinde görülebirlirler. Hematoksilen-eozin (HE) boyaması ile histopatolojik olarak değerlendirilmesi; yüksek oranda kolajen tip I içeren yoğun, pembe, amorf ekstrasellüler hücre materyali olan osteoidlerin tanımlanması ile yapılmaktadır (Şekil 11-A) [63]. Osteoid üretimi tümörler arasında farklılık gösterebilmektedir. Kemik üretimi, malign kemiğe doğru itilen düzensiz malign hücre tabakaları şeklindedir. İncelenen tümör dokularında sıklıkla kanama ve nekroz görülmektedir, bu kötü prognozün işaretidir [62].

OS'lerde farklı diferansiyasyon spektrumları saptanmaktadır. Genellikle malign tümör hücrelerinde patognomonik osteoid birikiminin yanı sıra, kondroid ve fibroz alanlar gözlenir. Tipik bir OS; dev hücreler açısından zengin alanlar (dev hücreden zengin OS), kan içeren boşluklar açısından zengin alanlar (telanjiektatik OS) veya az osteoid üretimi yapan küçük hücreler (küçük hücreli OS) ile beraber görülebilmektedir

(Şekil 11-B,C,D) [64]. Bir tümörün alt tip olarak tanımlanması için ilgili diferansiyasyonun tümör alanının %50'den fazla görülmesi gerekmektedir. Osteokalsin, osteonektin, AT-zengin dizilere bağlanan protein-2 (SATB2) gibi osteoblastik farklılaşma belirteçleri, OS'yi taklit eden durumlarda tanının konulmasına yardımcı olmaktadır [65].



Şekil 11. (A) Yoğun osteoid (siyah ok), tümör hücreleri (sarı ok) ve çok sayıda malign hücre (turkuaz ok). (B) Eozinofilik osteoid (sarı ok) ve pleomorfik, malign stromal hücreli (turkuaz ok) konvansiyonel OS. (C) Stromada dev hücreler (sarı ok) ve osteoid (turkuaz ok). (D) Telanjiektatik OS'de büyük, atipik mitoz gösteren hücre (siyah ok), kan ve/veya hemosiderin içeren boşluklar (sarı ok) [66].

2.4.4. TANI

Hastalarda görülen en yaygın bulgu; lokal ağrıdır, tümörün küçük olduğu durumlarda ise çoğunlukla ağrı gözlenmemektedir. Tümör büyüyüp, kemik yapısını bozmaya başladığı zaman ağrıda da artış başlamaktadır. Ağrı, hareket ile kötüleşmekte, hasta dinlendiğinde ve geceleri de devam etmektedir. Yüzeye yakın tümörler büyüdükçe palpasyon ile doku kitlesi hissedilmekte fakat, derin tümörleri olan hastalarda bu durum tanının gecikmesine yol açmaktadır [67]. Tutulan kemikte ağrıyla beraber, şişlik ve eklem hareketlerinde kısıtlılık OS'nin diğer tipik semptomlarıdır. Özellikle osteolitik tümörlerde, nadir de olsa, patolojik kırıklar görülebilmektedir [68]. Sistemik semptomlar açısından bakıldığında, hastalık ileri evrelere gelmeden, ateş veya belirgin kilo kaybı bulguları gözlenmemektedir. Laboratuvar değerleri de OS tanısının konulması için yeterli değildir [67]. Biyolojik sıvılarda hastalığa özgü bir tümör belirteci bulunmamasına rağmen, perifer kanında artmış laktat dehidrogenaz ve alkalik fosfotaz seviyelerine rastlanılmaktadır [68].

Radyolojik görüntüleme yöntemleri, OS'nin tanı, tedavi ve takibinde en önemli rolü oynamaktadır. Şüpheli bir hastanın değerlendirilmesinde röntgen, ilk olarak kemik değişikliklerinin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. OS'lerde genellikle yeni kemik oluşumu ya da spikülden kaynaklanan, düzensiz kireçlenmelerin gözlemlendiği bir yumuşak doku bileşeni görülmektedir. OS'lerde tipik olarak aynı zamanda periost köşelerinde kalsifikasyon gelişmesi ve lezyonun agresif bir şekilde büyümesi sonucunda tümörün periostu yukarı kaydırması ile tümör ve sağlıklı dokular arasında "Codman üçgeni" olarak adlandırılan özel bir alan gözlenmektedir [69]. Başvuran hastaların %15'inde radyolojik olarak gözlenen, özellikle akciğerde metastaz bulgularına rastlanılmaktadır. Röntgen ile incelendiğinde, OS'yi düşündürecek bulguların bulunması sonrasında, tümörün daha iyi değerlendirilmesi ve metastaz varlığının araştırılması için gelişmiş nükleer tıp yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir [67]. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG); tümörün yumuşak doku bileşenlerinin, çevredeki doku, damar, sinirlerle olan ilişkisinin ve kemik iliğinin durumunu değerlendirmek için en iyi yöntemdir. Bununla beraber, toraksın bilgisayarlı tomografi (BT) ile incelenmesi ve teknesyum-99m (^{99m}Tc) iskelet sintigrafisi ile kemik taramasının yapılması diğer odak noktalarının bulunması ve metastaz değerlendirmesi için önemlidir [68].

2.4.5. PROGNOTİK ÖZELLİKLER

OS'de tanı ve prognoz, tedavi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Pozitif prognostik faktörler arasında; düşük gradlı tümörler, cerrahi sınır negatifliği ve kemoterapi sonrası $>90\%$ nekroz oranları sayılmaktadır. Negatif prognostik faktörler ise; özellikle aksiyal iskelette büyük tümörler, metastaz varlığı, ileri yaş ve Paget hastalığına sekonder gelişen OS'lerdir. Medüller kaviteden kaynaklanan tipik primer OS'nin prognozu; tümörün büyümesi, çoğalması, çevredeki dokulara invaze olması ve metastaz aşamalarını içermektedir. Konvansiyonel yüksek gradlı OS'lerde prognoz, kemoterapötiklerin kullanımı ile ciddi derecelerde iyileşmiştir. Metastatik OS (MOS) hastalarının prognozu sadece primer tümörü olan hastalara oranla daha ağır seyretmektedir. Bu hastalara genellikle metastazektomi için torakotomiler uygulanmaktadır [67]. MOS hastalarında 5 yıllık sağkalım oranı $\sim 25\%$ iken, metastazı olmayan OS hastalarında bu oran $\sim 70-80\%$ 'dir [70]. Parosteal ya da periosteal OS'ler gibi metastaza eğilimi az, düşük gradlı lezyonlarda 5 yıllık sağkalım oranı ise 90% civarlarındadır. Patolojik kırığı bulunan hastalarda lokal nüks riski artmaktadır ve 5 yıllık sağkalım oranı 55% 'tir. Primer tümör rezeksiyonundan sonra nüks gelişen hastalarda ise bu oran 15% 'lere kadar düşmektedir [67].

2.4.6. EVRELENDİRME

Ortopedik onkolojide tümör evrelendirmesinin amacı; hastanın tanı anında nüks, metastaz ve mortalite risklerinin değerlendirmesini standartlaştırmak ve özellikle sarkom gibi nadir görülen hastalıkların araştırılmasında kurumlar arası işbirliğini sağlamaktır [71]. Kemik tümörlerinin evrelendirmesinde iki farklı sistem kullanılmaktadır; Kas-İskelet Tümörleri Birliği (MSTS) evreleme sistemi ortopedi cerrahları tarafından geliştirilen orijinal sistemdir. Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) evrelemesi ise yeni verilere dayanarak, periyodik olarak güncellenen sistemdir (Tablo 8). Her iki sistemde de evrenin belirlenebilmesi için, öncelikle röntgen ve MRG ile tümörün tanımlanması ve yayılmanın görüntülenmesi gerekmektedir. Uzak odak noktalarındaki metastazın belirlenebilmesi için BT ve ^{99m}Tc taramaları değerlendirilmektedir [67].

Biyopsinin incelenmesi ile histolojik özelliklerinin belirlenmesi de evreleme için önemlidir. Artmış mitotik aktivite, nekroz, atipik hücreler, mikrovasküler invazyon ve yüksek hücre/matriks oranı, ileri evreler ve yüksek yayılım riski ile ilişkilidir. Klasik

intramedüller OS'ler yüksek gradlı kabul edilirken, yüzeysel OS'leri düşük gradlı kabul edilmektedir. Tümörün büyüklüğü ve yeri de tümörün agresifliği hakkında önemli bilgiler vermektedir. Diğer sarkomlarda olduğu gibi, OS de fasya, eklem kıkırdağı ve kapsülü, tendon ve tendon kılıfı gibi doku sınırlarını aşmama eğilimindedir. Fakat tümör yayılıp, anatomik doku sınırlarını aştıktan sonra, hızla büyüyen bir yumuşak doku kitlesini oluşturmaktadır [67].

Kas iskelet sistemi tümörlerini evrelendirme kavramı ilk olarak 1980 yılında Dr. William Enneking tarafından önerilmiştir [72]. Enneking cerrahi evreleme sisteminin amacı; hastalığın prognostik özellikleri, nüks ve metastaz riskini tanımlamak için basit bir sınıflandırma yöntemi oluşturmak, cerrahi tedaviler için özel yaklaşımları belirlemek ve tamamlayıcı tedaviler için bir kılavuz oluşturmaktır. Enneking sistemi kemik tümörlerini sınıflandırmak için üç faktörü değerlendirir; histopatolojik derece, lokal yayılım ve bölgesel veya uzak metastaz varlığı. İleri evre grubu, ağır hastalık süreci ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Kemik tümörlerine uygulanan Enneking evreleme sistemi genellikle MSTS evreleme sistemi olarak adlandırılmaktadır.

Enneking sistemi tümörleri 3 evreye ayırmaktadır. Evre I tümörleri; düşük gradlı ve yayılma riski az olan gruptur. Evre II tümörleri yüksek gradlı kabul edilir ve A - B olarak iki sınıfa ayrılmaktadır; evre IIA tümörleri kompartman içi, evre IIB tümörleri kompartman dışı tümörlerdir. Evre III tümörleri ise, birden fazla tümör odağı veya uzak metastaz olan tümörlerdir. Prognoz, tümörün evresi ile yakından ilişkilidir; evre I tümörleri en iyi sağkalım oranlarını göstermekteyken, sırasıyla evre IIA, IIB ve III en kötü prognoza sahiplerdir [73]. AJCC sistemi ise, evrelendirmeyi 4 grupta yapmakta ve TNM sistemini kullanmaktadır; T: tümörün büyüklüğünü, N: lenf nodu tutulumunu ve M: uzak metastaz varlığını göstermektedir. Temel olarak Enneking sistemi ile benzer unsurları içermektedir; evre I tümörleri düşük gradlı iken, evre II yüksek gradlıdır. Evre II tümörleri 8 santimetreden büyük veya küçük olmasına göre A ve B olarak sınıflandırılmaktadır. Evre III; birden fazla odağı olan yüksek gradlı tümörlerdir. Evre IV tümörleri ise uzak metastazları olan, akciğer metastazının A, lenf nodülleri veya diğer metastazların B olarak sınıflandırıldığı tümörlerdir (Tablo 8).

Tablo 8. Kemik tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılan sistemler

MSTS Evreleme Sistemi				AJCC Evreleme Sistemi					
Evre	Grad	Bölge	Metastaz	Evre	Tümör	Nodül	Metastaz	Grad	Tanım
IA	Düşük	Kompartman içi	-	IA	T1	N0	M0	G1 / GX	T1 düşük gradlı
IB	Düşük	Kompartman dışı	-	IB	T2 / T3	N0	M0	G1 / GX	T2 / T3 düşük gradlı
IIA	Yüksek	Kompartman içi	-	IIA	T1	N0	M0	G2 / G3	T1 yüksek gradlı
IIB	Yüksek	Kompartman dışı	-	IIB	T2	N0	M0	G2 / G3	T2 yüksek gradlı
III	Düşük / Yüksek	Kompartman içi / dışı	Var (Lokal / Uzak)	III	T3	N0	M0	G2 / G3	T3 yüksek gradlı
				IVA	T1 / T2 / T3	N0	M1a	G1 / G2 / G3	Akciğer metastazı
				IVB	T1 / T2 / T3	N1	M1a / M1b	G1 / G2 / G3	Lenf nodülü tutulumu
					T1 / T2 / T3	N0 / N1	M1b	G1 / G2 / G3	Kemik ya da uzak metastaz

T; tümör büyüklüğü, N; lenf nodülü, M; uzak metastaz ve G; grad'ı göstermektedir.

2.4.7. TEDAVİ

OS'nin tedavisi çoklu yaklaşımla, hem cerrahi hem de sistemik kemoterapiyi içermektedir. Yüksek gradlı bir hastanın tedavisi; 3 veya 4 sitotoksik ajandan (sisplatin, doksorubisin, metotreksat, ifosfamid) oluşan neoadjuvan kemoterapi, primer tümör ve metastazlar dahil olmak üzere tespit edilen bütün lezyonların cerrahi rezeksiyon sonrası adjuvan kemoterapi uygulamalarını içermektedir [74]. Neoadjuvan kemoterapi,

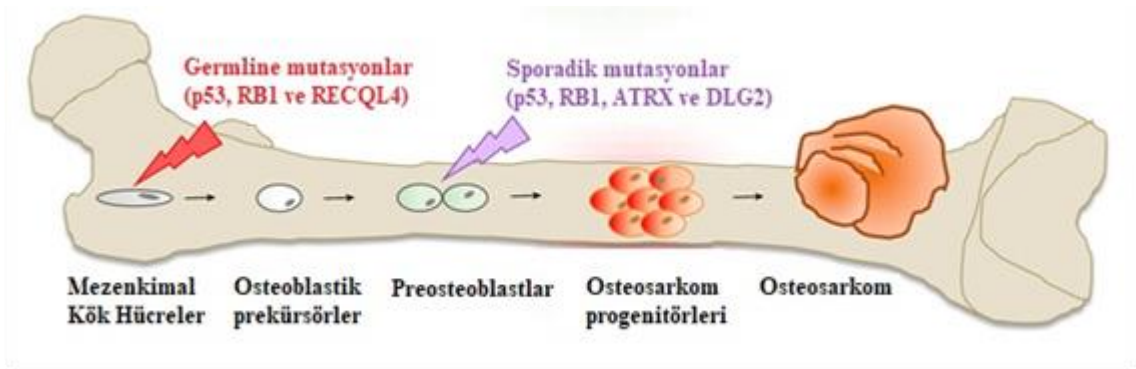
genellikle ameliyattan önce yaklaşık 8-10 hafta uygulanmaktadır. Rezeksiyon sonrası yaraların iyileşmesiyle beraber adjuvan kemoterapi ise 12-29 hafta sürmektedir [75]. Günümüzde OS için en iyi kemoterapi uygulaması hala tartışmalıdır. En çok kullanılan kemoterapötikler; yüksek doz metotreksat ile beraber, kurtarma tedavisi olarak folinik asit, doksorubisin (adriamisin), sisplatin ve ifosfamiddir. Vinkristin, bleomisin ve siklofosfamid gibi ajanlar da tedavi için tercih edilmektedir [67]. Düşük gradlı tümörler ise genelde sadece cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilmektedir. Akciğerlerinde ameliyatla alınabilecek metastatik lezyonları olan hastalara metastazektomi ve torakotomi uygulanmaktadır [67]. OS radyoterapiye dirençli tümör olarak kabul edildiği için radyasyon uygulamaları genellikle tercih edilmemektedir [75].

Mikrometastatik hastalığın tedavisi için sistemik kemoterapiyle beraber agresif ve geniş bir cerrahi girişim gereklidir. Mevcut cerrahi stratejiler, tümörle beraber sağlam dokularında bir kısmının çıkarılmasını içeren geniş eksizyonlardır [76]. Radyolojik görüntüleme tekniklerindeki ilerlemeler ve neoadjuvan kemoterapilerin olumlu etkileri, uygulanacak cerrahi yaklaşım için pozitif etkide bulunmuştur; günümüzde amputasyon yerine ekstremit koruyucu cerrahisi tercih edilmektedir. Hastaların %80'inde amputasyona oranla ekstremit koruyucu cerrahi rezeksiyonu yapılmaktadır [75].

2.5. OSTEOSARKOMUN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Hücre, birçok mutasyon geçirdikten ve bu mutasyonlar seçilimle kalıcı hale geldikten sonra malign özellik kazanmaktadır. Kanserlerde çok aşamalı tümörögenез modeline göre genomik değişimlerin birikimi, onkogenleri aktive ederek ve tümör baskılayıcı genleri (tumor suppressor genes; TSG) susturarak, hücre fonksiyonunda değişikliklere yol açmaktadır [77]. Epitel kökenli kanserlerinin aksine, OS'lerde çok aşamalı tümörögenез modeli gözlenmemektedir. Çocuklarda ve yetişkinlerde görülen düşük gradlı OS'ler, yüksek gradlı OS'lerin prekürsör lezyonları olarak sayılmamaktadır. Pediatrik malignitelerin birçoğunda olan premalign displazik lezyon ya da in situ karsinom tanımlarının eşdeğerleri OS'de bulunmamaktadır. OS'nin moleküler patogenezinin tanımlanması için yapılan analizlerde, tespit edilen ilk lezyon tamamen malign özelliğe sahiptir. Dolayısıyla, OS patogenezindeki basamakların ve moleküler özelliklerin tanımlanması oldukça zordur. Genetik olarak karmaşık olmasına rağmen, hayvan modelleri, etiyoloji, çevresel faktörler, genetik yatkınlık ve gen

çalışmaları OS oluşumu ile ilişkili süreçler ve genetik yollar hakkında çeşitli bilgiler vermektedir [78]. Günümüzde yapılan birçok çalışma, kalıtsal ya da sporadik OS'lerde hastalık fenotipine neden olan mutasyonların belirlenmesine odaklanmaktadır (Şekil 12). Tümör protein 53 (*TP53*), retinoblastoma (*RB1*), Werner sendromu ATP-bağımlı helikaz (*WRN*) ve RecQ benzeri helikaz 4 (*RecQL4*) genlerindeki mutasyonların OS'ye yatkınlık yarattığı düşünülmektedir [40].



Şekil 12. Osteosarkomagenezdeki genetik mutasyonlar [79]

RB1 geni; hücre döngüsünün negatif regülatörü olarak görev yapan bir TSG olup, hücrelerin S fazına girmesini engellemektedir. *RB1* genindeki fonksiyon kaybı kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır [80]. *RB1*'in germline mutasyonu ile ilişkili olan kalıtsal retinoblastomlu hastalarda sekonder maligniteler yaygındır ve bunların %40'ını OS oluşturmaktadır. Buna ek olarak, incelenen sporadik OS olgularının %29-47'sinde *RB1* geninde mutasyonlar saptanmıştır [81-83]. Bir başka TSG olan *TP53* geninde mutasyonlar germline veya sporadik olabilmektedir. *TP53* geninin germline mutasyonu sonucu oluşan Li-Fraumeni sendromunda da maligniteler görülmekte ve yaklaşık %10'ununda OS oluşmaktadır. OS'lerde *TP53* ile alakalı birçok değişiklik genellikle yapısal anomalileri, özellikle *TP53*'ün ilk intron bölgesinin translokasyonlarını içermektedir [78, 82]. *RecQL4* geninde mutasyon sonucu oluşan Rothmund-Thomson sendromunda da OS'ye rastlanılmıştır. Fakat sporadik OS vakaları incelendiğinde bu mutasyon nadir gözlenmiştir. Bu bulgu, OS patogenezinde *RecQL4* geninin rol oynamadığını göstermektedir [84]. *WRN* genindeki anomali ile ilişkili olan Werner sendromunda ise genetik instabilite ve maligniteye yatkınlık görülmektedir. Bu sendroma sahip hastalarda OS görülme oranı %10'dan azdır [85]. Bu genlerin dışında,

fare double minute 2 homologu (MDM2) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A)'nın yeniden düzenlenmeleri ile *PMP22-ELOVL5* gen füzyonu dahil olmak üzere yüzlerce genomik düzenleme tanımlanmıştır [79]. *MDM2*; p53 proteininin ubiquitinleme yoluyla aktivitesini düzenleyerek proteozomal degradasyonuna yol açmaktadır [86]. Düşük gradlı santral OS'lerde %29, parosteal OS'lerde %67-79 ve yüksek gradlı OS'lerde %12 oranında *MDM2* amplifikasyonu görülmektedir [87, 88].

Tüm sarkomlar, tekrarlayan kromozom translokasyonu içeren kompleks ya da göreceli basit karyotipe sahiptirler. Kompleks karyotipler ve az sayıda ortak genetik değişiklik gözlenmesi, osteosarkomageneze neden olan genlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır [78]. Parosteal OS hastalarında yapılan sitogenetik incelemeler, karyotiplerin bir veya daha fazla ring kromozom içerdiğini göstermiştir. Ring kromozomlar 12q13-15 bölgesinin amplifikasyonunu içermektedir ve bu tip OS'lerde yüksek oranda *MDM2* ile siklin bağımlı kinaz 4 (*CDK4*) amplifikasyonu görülmektedir [89, 90]. OS'lerde aynı kromozom bölgesinde yer alan *CDK4* ve *MDM2* genleri sıklıkla beraber amplifiye olmaktadır. *MDM2*, p53'ü ubiquitinleyerek proteozomal yıkımına yol açmaktadır. Düşük gradlı santral OS'lerin %25-30'u, parosteal OS'ların %85 ve yüksek gradlı OS'lerin yaklaşık %10'unda *MDM2* amplifikasyonu görülmektedir [91]. *CDK4* geni ise, Rb'yi fosforilleyerek inaktive etmektedir. *CDK4* amplifikasyonu parosteal OS'lerin %67'sinde görülmekteyken, yüksek gradlı OS'lerde nadirdir (%9) [82]. Konvansiyonel yüksek gradlı OS'ler ise, kompleks karyotipli, genetik olarak kararsız tümörlerdir. OS'ler tüm ya da kısmi kromozom kazancı veya kaybı ve somatik yapısal değişikliklerin gözlemlendiği kromozom instabiliteleri ile karakterizedirler [9]. Bir kromozomda konumlanmış olan birçok genin parçalanması ve rastgele birleşmesiyle oluşan bir genomik dengesizlik olan kromotripsis, birçok kanserde %2-3 oranında görülmesine karşın, insan OS örneklerinin %33'ünde gözlenmiştir [9, 92]. Son yapılan çalışmalar ise, OS'de kromotripsisin yaklaşık %90 oranında gözlemlendiğini ve beraberinde sıklıkla amplifikasyonların da eşlik ettiğini göstermiştir [93]. Tek nükleotid varyasyonlarının sebep olduğu lokalize hipermutasyon türü olan kataegis ise OS hastalarının yarısında görülmektedir [9, 79].

Çoğu kanserde olduğu gibi, OS'lerde de neoplastik transformasyon için gerekli genetik değişimlerin birikimi, tümörün oluşumu, büyümesi ve invazyonunda önemli rol oynamaktadır. Farklı yolaklardaki genetik anomaliler ve çeşitli fizyolojik

düzenlemelerin sonucunda OS'ler doğal sınırlarını aşarak metastaz yapmaktadır. Metastaz mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması için gen ekspresyonunu etkileyerek, tümör transformasyonunu destekleyen ve hücre proliferasyonunu arttıran çeşitli sinyal yollarının incelenmesi önemlidir. Hücre bölünmesi, büyümesi, yapışması ve hücre iskeleti oluşumu gibi önemli fonksiyonları düzenleyen gen ve proteinlerin, OS'nin invazyonu ve metastazı sırasında önemli roller oynadığı düşünülmektedir. Klinik olarak çok önemli olmasına rağmen, OS metastazının genetik ve biyokimyasal faktörleri hakkında bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu amaçla çalışmada metastazla ilişkisi olabileceği düşünülen farklı yollardaki anahtar genler seçilerek OS metastazındaki fonksiyonları araştırılmıştır.

2.6. SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ 3 (CDKN3)

CDKN3 geni, hücre döngüsünün mitotik fazında görev yapan siklin bağımlı kinaz 1 ve 2 (CDK1 ve CDK2)'yi defosforile eden tirozin fosfataz proteinini kodlamaktadır [94]. *CDKN3* geni 5q13.2 bölgesinde yer almakta ve 8 ekzon içermektedir. Kodlanan *CDKN3* mRNA'sı 906 nükleotitten meydana gelmekte ve 212 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bununla beraber, alternatif kesim ile farklı varyantlarının da bulunduğu gösterilmiştir [95-97]. *CDKN3*, mitoz ve G1/S fazının normal şekilde ilerlemesi için gerekli bir proteindir [98]. CDK1 ve CDK2 hücre döngüsünün önemli düzenleyicileridir ve aktiviteleri fosforilasyonlar ile kontrol edilmektedir. *CDKN3* proteini CDK1'i treonin (Thr)-161 ve CDK2'yi Thr-160 bölgelerinden defosforile etmektedir [94, 99]. *CDKN3* monomerik CDK2'yi defosforile ederken, siklin A CDK2'ye bağlanarak *CDKN3*'ün işlev yapmasına engel olmaktadır.

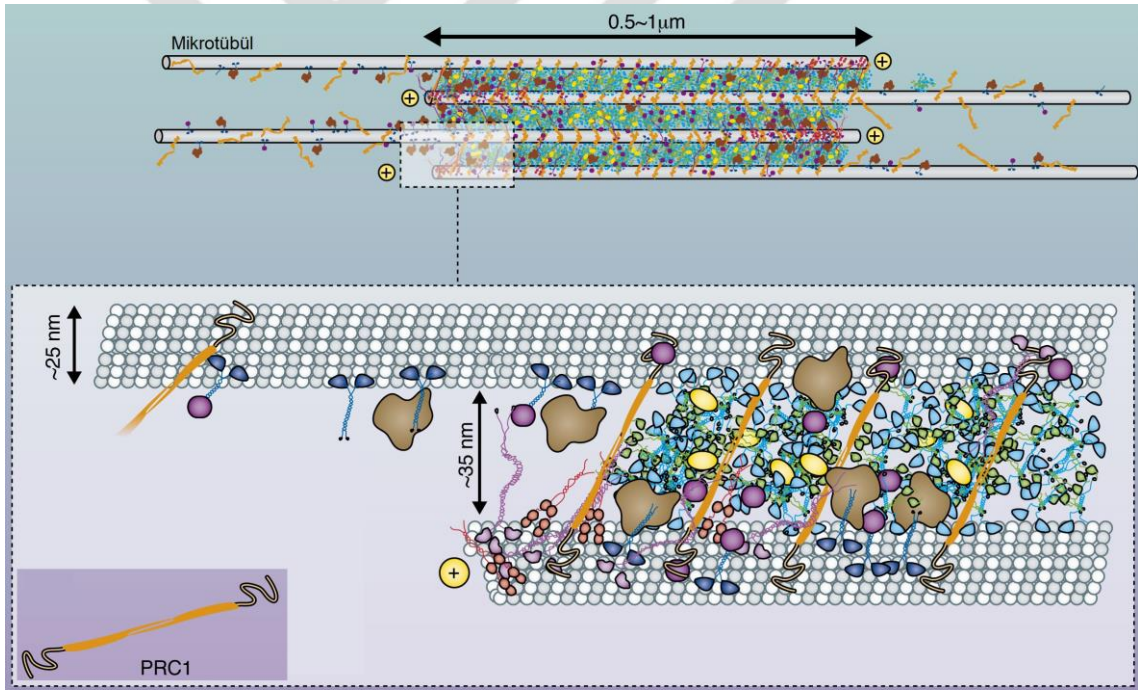
Hücre bölünmesi sırasında sinyalizasyon ağlarının etkileşimi önemlidir. Mitoz bölünme evrelerinde kontrol kaybı anöploidi ve tümör oluşumunu tetiklemektedir. Bu yüzden mitotik basamaklarda rol alan yapılar kanser tedavisinde kayda değer hedeflerdir [98]. *CDKN3* geninin ekspresyonu kanserlerde yükselmiştir ve kötü prognozun göstergesidir [94]. Fakat *CDKN3*'ün aşırı ekspresyonunun mekanizması ve *CDKN3* transkript varyantlarının kanserlerdeki rolü tam olarak açıklanamamıştır.

2.7. SİTOKİNEZİN PROTEİN DÜZENLEYİCİSİ 1 (PRC1)

Genom stabilitesinin korunması için en önemli basamaklarından biri, hücre bölünmesi sırasında sitokinezin bir düzen içerisinde ilerlemesidir [100]. Kromozomların birbirinden ayrılması ve boğumlanma bölgesinin organizasyonu mikrotübül (MT) motor

proteinleri (kinezin, dinein) ve MT-ilişkili diğer proteinler (uç bağlayıcı protein; EB1, nükleer mitotik apart proteini; NuMA) tarafında kontrol edilmektedir [101].

Sitokinezin başarılı bir şekilde devam ettirilmesine MT'lerden oluşan karmaşık ağ yapısı aracılık etmektedir [102]. Bu ağdaki önemli yapılardan biri PRC1 proteindir. PRC1 geni, 15. kromozomun uzun kolunda 26.1 bölgesinde bulunmakta ve 620 aminoasitlik PRC1 proteinini kodlamaktadır. PRC1, bölünme sırasında ekvator bölgesinde konumlanarak MT'lerin ve diğer proteinlerin birbirleriyle ve iğ iplikleriyle olan bağlantısını oluşturulmasını sağlamaktadır (Şekil 13) . PRC1 proteinleri birbirlerine antiparalel olarak bağlanarak MT filamentleri arasında organizasyonu sağlamaktadır. Böylece motor proteinler MT'ler boyunca hareket etmektedirler [100, 101].



Şekil 13. PRC1 proteininin antiparalel mikrotübül organizasyonundaki rolü

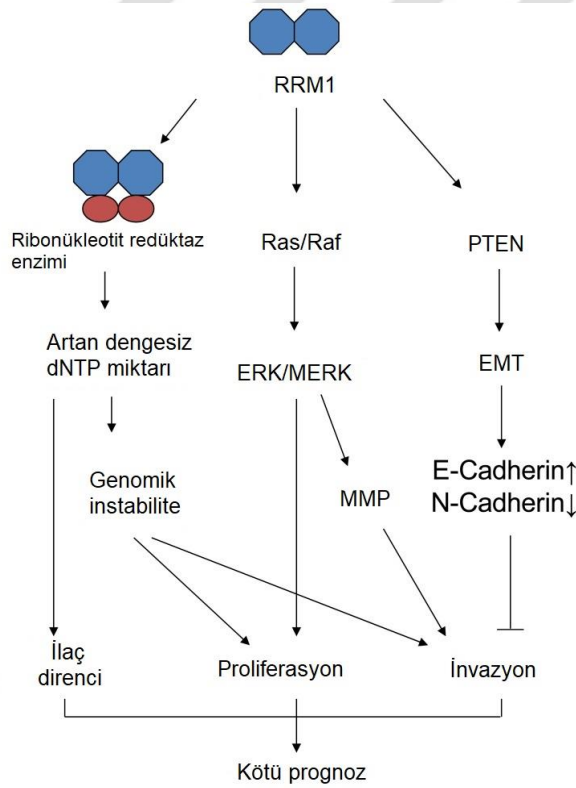
Sitokinez sırasında oluşan hatalar kromozom sayı ve yapılarında değişikliklere yol açarak hücrede kontrol kaybına neden olmaktadır. PRC1'in hücre bölünmesindeki rolü göz önüne alındığında, anormal ekspresyonu sitokinezde hatalara yol açarak, hücrenin kanserleşmesini tetiklemektedir [103]. PRC1 geninde kopya sayısı artışı, amplifikasyon ve transkripsiyon bozuklukları sonucunda artan ekspresyonu, çok sayıda

MT'nin bölünme plağında birikmesine sebep olarak diğer motor proteinlerin işlevlerini engellemektedir [104, 105].

2.8. RİBONÜKLEOTİT REDÜKTAZ KATALİTİK ALT ÜNİTESİ M1 (RRM1)

RRM1 geni ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere dönüşümünü katalize eden ribonükleotit redüktaz enziminin düzenleyici alt birimini kodlamaktadır [106]. 11p15.5 bölgesinden kodlanan *RRM1* geni, DNA hasarının onarımında nükleotid kesme-çıkarma onarım sisteminde görev yapan enzimi oluşturmaktadır. Aynı zamanda hücre çoğalması, hücre göçü, tümör ve metastaz gelişiminin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. *RRM1* enzimi aktivitesini kontrol eden aktif bir bölge ve nükleosit trifosfatları bağlayan allosterik bölgeyi içermektedir [107].

RRM1, kemoterapötik bir ajan olan gempitabinin hedefidir. DNA sentezi ve onarımı için gerekli olan *RRM1* geninin ekspresyon seviyelerindeki artışın, platin grubu kemoterapötik ajanlara ve gempitabine yanıtla ilişkili olduğu bulunmuştur [108-110]. Ayrıca, *RRM1* geninin akciğer kanserinde PTEN-ilişkili sinyal yollarıyla metastazı baskılayıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 14) [111].



Şekil 14. *RRM1*'in tümöröenezdeki rolü

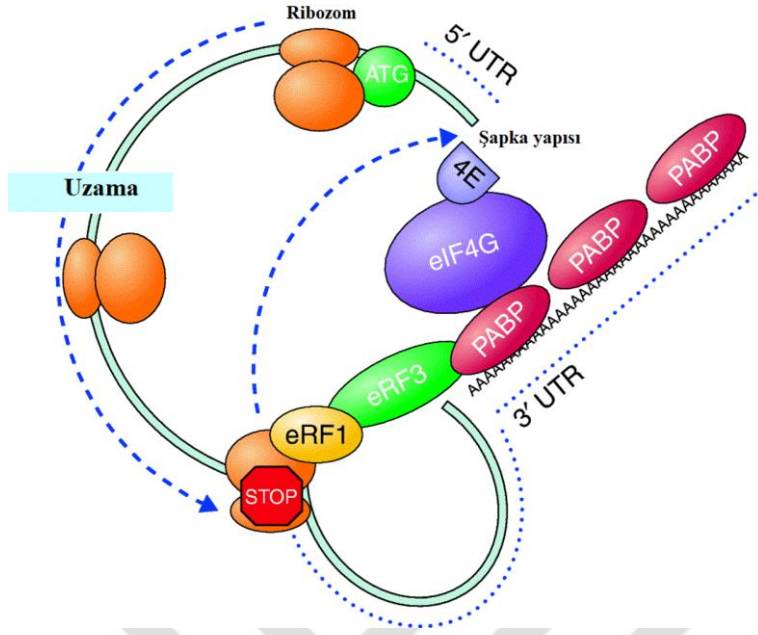
2.9. FİBULİN BENZERİ EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİN 2 İÇEREN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EFEMP2)

EFEMP2, aynı zamanda Fibulin-4 olarak da isimlendirilmektedir ve fibulin glikoprotein ailesinin bir üyesidir. Fibulinler; embriyonik gelişim, organogenez, hemostaz, tromboz, fibrojeniz ve doku homeostazı gibi çeşitli süreçlerde rol oynamaktadır. Ayrıca, hücrel membran reseptörleri ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girerek sinyal iletiminde görev yapmaktadır. Bu nedenle, hücre morfolojisi, büyümesi, adhezyonu ve ölümünü düzenleyen çeşitli yollarının aracısı olarak da işlev göstermektedir [112].

EFEMP2 proteini dört epidermal büyüme faktörü-2 alanı ve altı kalsiyum bağlayıcı alan içermektedir. *EFEMP2* geni elastik lif oluşumu ve bağ dokusu gelişimi için önemlidir ve ekstrasellüler matris stabilizasyonunda rol oynamaktadır. Genellikle kan damarları, kalp kapakçıkları, akciğer ve deri gibi elastik liflerden zengin doku ve organlarda bulunmaktadır [113]. *EFEMP2* kanser hücrelerinin proliferasyonunu uyarak onkogenik özellik göstermektedir. *EFEMP2* geninin artmış ekspresyon seviyeleri çeşitli malignitelerde kötü prognozün göstergesidir [114].

2.10. ÖKARYOTİK TRANSLASYON BAŞLATICI FAKTÖR 4 GAMA 2 (EIF4G2)

Protein sentezi hücrenin bulunduğu koşullara ve strese tepkisini belirleyen, bir düzen içerisinde ilerleyen süreçlerdir. Ökaryotik hücrelerde protein sentezinin başlatılmasında iki önemli mekanizma rol oynamaktadır; ilki 5' uca 7-metilganozin eklenmesi ile oluşan şapka yapısı ilişkili ve ikincisi ribozomun doğrudan mRNA'ya bağlanması ile oluşan şapka yapısı ilişkisizdir. Şapka yapısı ilişkili translasyonun başlatılmasında ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4A (EIF4A), ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E (EIF4E) ve ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4G (EIF4G) üçlü kompleks oluşturarak ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4F (EIF4F)'yi oluşturmaktadır [115]. Bu kompleks EIF4E aracılığıyla mRNA'nın 5' ucuna bağlanmaktadır. EIF4G, poli-A kuyruğuna yüksek affinite ile bağlanan poli-A bağlayıcı proteinle (PABP) etkileşmektedir (Şekil 15) [116].



Şekil 15. Translasyon başlatılması sırasında ökaryotik translasyon başlatıcı faktörlerin rolleri

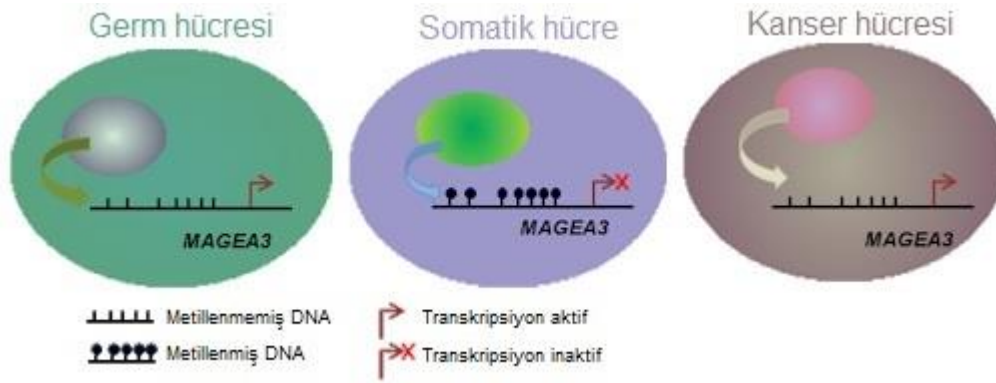
EIF4G, translasyon için gerekli faktörlerin bir araya gelmesini sağlayarak, translasyon mekanizması (EIF3 aracılığıyla) ve mRNA (EIF4E aracılığıyla) arasında köprü oluşturan proteinleri içeren ailedir [117]. Bu aile; EIF4G1, EIF4G2 ve EIF4G3 proteinlerini içermektedir. EIF4G ailesi, EIF4A ve EIF3 proteinleri ile homoloji göstermektedirler. EIF4G1 ve EIF4G2 bu ailedeki proteinlerin ilk ürünleridir, şapka yapısı ilişkili translasyonda görev almaktadırlar [118].

11. kromozomun kısa kolunun 15.4 bölgesinde konumlanan *EIF4G2* geninin ürünü, EIF4G ailesinden farklı olarak, translasyon sırasında inaktif kompleksler oluşturarak, translasyonun baskılanmasını da sağlamaktadır. mRNA translasyonu sırasında görev alan bu yapılarda meydana gelen anormal etkinlikler, hücrelerde malign dönüşümün oluşmasına öncülük etmektedir [119, 120].

2.11. MELANOMA İLİŞKİLİ ANTİJEN 3 (MAGEA3)

MAGEA3, büyük bir kısmı X kromozomunda yer alan 60'tan fazla genden oluşan bir ailenin üyesidir. Bütün MAGEA üyeleri MAGE homoloji bölgesine sahiptir. *MAGEA* ailesinin ekspresyonları hem hipermetilasyon hem de histon deasetilasyonuyla düzenlenmektedir [121]. *MAGEA3* geni X kromozomunun q28 bölgesinde yer alan

kanser/testis antijen genidir ve yetişkin somatik dokularda eksprese edilmeyen tümör antijenleridir (Şekil 16). Genel olarak MAGEA3 proteininin ekspresyonu yetişkin erkek germ hücreleriyle sınırlıdır. Tümörögenез ile beraber bu gelişimsel antijenler sıklıkla yeniden eksprese olmaktadır [122].



Şekil 16. *MAGEA3* gen ekspresyonunun metilasyon ile çeşitli hücrelerdeki düzenlenmesi

MAGEA3 normal dokular arasında sadece testis ve plasentada eksprese edilmektedir. Fakat melanoma, akciğer, meme, rahim ve mide kanseri gibi malign hücrelerde *MAGEA3* gen ve protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. *MAGEA3*'ün tümör hücrelerindeki işlevi tam olarak bilinmemektedir. Ancak, *MAGEA3*'ün hücrelerde apoptozu baskılayarak, hücreyi kanserleşmeye yönlendirdiği düşünülmektedir [123, 124].

Çalışmamızda hücre bölünmesinde rol oynayan *CDKN3* ve *PRC1*, hem hücre bölünmesinde hem de DNA tamirinde görev yapan *RRM1*, bağ dokusu gelişimi için gerekli olan ve kemik gelişimi için gerekli kalsiyum bağlayıcı alanlar içeren *EFEMP2*, protein biyosentezinde mRNA translasyonu mekanizmasında görev yapan *EIF4G2* ve çeşitli kanserler için tümör spesifik protein olarak değerlendirilen *MAGEA3* ekspresyon seviyeleri OS ve MOS hastaları arasında karşılaştırılmış ve genel sağkalım analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda iki hasta grubu arasında farkı en anlamlı olarak bulunan *PRC1* geninin hasta dokularındaki protein ekspresyon seviyeleri belirlenmiş, gen ve protein seviyesindeki değişimlerin kromozom artışı ya da azalışıyla bağlantısının belirlenmesi için 15. kromozomun sayısal anomalileri incelenmiş ve son olarak in vitro deneylerle OS hücre hattında (Saos-2) *PRC1* geninin anlatımı baskılanıp, hücre

döngüsü, canlılığı ve apoptozu üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda incelenen genin agresif tümör gelişimi ve metastazla olan bağlantısının gösterilmesi amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Faster SafeFAST Premium 218, Biyogüvenlik Kabini (Class IIA2) (Milan, İtalya)

Siemens AG KG56NVW30N/04, Buzdolabı (Münih, Almanya)

Julabo Pura 14, Su Banyosu (Seelbach, Almanya)

Hirayama HV-50L, Otoklav (Tokyo, Japonya)

Memmert ICO150med, Karbondioksitli İnkübatör (Büchenbach, Almanya)

Mini4K-10K, Mini Santrifüj (Hangzhou, Çin)

MPW MPW-260R, Soğutmalı Santrifüj (Varşova, Polonya)

Hanna HI2002-02 Edge, pH Metre (Rhoda Island, ABD)

Thermo Scientific Finnpiquette F1, Multichannel Pipet Seti (1 -10 µL, 30 - 300 µL) (Massachusetts, ABD)

Thermo Scientific Finnpiquette F2, Pipet Seti (0.2 - 2 µL, 1 -10 µL, 2 - 20 µL, 10 - 100 µL, 100 -1000 µL) (Massachusetts, ABD)

Thermo Scientific S1, Serolojik Pipetör (Massachusetts, ABD)

Isolab Neubauer Improved, Sayım Lamı (Wertheim, Almanya)

Carl Zeiss Primovert, Inverted Mikroskop (Jiangsu, Çin)

Zeiss Axio Observer Z1, Fluoresan Mikroskop (Jiangsu, Çin)

Cryopal Arpege 70, Sıvı Azot Hücre Tankı (Bussy-Saint-Georges, Fransa)

Thermo Scientific Compact, Dijital Rocker (Massachusetts, ABD)

Invitrogen Qubit 2.0, Fluorometre (Massachusetts, ABD)

Bio-Rad ChemiDoc, Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi (Kaliforniya, ABD)

Bio-Rad Trans-Blot Turbo, Blotlama Sistemi (Kaliforniya, ABD)

Bio-Rad PowerPac Basic, Elektroforez Güç Kaynağı (Kaliforniya, ABD)

Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra Cell, Dikey Elektroforez Yürütme Sistemi (Kaliforniya, ABD)

Bio-Rad T100 Thermal Cycler, PZR Cihazı (Kaliforniya, ABD)

Bio-Rad CFX Connect, Gerçek zamanlı PZR Cihazı (Kaliforniya, ABD)

Esco UUS 480A 1 5D SS, -80°C Dondurucu (Singapur, Singapur)

Thermo Scientific Drybath, Kuru Blok Isıtıcı (Massachusetts, ABD)

Roche Diagnostics BenchMark ULTRA, Otomatik Slayt Boyama Sistemi (Risch-Rotkreuz, İsviçre)

Isogen Life Science BioDrop µLITE+, Mikro Ölçüm Spektrofotometre Cihazı (De Meern, Hollanda)

BioTek Instruments Synergy H1 Hybrid, Spektrofotometre Cihazı (Vermont, ABD)

Merck Millipore Muse, Hücre Analiz Sistemi (Massachusetts, ABD)

3.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR VE TİCARİ KİTLER

RNeasy FFPE Kit (Qiagen, #74404, Hilden, Almanya)

Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, #R1054, Kaliforniya, ABD)

RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, #R1017, Kaliforniya, ABD)

FastGene 50bp DNA Ladder (Nippon Genetics, #MWD50, Dueren, Almanya)

SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline, #BIO-98005, Ohio, ABD)

Ham's F12 Medium:Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAN-Biotech, #41250, Aidenbach, Almanya)

McCoy's 5A (PAN-Biotech, #P04-05500, Aidenbach, Almanya)

L-Glutamin (PAN-Biotech, #P04-80100, Aidenbach, Almanya)

Penisilin-Streptomisin (PAN-Biotech, #P06-07100, Aidenbach, Almanya)

Fetal Sığır Serumu (PAN-Biotech, #P30-3306, Aidenbach, Almanya)

Trypsin- Etilendiamin tetraasetik asit (%0,25) (PAN-Biotech, #19100, Aidenbach, Almanya)

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PAN-Biotech, #53500, Aidenbach, Almanya)

Primocin (InvivoGen, #ant-pm-05, Toulouse, Fransa)

Dimetilsülfoksit (Neofroxx, #LC-5773.2, Einhausen, Almanya)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, #4368814, Massachusetts, ABD)

Tripan mavisi (Thermo Fisher Scientific, #15250061, Massachusetts, ABD)

RNaseZap (Thermo Fisher Scientific, #AM9782, Massachusetts, ABD)

Superfrost Ultra Plus Adhesion Slides (Thermo Fisher Scientific, #J3800AMNT, Massachusetts, ABD)

Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific, #154461, Massachusetts, ABD)

Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, #Q33211, Massachusetts, ABD)

Qubit Assay Tubes (Thermo Fisher Scientific, #Q32856, Massachusetts, ABD)

Aquarius Tissue Pretreatment Kit (Cytocell, #LPS 100, Cambridge, İngiltere)

Chromosome 15 Satellite Enumeration Prob (Cytocell, #LPE 015G, Cambridge, İngiltere)

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, #M5655, Missouri, ABD)

Ksilen (Sigma-Aldrich, #534056, Missouri, ABD)

Etidyum bromür (Sigma-Aldrich, #E1385-5ML, Missouri, ABD)

Hematoksilen (Sigma-Aldrich, #MHS80, Missouri, ABD)

Giemsa azur eozin metilen mavisi solüsyonu (Merck Millipore, #1092040100, Massachusetts, ABD)

Agaroz (Merck Millipore, #1012360100, Massachusetts, ABD)

ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool (Horizon Discovery, #D-001810-10-05, Waterbeach, Birleşik Krallık)

ON-TARGETplus Human PRC1 siRNA (Horizon Discovery, #L-019491-00-0005, Waterbeach, Birleşik Krallık)

DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Horizon Discovery, #T-2001-02, Waterbeach, Birleşik Krallık)

Muse Annexin V & Dead Cell Kit (Luminex Corporation, #MCH100105, Austin, ABD)

Muse Cell Cycle Kit (Luminex Corporation, #MCH100106, Austin, ABD)

TBE (EcoTech Biotechnology, #TBE500, Erzurum, Türkiye)

DNA yükleme boyası (EcoTech Biotechnology, #DLD-6xG, Erzurum, Türkiye)

RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz Biotechnology, #sc-24948, Teksas, ABD)

Anti-PRC1 (Abcam, #ab51248, Cambridge, Birleşik Krallık)

β -Actin Antibody (Cell Signaling Technology, #4967, Massachusetts, ABD)

PARP Antibody (Cell Signaling Technology, #9542, Massachusetts, ABD)

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, #7074, Massachusetts, ABD)

4–20% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (Bio-Rad, #4561093, Kaliforniya, ABD)

2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, #1610737, Kaliforniya, ABD)

2-Mercaptoethanol (Bio-Rad, #1610710, Kaliforniya, ABD)

10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad, #1610732, Kaliforniya, ABD)

Trans-Blot Turbo RTA Mini 0.2 μ m Nitrocellulose Transfer Kit (Bio-Rad, #1704270, Kaliforniya, ABD)

Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad, #1705062, Kaliforniya, ABD)

GangNam-STAIN Prestained Protein Ladder (iNtRON Biotechnology, #24052, Seul, Güney Kore)

ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, #760-500, Arizona, ABD)

EZ Prep (Ventana, #950-102, Arizona, ABD)

Reaction Buffer Concentrate (Ventana, #950-300, Arizona, ABD)

Cell Conditioning Solution (CC1) (Ventana, #950-124, Arizona, ABD)

Cell Conditioning Solution (CC2) (Ventana, #950-123, Arizona, ABD)

Amplification Kit (Ventana, #760-080, Arizona, ABD)

Bluing Reagent (Ventana, #760-2037, Arizona, ABD)

Metanol (ISOLAB Laborgeräte GmbH, #947.046, Wertheim, Almanya)

3.1.3. KULLANILAN SARF MALZEMELER

Mikropipet ucu, 10-200-1000 μ L (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

5-10-25 mL serolojik pipet (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

15-50 mL santrifüj tüpü (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

2 mL cryo tüp (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

1,5 mL mikrosantrifüj tüpü (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

0,2 mL PZR tüpü (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

T25-T75 flask (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

0,2 mL 96 kuyulu PZR plakası (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

12-24-96 kuyulu plaka (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

Plaka yapıştırma film (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

Parafilm (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)

0,2 μ m PES şırınga filtresi (Sartorius, Goettingen, Almanya)

3.2. YÖNTEMLER

Doktora tezi çalışması T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 04/04/2018 - 127711 tarihi ve sayısı ile onaylandı. T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Direktörlüğünden çalışma materyallerinin Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından temini için 16/03/2018 - 1757 tarihi ve sayısı ile uygunluk onayı alındı.

3.2.1. DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Çalışmaya 2014-2018 tarihleri arasında OS tanısı alan ve ameliyat olan 17 olgu dahil edildi. Araştırma için kullanılan örnekler tanı amacıyla yapılan patolojik incelemelerden sonra artan arşiv dokularıdır, seçilen olgulara ek girişim yapılmamıştır.

Örnekler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivi, formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş (FFPE) doku bloklarından, primer tümör dokusuna ait tümör alanları ve normal dokuya ait alanları temsil eden HE boyalı preparatlarla karşılaştırılarak alındı. Çalışmanın deneyleri; İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç Uygulama Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. FFPE DOKU BLOKLARINDAN RNA SENTEZİ

Çalışmaya seçilen olgulardan RNA izolasyonu RNeasy FFPE kiti (Qiagen) kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonuna başlamadan önce kesit almada kullanılacak olan mikrotom cihazının bıçağı değiştirilerek, bütün yüzeyler RNaseZap (Thermo Fisher Scientific) dekontaminasyon solüsyonu ile temizlendi. FFPE doku bloklarından 10 µm kalınlığında iki kesit alınarak, her örnek için kesitler 1,5 mL'lik tüplere aktarıldı. RNA'ların eldesi için aşağıdaki protokol izlendi;

- 1) Kesitlerin üzerine 1 mL ksilen eklenerek 10 sn hızlı ayarda vorteks yapıldı. Karışım 12000 x g'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 2) Pelletin üzerine 1 mL %99 etanol eklendi ve vorteks yapıldı. Karışım 12000 x g'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpün kapağı açık bırakılarak etanol uçana kadar (~10 dk) oda sıcaklığında bekletildi.
- 3) Pelletin üzerine 150 µL Buffer PKD ve 10 µL Proteinaz K eklendi, vorteks yapıldı ve 55°C'de 15 dk, 80°C'de 15 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası 320 µL Buffer RBC eklendikten sonra lizat karıştırıldı ve kitin içeriğinde yer alan gDNA Eliminator spin kolonlarına aktarıldı. Kolona aktarılan karışım 12000 x g'de 30 sn santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj sonrası kolon atıldı ve süzülen kısmın üzerine 720 µL %99 etanol eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı. Karışım, kitin içeriğinde yer alan RNeasy MiniElute spin kolona aktarıldı ve 12000 x g'de 15 sn santrifüj yapıldıktan sonra süzülen kısım atıldı.
- 5) Kolonun üzerine 500 µL Buffer RPE eklendi ve 12000 x g'de 15 sn santrifüj yapıldıktan sonra süzülen kısım atıldı. Bu basamak bir kere daha tekrar

edildikten sonra kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi ve boş bir şekilde 5 dk santrifüj edildi.

- 6) Son olarak kolon temiz bir tüpe yerleştirildi ve matriksin üzerine 22 µL DNase/RNase-free su ekledikten sonra 12000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

Elde edilen RNA'ların temizlenmesi için RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) kullanıldı. Bunun için ilk olarak her örneğe iki katı kadar RNA Binding Buffer ve sonrasında toplam hacmin miktarı kadar %100 etanol eklendi, pipet yardımıyla iyice karışması sağlandı. Karışım Zymo-Spin IIC kolonuna alındı ve 10000 x g'de 30 sn santrifüj edildi. Süzülen kısım atıldıktan sonra kolon önce 400 µL RNA Prep Buffer ve sonrasında 700 µL RNA Wash Buffer ile yıkanarak, her aşamada kolon 10000 x g'de 30 sn santrifüj edildi. Son aşamada kolon 400 µL RNA Wash Buffer ile 10000 x g'de 2 dk yıkandıktan sonra kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve matriksin üzerine 40 µL DNase/RNase-free su ekledikten sonra 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldı. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede saflıkları ve konsantrasyonları ölçüldükten sonra bir sonraki işleme kadar -80°C'de saklanıldı.

3.2.3. KOMPLEMENTER DNA (cDNA) SENTEZİ

cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak, önerilen protokole göre gerçekleştirildi. -20°C'de muhafaza edilen kitin içeriğindeki solüsyonlar buz üzerinde eritildi ve Tablo 9'da belirtilen miktarlar örnek başına hesaplanarak 2X RT master karışım hazırlandı. Buz üzerinde bekletilen master karışım vortekslendikten sonra 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 10 µL dağıtıldı. cDNA sentezi yapılacak her bir örneğin başlangıç RNA miktarı 100 ng olacak şekilde kuyulara eklendi ve toplam hacim 20 µL olarak ayarlandı. Son olarak plağın üstü yapıştırma filmi ile kapatıldı ve cihaza yerleştirilene kadar buz üzerine bekletildi. Cihaz programının adımları sırasıyla; 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 85°C 5 dk ve 4°C ∞ olacak şekilde ayarlandı. Sentezi biten örnekler bir sonraki adıma kadar 4°C'de saklandı.

Tablo 9. 2X RT master karışımının içeriği

<u>MALZEME</u>	<u>HACİM</u>
10X RT Buffer	2 µL
25X dNTP karışımı (100 mM)	0,8 µL
10X RT Random Primerler	2 µL
Ters Transkriptaz	1 µL
dH ₂ O	4,2 µL
<u>Son hacim 10 µL</u>	

3.2.4. GRADIENT POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE OPTİMİZASYON

Liyofilize olarak sentezi yaptırılan primerler (Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye) 100 µM ana stok olacak şekilde distile su (dH₂O) ile sulandırıldı, hazırlanan stoklar kullanıma kadar -20°C’de saklandı (Tablo 10). Çalışma stoğu forward (F) ve reverse (R) primerlerin dH₂O ile 1:10 oranında sulandırılması ile hazırlandı. Primerlerin bağlandığı sıcaklıkların belirlenmesi için her bir primere PZR reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım vortekslendikten sonra her bir primer için altı kuyuya 10 µL karışım dağıtıldı, üzerine 10 µL cDNA eklendikten sonra toplam hacim 20 µL olacak şekilde cihazın uygun programında sentez başlatıldı (Tablo 11).

Tablo 10. GZ-PZR için kullanılan primer dizileri

<u>GEN ADI</u>	<u>PRİMER DİZİLERİ</u>	<u>AMPLİKON BÜYÜKLÜĞÜ</u>
<i>PRC1</i>	F 5'-TAGACCACACCCCAGACACA-3' R 5'-GTGGCCACAGCTTCTCTTTC-3'	223 bp
<i>RRM1</i>	F 5'-ACTAAGCACCCCTGACTATGCTATCC-3' R 5'-CTTCCATCACATCACTGAACACTTT-3'	94 bp
<i>EFEMP2</i>	F 5'-AAGAGCCCGACAGCTACAC-3' R 5'-AGGGATGGTCAGACACTCGTT-3'	95 bp
<i>EIF4G2</i>	F 5'-AGGGGCTAAGCCAGCTCTAC-3' R 5'-CTGTCCCAGAGGTGGTGTTT-3'	242 bp
<i>MAGEA3</i>	F 5'-TCGGTGAGGAGGCAAGGTTC-3' R 5'-CGGGAGTGTGGGCAGGAG-3'	123 bp
<i>CDKN3</i>	F 5'-AGCTGCACATCTATCATC-3' R 5'-CACTGGTGGTTTCATTTC-3'	134 bp
<i>ACTB</i>	F 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' F 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	250 bp

Tablo 11. PZR için uygulanan termal protokol

<u>DÖNGÜ</u>	<u>SICAKLIK</u>	<u>SÜRE</u>	<u>İŞLEM</u>
1	95°C	2 dk	Ters transkriptaz inaktivasyonu
	95°C	30 sn	Denatürasyon
32	58,4-63,6°C	45 sn	Primer bağlanması
	72°C	30 sn	Uzama
	4°C	∞	

Sentez bittikten sonra %2'lik agaroz jel döküldü ve her kuyudaki örnek 6x DNA yükleme boyası (EcoTech Biotechnology) ile karıştırılarak 150 V 60 dk FastGene 50bp DNA Ladder (Nippon Genetics) ile beraber yürütüldü.

3.2.5. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR)

GZ-PZR gerçekleştirilmesi için son reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı (Tablo 12).

Tablo 12. GZ-PZR için karışım içeriği

<u>MALZEME</u>	<u>HACİM</u>	<u>SON KONSANTRASYON</u>
2X SensiFAST SYBR No-Rox Mix	10 µL	1 x
10 µM forward primer (F)	0,8 µL	400 nM
10 µM reverse primer (R)	0,8 µL	400 nM
dH ₂ O	6,4 µL	
cDNA	2 µL	
<u>Son hacim 20 µL</u>		

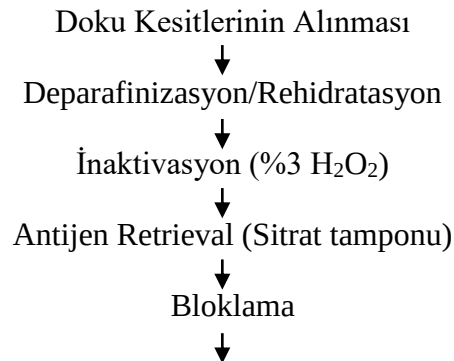
Karışım ve cDNA örnekleri 96 kuyulu PZR plağına dağıtıldıktan sonra cihaza yerleştirildi ve üç adımlı GZ-PZR ile floresan okuma gerçekleştirildi (Tablo 13).

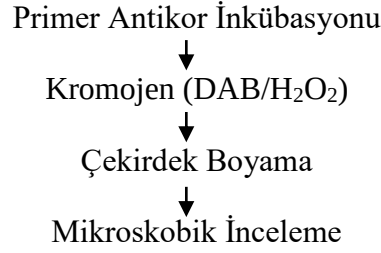
Tablo 13. GZ-PZR için uygulanan termal protokol (Üç adımlı GZ-PZR)

<u>DÖNGÜ</u>	<u>SICAKLIK</u>	<u>SÜRE</u>	<u>İŞLEM</u>
1	95°C	2 dk	Polimeraz Aktivasyonu
	95°C	5 sn	Denatürasyon
40	60-65°C	10 sn	Primer bağlanması
	72°C	15 sn	Uzama

3.2.6. İMMÜNOHİSTOKİMYA (İHK)

FFPE doku bloklarına gömülü örnekler mikrotom cihazı kullanılarak 2 µm kalınlığında kesildi ve pozitif yüklü lamaların üzerine yerleştirildi. Dokuların kuruması ve iyi yapışmasını sağlamak için doku kesitlerini içeren preparatlar 60°C'de en az iki saat bekletildi ve lamalar otomatik İHK slayt boyama cihazına yerleştirildi. Cihazın çalışma prosedürü ilkeleri kısaca Şekil 17'de özetlendi. İHK yöntemi için preparatlar ilk olarak cihaz tarafından EZPrep solüsyonu (Ventana) ile yıkandı ve sonrasında tris bazlı bir tampon olan Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (Ventana) ve hafif asidik pH'lı sitrat tamponu olan Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (Ventana) solüsyonları uygulandı. Sonrasında preparatlar %3 hidrojen peroksit solüsyonu içeren 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorür (DAB) inhibitörü (Ventana) ile 4 dk boyunca bekletildi ve PRC1 antikoru (Abcam) lamaların üzerine damlatılarak 1 sa 48 dk inkübasyon yapıldı. Boyamanın yoğunluğunu arttırmak için preparatlara 8 dk boyunca amplifikasyon kiti (Ventana) uygulandı ve ardından ProClin 300 ve protein tamponunda HRP işaretli antikor (<50 µg/mL) kokteyli içeren HRP Multimer (Ventana) ile 8 dk inkübe edildi. Preparatlar yıkandıktan sonra bir damla DAB Chromogen (Ventana) ve bir damla fosfat tampon solüsyonunda %0,04 hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren DAB H₂O₂ (Ventana) damlatılarak 8 dk inkübasyon yapıldı. Inkübasyon sonrası asetat tamponunda bakır sülfat (5 g/L) içeren solüsyon ile 4 dk bekletildi ve yıkama yapıldı. Preparatlar hematoxilen ile 16 dk inkübe edildikten sonra son olarak bluing reaktifi ile 4 dk bekletildi. Cihazdan alınan preparatlar deterjan ve sonrasında distile su ile yıkanarak üstleri lamel ile kapatıldı. İHK yöntemi için kullanılan DAB kiti, hedef hücrelerde antikor vasıtasıyla PRC1 antijeninin bulunduğu yerlerde renkli (kahverengi) bir reaksiyon ürününü meydana getirmektedir. Bu değişim ışık mikroskobu yardımıyla her bir olgunun HE boyalı preparatları ile karşılaştırılarak incelendi ve değerlendirildi.

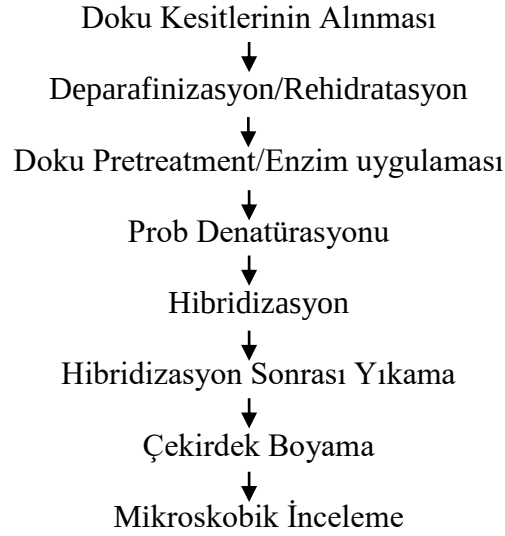




Şekil 17. İHK uygulama basamakları

3.2.7. FLUORESAN IN SITU HİBRİDİZASYONU (FISH)

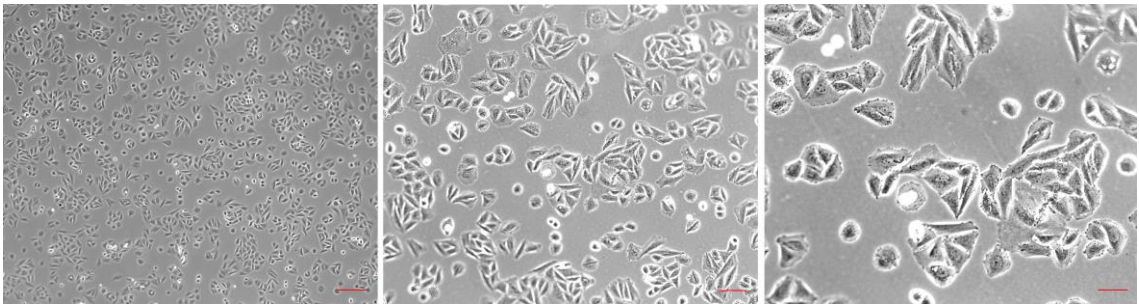
Olguların FFPE doku bloklarından 2,5 µm kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. FISH tekniğinin çalışma basamakları kısaca Şekil 18’de özetlendi. Deparafinizasyon işlemi için preparatlar 85°C ksilol içerisinde 30 dk bekletildikten sonra rehidratasyon için sırasıyla %100 ve %70 alkol serilerinden geçirildi. Preparatlar, 100°C’de ticari olarak satın alınan 500 mL Aquarius Tissue Pretreatment kiti (Cytocell) ile 35 dk muamele edildikten sonra preparatlar distile su ile üç kere 2 dk boyunca yıkandı. Daha sonra preparatların üstü 100 µL enzim ajanı ile kaplanarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra preparatlar distile su ile üç kere 2 dk boyunca yıkandı. Bu işlemlerden sonra her birinde 2 dk olacak şekilde sırasıyla %70, %85, %95 ve %100’lük alkol serisinden geçirildi. Preparatların kuruması ve probun ısınması için oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra preparatların üstüne 10 µL prob konuldu ve lamel ile kapatıldıktan sonra preparatların etrafı yapıştırıcı ile yalıtıldı. Preparatlar 75°C’de 5 dakika denatüre edildikten sonra, 37°C’de %95 nemli ortamda prob ile overnight hibridizasyona bırakıldı. Hibridizasyon sonrası yıkama işlemleri için preparatların üzerindeki lamel kaldırıldı ve 72°C’de 0,4x Salin sodyum sitrat (SSC) solüsyonunda 2 dk, ardından 2xSSC/%0,05 Tween 20 solüsyonunda 30 sn bekletildi. Preparatlar 1x Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra çekirdek boyanması için 1x 4’,6,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) solüsyonunda 10 dk bekletildi ve tekrar 1xPBS ile yıkanarak, üzerlerine 10 µL DAPI antifade konulduktan sonra lamel ile kapatılarak analize hazır hale getirildi. Her olgu için 15p11.1-q11.1 bölgesine özgü Chromosome 15 Satellite Enumeration Prob (Cytocell) kullanılarak boyanan preparatlar floresan mikroskopunda incelendi.



Şekil 18. FISH Uygulama Basamakları

3.2.8. IN VITRO ÇALIŞMALAR

Hücre kültürü çalışmaları için insan OS hücre hattı (Saos-2, ATCC) kullanıldı (Şekil 19). Hazır hücre hattının bilgileri Tablo 14’de özetlendi. Hücre hattını büyütülmesi için McCoy's 5A besiyeri, son konsantrasyonları %15 fetal sıgır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 100 µg/mL primosin olacak şekilde hazırlandı. Sıvı azottan çıkarılan Saos-2 hücre hattı 37°C’de su banyosunda çözöldükten sonra T25 flasklara alınan McCoy’s 5A besiyerinin üzerine pipet yardımıyla eklendi ve 37°C’de %5 CO₂, %95 nemli inkübatörde büyütöldü.



Şekil 19. Saos-2 hücre hattının faz kontrast mikroskopunda görüntüsü (sırasıyla x50, x100 ve x200 büyütme)

Tablo 14. Saos-2 hücre hattının özellikleri

	<u>Saos-2</u>
Kökeni	İnsan
Donör	11Y, Kız
Hücre tipi	Kemik
Hastalık	Osteosarkom
Morfoloji	Epitelyal, adherent

3.2.8.1. HÜCRE HATLARININ PASAJLANMASI VE SAKLANMASI

Hücrelerin gelişimi her gün invert mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu %80'in üzerine çıktığı zaman pasajlama yapıldı. Pasajlama işlemi için hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra üstlerindeki besiyeri serolojik pipet yardımıyla çekilerek atıldı ve flaskın yüzeyi 1x PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine % 0,25 tripsin / % 0,03 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu eklenerek inkübatör içerisinde 5 dk bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop yardımıyla kontrol edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin etkisini inhibe etmek için, eklenmiş tripsin/EDTA solüsyonun iki katı kadar FBS'li besiyeri yüzen hücrelerin üzerine eklenerek 15 mL'lik tüplere alındıktan sonra 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant serolojik pipetlerle çekilip atıldıktan sonra tüpün dibine çöken hücrelerin sayımı yapıldı.

Toplam canlı hücre sayımı yapılması amacıyla hemositometre (gelişmiş Neuer tipi) kullanıldı. İlk olarak hemositometre ve lamel etanol ile temizlendi. Hücreler lamın üzerine alınmadan önce, lamel hemositometrenin ortasına yerleştirildi. Seyreltme yapmak için hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne konuldu. 30 µL PBS ve 50 µL %0,4 tripan mavisi solüsyonu da tüpe eklendikten sonra hafifçe pipetaj yapıldı. 5 dk bekletildikten sonra, karışım pipet yardımıyla hemositometrenin dış kenarından hazneye aktarıldı. Lam mikroskoba yerleştirilerek 1 mm merkez karedeki bütün canlı hücreler sayıldı (Canlı olmayan hücreler mavi

boyanırken, canlı hücreler opak görülmektedir). Sayım lamının iki tarafı da kullanılarak sayım yapıldı ve her bir karedeki ortalama sayı belirlendi. Daha sonra aşağıdaki formüle göre toplam hücre sayısı hesaplandı;

$$\text{mL başına hücre} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

Kullanılmayacak hücrelerin dondurulması için hücrelerin içinde bulunduğu besiyerinin son konsantrasyonu %20 FBS, %10 dimetilsülfoksit (DMSO) olacak şekilde ayarlandı ve 1,5 mL içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde bölündü. -80°C 'de bir gece bekletilen hücreler daha sonra sıvı azot hücre tankına alındı.

3.2.8.2. TRANSFEKSİYON ÇALIŞMALARI

Transfeksiyon çalışmaları için ON-TARGETplus Human PRC1 siRNA (Horizon Discovery), ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool (Horizon Discovery) ve transfeksiyon reaktifi olarak DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Horizon Discovery) kullanıldı (Tablo 15). siRNA'lar liyofilize olarak temin edildikten sonra -20°C 'de saklandı. siRNA süspansiyonunun yapılması için, ilk olarak liyofilize siRNA'ları içeren tüpler santrifüj edildi. Daha sonra siRNA'lar $20 \mu\text{M}$ ana stok olacak şekilde dH_2O ile sulandırıldı ve 3-5 defa hafifçe pipetaj yapıldı. siRNA'ları içeren tüpler orbital karıştırıcıya konuldu ve oda sıcaklığında 30 dk karıştırıldı. Sulandırılan siRNA'ların konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçüldü ($1 \mu\text{M} = 13,3 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Ana stok siRNA'lar $5 \mu\text{M}$ olacak şekilde sulandırıldı ve -20°C 'de bir sonraki işleme kadar saklandı.

Tablo 15. Genlerin baskılanmasında kullanılan hedef diziler

<u>HEDEF</u>	<u>siRNA DİZİLERİ</u>
<i>PRC1</i>	ACAAAGAACUGAGGUGGUA GCACGUAAGCUGAACACUA CCGGAAAGCGCUGCAAUUA UAAAUCACCUUCGGGAAAU
Negatif Kontrol	UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGGUUUACAUGUUUUCUGA UGGUUUACAUGUUUCCUA

3.2.8.3. siRNA'LARININ TRANSFEKSİYONU

Saos-2 hücre hattı 3.2.8.1 başlığındaki protokoller izlenerek kültüre edildi ve tripsin/EDTA ile kaldırıldıktan sonra sayımları yapıldı. Hücre süspansiyonu antibiyotik içermeyen besiyeri ile hazırlandı. Sayım yapıldıktan sonra her kuyuya 100 µL antibiyotik içermeyen besiyerinde 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakaya ekim yapıldı ve bir gece CO₂'li inkübatörde bekletildi. Bütün transfeksiyon çalışmaları; transfeksiyon yapılmayan hücre (kontrol), negatif kontrol siRNA (siRNA-NK) ve siRNA ile transfekte edilen (siRNA-PRC1) hücreyi içerecek şekilde planlandı ve triplike olarak çalışıldı.

Ertesi gün kuyu başına 25 nM son konsantrasyon olacak şekilde siRNA'lar hazırlandı. Kuyu başına hazırlanan siRNA ve transfeksiyon reaktifi miktarları Tablo 16'da özetlendi.

Tablo 16. Transfeksiyon karışımının hazırlanması

<u>TÜP 1 (siRNA)</u>	<u>TÜP 2 (Transfeksiyon Reaktifi)</u>
5 µM siRNA 0,5 µL	DharmaFECT 1 0,2 µL
Serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri 9,5 µL	Serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri 9,8 µL
<u>Son hacim = 10 µL</u>	<u>Son hacim = 10 µL</u>

Tüp 1 ve Tüp 2 oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra, siRNA'lar (Tüp 1) transfeksiyon reaktifini içeren tüpe (Tüp 2) alınarak pipetaj yapıldı ve toplam 20 µL transfeksiyon karışımı oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Hücrelerin bir gün önceden ekildiği 96 kuyulu plaka inkübatörden çıkartıldı, üzerindeki besiyeri çekilerek atıldı. Kuyucukların üzerine 80 µL serum içeren, antibiyotik içermeyen besiyeri ve 20 µL transfeksiyon karışımı eklendi. Plaka tekrardan CO₂'li inkübatöre alınarak 48 saat bekletildi. Transfeksiyon işlemi sonlandırıldıktan sonra hücreler tripsin/EDTA ile toplanarak RNA ya da protein izolasyonu işlemine geçildi.

3.2.8.4. RNA İZOLASYONU VE GZ-PZR

Hücre hatlarından RNA izolasyonu için Quick-RNA Miniprep kiti (Zymo Research) kullanıldı. RNA'ların eldesi için aşağıdaki protokol izlendi;

- 1) Hücre kültürü flaskının yüzeyine yapışık halde bulunan hücreler tripsin/EDTA kullanılarak kaldırıldı ve hücre pelleti santrifüj ile çöktürüldükten sonra süpernatant atılarak hücreler 1xPBS ile yıkandı.
- 2) Hücre pelletinin üzerine 300 µL RNA Lysis Buffer eklendikten sonra vorteks yapıldı ve lizat 10000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant kitin içeriğinde yer alan Spin-Away Filter kolonuna alındı ve 10000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 4) Kolondan süzülen kısmın üzerine 300 µL %99 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Elde edilen karışım kitin içeriğinde yer alan Zymo-Spin IIICG kolonuna alındı ve 10000 x g'de 30 sn santrifüj edildi.
- 5) Kolon 400 µL RNA Wash Buffer ile yıkandıktan sonra DNaz I muamelesi için üzerine 80 µL DNaz I reaksiyon karışımı eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.
- 6) İnkübasyon sonrası kolonun üzerine 400 µL RNA Prep Buffer eklendi, 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldı, süzülen kısım atıldı. Daha sonra sırasıyla 700 µL ve 400 µL RNA Wash Buffer kolonun üzerine eklendi ve 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldıktan sonra süzülen kısım atıldı.
- 7) Son olarak kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve matriksinin üzerine 30 µL DNase/RNase-free su eklenildikten sonra 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldı. Elde edilen RNA'ların spektrofotometrede saflıkları ve konsantrasyonları ölçüldükten sonra bir sonraki işleme kadar -80°C'de saklandı.

Gen ekspresyonu analizi için 3.2.3. ve 3.2.5. başlıklarındaki protokoller izlendi.

3.2.8.5. TRANSFEKSİYON VERİMLİLİĞİNİN HESAPLANMASI

siRNA-PRC1 ve siRNA-NK kullanılarak transfeksiyon yapılan hücrelerde transfeksiyon verimliliğinin yüzdesi GZ-PZR analizi ile elde edilen kantifikasyon döngüsü (quantification cycle; Cq) değerleri kullanılarak hesaplandı (Tablo 17). Hesaplamalar için transfeksiyon çalışmalarında kullanılan markanın (Horizon

Discovery) teknik protokolü kullanıldı [125]. Baskılanan gen (*PRC1*) ve referans olarak *ACTB* geni kullanılarak normalizasyon yapıldı ve gen ekspresyon değerleri hesaplandı.

Tablo 17. Transfeksiyon verimliliğinin hesaplanması

<u>BASAMAK 1</u> Referansa göre normalizasyon	$\Delta Cq = Cq^{\text{hedef}} - Cq^{\text{referans}}$
<u>BASAMAK 2</u> Ekspresyonun üstel gösterimi	$\Delta Cq \text{ ekspresyonu} = 2^{-\Delta Cq}$
<u>BASAMAK 3</u> Ortalama ve SD'nin hesaplanması	
<u>BASAMAK 4</u> Negatif kontrole göre normalizasyon	
<u>BASAMAK 5</u> Transfeksiyon verimliliğinin hesaplanması	$\% \text{ verimlilik} = (1 - \Delta \Delta Cq) \times 100$

Tablo 17'de belirtildiği şekilde ilk olarak siRNA ile transfeksiyonu yapılmış hedef genin (*PRC1*) ekspresyonu, aynı örneğin referans genin (*ACTB*) ekspresyon seviyesi ile normalize edilerek delta-Cq değeri hesaplandı (Basamak 1). Daha sonra her replika için delta-Cq değerinin üstel ekspresyon değeri (Basamak 2), replikaların ortalaması ile standart sapma değerleri hesaplandı (Basamak 3). En son basamakta negatif kontrol ile transfeksiyon yapılan hücrelerin ifadesi ile hedef genin replikalarının ortalaması normalize edildi (Basamak 4). Transfeksiyon verimliliğinin yüzdesi normalize edilmiş değerden 1'in çıkarılması ve 100 ile çarpılması ile elde edildi (Basamak 5).

3.2.8.6. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ

Transfeksiyon sonrası hücre canlılığının belirlenmesi için MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] yöntemi kullanıldı. MTT testi için Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tozu (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp, 0.22 µm PES şırınga filtresinde geçirildi ve kullanılabilecek kadar -20°C'de bekletildi. siRNA-PRC1, siRNA-NK ve kontrol grupları için üç tekrar olacak şekilde 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlik deney grupları oluşturuldu. Testin uygulamasından bir

gün önce Saos-2 hücre hattı 96 kuyulu plakaya kuyu başına 100 µL antibiyotiksiz besiyerinde 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler inkübatörde bir gün inkübe edildikten sonra mikroskopta kontrolleri yapıldı ve transfeksiyon yapılacak gruplara 3.2.8.3 başlığındaki protokol izlenerek transfeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna ise sadece antibiyotiksiz besiyeri eklendi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübe edildikten sonra 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde inkübasyon süreleri tamamlanan plakalar inkübatörden çıkartılarak mikroskopta kontrolleri yapıldı, üzerlerine 20 µL önceden hazırlanan MTT reaktifinden eklendi. Karanlıkta inkübatörde dört saat bekletildikten sonra kuyuların üstleri boşaltıldı ve her kuyuya 150 µL DMSO eklendi. Plakalar oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra absorbans değerleri 490 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü. Ölçüm sonrası canlılık yüzdesinin hesaplanmasında; % Canlılık = $[100 \times (\text{Transfekte hücrenin absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ formülü kullanıldı.

3.2.8.7. APOPTOZ ANALİZİ

Transfeksiyon sonrası canlı, erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerin kantitatif analizi hücre analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Apoptotik hücrelerin dış membranlarındaki fosfatidilserinin (PS) tespit edilmesi için PS'ye yüksek afinitesi olan Annexin V kullanıldı.

Boyama için ilk olarak 24 kuyulu plakada transfeksiyon yapılan (siRNA-PRC1 ve siRNA-NK) ve transfeksiyon yapılmayan (kontrol) hücreler tripsin/EDTA kullanılarak yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu bir kere 1x PBS ile yıkandıktan sonra pelletin üzerine 100 µL 1x PBS ve 100 µL Muse Annexin V & Dead Cell kiti (Luminex Corporation) eklendi. Hafifçe vortekslendikten sonra karanlıkta, oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karışım cihazda okutuldu ve analiz edildi. Analiz sonucu dört hücre popülasyonu ayırt edildi; apoptotik olmayan hücrelerin boyaması Annexin V (-) ve 7-amino aktinomis D (7-AAD) (-), erken apoptotik hücrelerin boyaması Annexin V (+) ve 7-AAD (-), geç apoptotik ve ölü hücrelerin boyanması Annexin V (+) ve 7-AAD (+) şeklindedir. Bu boyanmalara göre toplam hücre konsantrasyonu ve yüzdesi belirlendi.

3.2.8.8. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Transfeksiyon sonrası hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazları kantitatif olarak hücre analiz cihazı kullanılarak analiz edildi. Kit içeriğindeki propidyum iyodür (PI) ve RNAz A reaktifleri hücrelerin boyanmasında kullanıldı. DNA boyanmasının spesifitesini arttırmak için RNAz ile beraber kullanılan PI ile DNA içeriğine bağlı olarak hücre döngüsünün farklı aşamalarının birbirinden ayırt edilmesini sağlandı.

Boyama için ilk olarak 24 kuyulu plakada transfeksiyon yapılan (siRNA-PRC1 ve siRNA-NK) ve transfeksiyon yapılmayan (kontrol) hücreler tripsin/EDTA kullanılarak yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu bir kere 1x PBS ile yıkandıktan sonra pelletin üzerine vorteks yardımıyla taze hazırlanmış soğuk 1 mL %70 etanol damla damla eklendi ve hücreler fiksasyon için -20°C'de altı saat bekletildi. İnkübasyon süresi sonrasında süspansiyon 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi,, süpernatant atıldı ve üzerine 100 µL PBS eklenerek bir kere yıkama yapıldı. Yıkama sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 200 µL Muse Cell Cycle Reagent (Luminex Corporation) eklendi ve hafifçe vortekslendikten sonra karanlıkta, oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karışım cihazda okutuldu ve analiz sonucunda DNA içerik profili ve popülasyon profili elde edildi.

3.2.8.9. PROTEİN İZOLASYONU VE WESTERN BLOT

Western blot yöntemi için ilk olarak transfeksiyon yapılan (siRNA-PRC1 ve siRNA-NK) ve transfeksiyon yapılmayan (kontrol) hücrelerden protein izolasyonu yapıldı. siRNA ile transfekte edilen hücreler transfeksiyon karışımıyla 96 saat boyunca inkübe edildi ve daha sonra tripsin/EDTA ile yapıştıkları yüzeyden toplanarak santrifüj edildi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra çöken hücrelerin üstüne 1×10^6 hücre için 500 µL RIPA liziz tamponu (Santa Cruz) olacak şekilde solüsyon eklendi ve 5 dk boyunca 3 kere vorteks yapıldıktan sonra -80°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün 4°C'de 12000 x g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatant toplandı. Toplanan süpernatantlardaki protein miktarı fluorometre ile tayin edildi.

Kuyu başına 50 µg protein olacak şekilde örneklerin hazırlanması için β-merkaptöetanol ile hazırlanan 2XLaemmli Buffer (Bio-Rad) örneklerle 1:1 oranında karıştırılarak vortekslendi ve 95°C'de 5 dk bekletildikten sonra örnekler buzun üzerine

alındı. Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için %4-20’lik jeller iç kısımları birbirine bakacak şekilde tanka yerleştirildi ve kuyular içinde baloncuk kalmayacak şekilde pipetaj yapılarak yıkandı. İki jel için yaklaşık 700 mL soğuk 1x running buffer tanka eklendikten sonra ladder ve örnekler kuyulara yüklendi. SDS-PAGE için örnekler 50V’da 30 dk, 100 V’da 150 dk yürütüldü.

Örneklerin membrana transferi için ilk olarak polivinilidin diflorür (PVDF) membran %100 metanolde 2 dk bekletilerek aktive edildi. Daha sonra 2 dk distile su ile yıkandı. 5x transfer buffer metanol ve dH₂O ile sulandırılarak hazırlandı. Membran en son transfer buffer içeren kaba alındı. Transfer kasetinin içine sırasıyla transfer buffer ile ıslatılmış filtre kağıdı, aktive edilmiş membran, jel ve en üste tekrar ıslatılmış filtre kağıdı konulduktan sonra blotlama cihazında 1,3A ve 25V’da 10 dk blotlama yapıldı. Proteinlerin membrana transferi sonrası membran ilk olarak transfer buffer içeren kaba alınmış daha sonra sırasıyla dH₂O ve 1x Tris tampon tuzu ve %0,1 Tween 20 (TBST) solüsyonunda 5 dk yıkandı.

Membran bloklaması için taze hazırlanmış 1x TBST içerisinde %5 süt tozu içeren blocking karışımıyla gece boyunca 4°C’de hafif sallanacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran 5 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe sallanarak yıkandı. Antikor inkübasyonu için %5’lik süt tozu içerisinde primer antikor içeren (Anti-PRC1, Anti-PARP, Anti-Beta Aktin) karışımlarla hafifçe sallanacak şekilde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra membran 5 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe sallanarak yıkandı. En son olarak %5’lik süt tozu içerisinde sekonder antikor içeren karışım ile hafifçe sallanacak şekilde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra membran 5 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe sallanarak yıkandı. Membranın kemilüminesans görüntülemesi için 1:1 oranında hazırlanan Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad) ile 3 dk inkübasyon yapıldı ve UV maruziyeti sonrası görüntülemesi gerçekleştirildi.

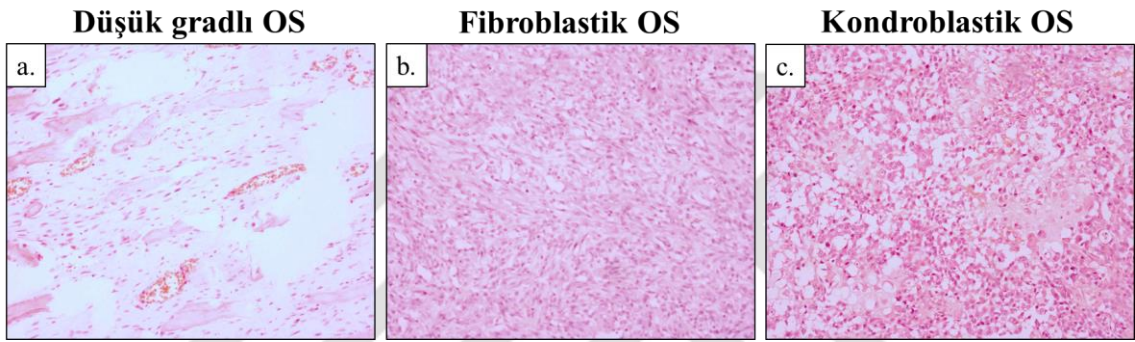
3.3. İSTATİKSEL ANALİZLER

Yapılan analizlerin istatistiksel değerlendirmeleri %95 güven aralığında, bağımlı ve bağımsız iki grup için T testleri (Paired, Unpaired) ve Mann Whitney-U testi kullanılarak, çoklu grup karşılaştırmaları için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde parametrik çoklu karşılaştırma testleri (Tukey, Dunnet ve Sidak metotları) uygulandı. Sağkalım eğrisi Kaplan-Meier yöntemi ile hesaplanarak, eğrilerin karşılaştırılması için log-rank (Mantel-Cox) testi gerçekleştirildi. Birbirinden bağımsız triplike olarak yapılan deneylerin verileri ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak gösterildi. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. Grafiklerde anlamlılık değerleri; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ şeklinde gösterildi. İstatistiksel değerlendirmeler ve çizimler için GraphPad Prism 8 for macOS Version 8.4.3 (GraphPad Software, ABD) programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. OLGULARA AİT DEMOGRAFİK BİLGİLER

Doktora tez çalışmasına dahil edilen olguların normal ve tümör doku örnekleri, T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden alınan FFPE doku blok kesitlerinden elde edildi. Olguların normal ve tümör doku bloklarının seçimi HE boyalı lamaları ile karşılaştırılarak yapıldı (Şekil 20).



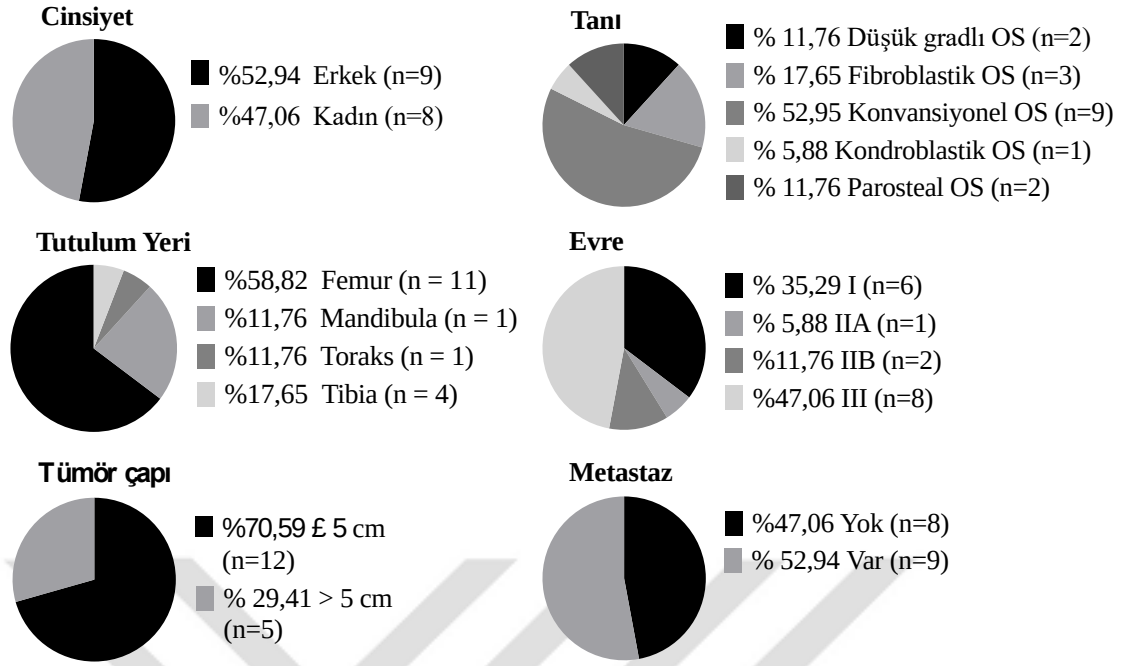
Şekil 20. (a) OS1, (b) OS7 ve (c) OS14 olgularına ait HE boyama örnekleri (x100 büyütme)

İncelenen olgular (n=17) iki alt sınıfa ayrıldı; OS grubu (n=8); histopatolojik olarak OS tanısı konmuş, ortalama 32 ay takipte metastazı gelişmemiş olan OS hastaları, MOS grubu (n=9) ise; MRG ve/veya BT gibi görüntüleme metodları ile görüntülenmiş akciğer metastazına sahip olan metastatik OS hastalarıdır. Kemik tümörlerinin evrelemesi Enneking sistemine göre yapıldı. Çalışmada kullanılan olgulara ait veriler Tablo 18’de özetlendi.

Tablo 18. Olguların genel bilgileri

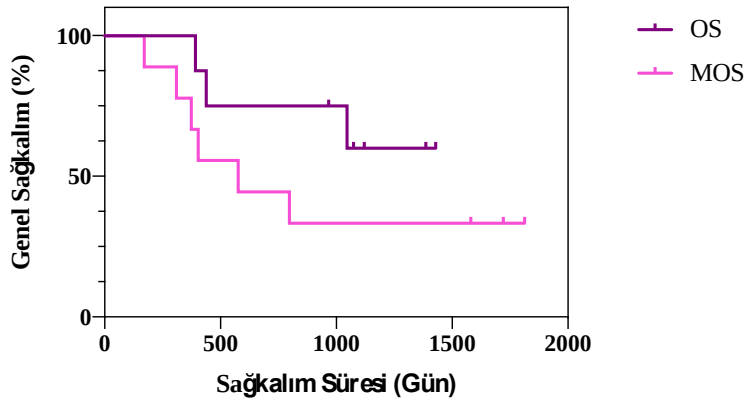
Olgu No	Yaş, Cinsiyet	Operasyon Tarihi	Ölüm Tarihi	Tutulum Yeri	Tanı	Evre	Tümör Çapı	Metastaz
OS1	15, K	12/01/2017	-	Femur distal	Düşük gradlı santral	I	≤ 5 cm	Yok
OS2	26, E	06/01/2017	18/11/2019	Mandibula	Fibroblastik OS	IIB	≤ 5 cm	Yok
OS3	17, K	25/01/2017	01/02/2018	Femur distal	Konvansiyonel OS	I	≤ 5 cm	Yok
OS4	29, E	12/02/2016	-	Femur distal	Fibroblastik OS	III	≤ 5 cm	Var
OS5	18, E	27/02/2015	04/05/2017	Femur distal	Konvansiyonel OS	III	≤ 5 cm	Var
OS6	27, E	12/03/2015	19/04/2016	Femur distal	Konvansiyonel OS	III	≤ 5 cm	Var
OS7	28, E	07/03/2018	-	Tibia proksimal	Fibroblastik OS	I	≤ 5 cm	Yok
OS8	43, E	26/03/2015	03/04/2016	Femur proksimal	Konvansiyonel OS	IIB	≤ 5 cm	Var
OS9	17, K	18/04/2017	21/02/2018	Göğüs duvarı	Konvansiyonel OS	III	> 5 cm	Var
OS10	14, K	21/05/2015	01/08/2016	Femur distal	Konvansiyonel OS	IIA	≤ 5 cm	Yok
OS11	17, E	01/07/2016	-	Tibia proksimal	Konvansiyonel OS	III	> 5 cm	Var
OS12	43, E	05/09/2014	03/04/2016	Femur distal	Konvansiyonel OS	III	> 5 cm	Var
OS13	18, K	12/11/2015	-	Femur distal	Konvansiyonel OS	III	> 5 cm	Var
OS14	39, E	12/12/2014	31/02/2015	Tibia proksimal	Kondroblastik OS	III	> 5 cm	Var
OS15	37, K	01/12/2016	-	Tibia proksimal	Düşük gradlı santral	I	≤ 5 cm	Yok
OS16	36, K	05/10/2017	-	Femur distal	Parosteal OS	I	≤ 5 cm	Yok
OS17	39, K	20/11/2017	-	Femur distal	Parosteal OS	I	≤ 5 cm	Yok

Olguların 9'u erkek, 8'i kadın iken, ortalama yaşları 27 ± 10 'dur. OS'nin en çok tuttuğu organlar sırasıyla femur (%58,82), tibia (%17,65), mandibula (%11,76) ve göğüs duvarı (%11,76) olarak gözlendi. Olguların yarısından çoğu konvansiyonel OS tanısı alırken, %17,65'i fibroblastik OS, %11,76'sı parosteal ve düşük gradlı santral OS ve %5,88'i kondroblastik OS tanısına sahiptir. MOS grubunda, akciğer metastazı olan bütün olgular evre III'te iken, OS grubunda olguların %35,29'u evre I, %11,76'sı evre IIB ve %5,88'i evre IIA'dadır. Olguların çoğunda (%70,59) tümör çapı ≤ 5 cm'dir. Olgulara ait demografik verilerin dairesel grafik gösterimi Şekil 21'de sunuldu.



Şekil 21. Olgulara ait cinsiyet, tutulum yeri, tanı, evre, tümör çapı ve metastaz bilgileri

Tüm hastaların ortalama sağkalım süresi $917,41 \pm 534,88$ gün iken, sağkalım analizleri ile MOS grubunda medyan sağkalım süresi 576 gün olarak hesaplandı (Şekil 22). OS grubunda sağkalım oranı %87,5 iken, MOS grubunda bu oran %33,3'tür. Sağkalım testleri uygulanırken, zaman başlangıcı olarak olguların ameliyat oldukları tarih alındı. Bu tarihten itibaren, olguların ölümüne ya da son takibine kadar geçen süre sağkalım süresi olarak ifade edildi.



Şekil 22. OS ve MOS gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi

4.2. OS VE MOS DOKULARINDA GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

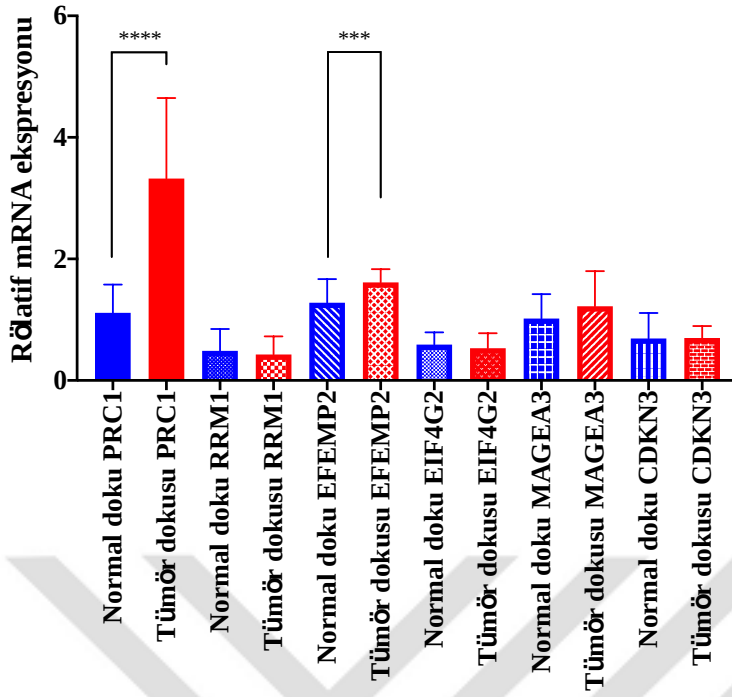
OS ve MOS gruplarındaki olguların normal ve tümör doku bloklarından elde edilen örnekler GZ-PZR yöntemi ile çalışıldı. *PRC1*, *RRM1*, *EFEMP2*, *EIF4G2*, *MAGEA3* ve *CDKN3* genlerine özgü primerlerle ekspresyonları incelenerek, hastalığın ilerlemesinde ve metastazında rol oynayabilecek genler belirlendi. Üçlü tekrar (triplike) olarak çalışılan her örnek ve gen için ortalama eşik döngüsü (Cycle Threshold; Ct) değeri ve SD hesaplandı. Ct değeri; tanımlanan eşik değere ulaşmak için gereken döngü sayısıdır. *ACTB* geni referans olarak kabul edildi ve diğer genlerin ekspresyon değerleri *ACTB*'ye göre normalize edildi. Tümör dokularının delta-Ct değerlerinden normal dokuların ortalama delta-Ct değerlerinin çıkarılması sonucu delta-delta Ct değerleri elde edildi. *PRC1*, *RRM1*, *EFEMP2*, *EIF4G2*, *MAGEA3* ve *CDKN3* genlerinin ekspresyon seviyeleri ile referans olarak *ACTB* geninin ekspresyon seviyesi karşılaştırılması için Delta-Delta Ct metodu kullanılarak rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri (log2 kat değişimleri) hesaplandı [126]. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[Ct \text{ Tümör Doku (Hedef Gen} - \text{ Kontrol Geni)} - Ct \text{ Normal Doku (Hedef Geni} - \text{ Kontrol Geni)}]}$$

Değerlendirilen 17 örneğin normal ve tümör dokularındaki rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, *PRC1* ve *EFEMP2* genlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p = 0,0008$) (Şekil 23). Normal ve tümör doku örneklerinden hesaplanan rölatif mRNA ekspresyon seviyelerinin (log2 kat değişimleri) ortalama $\pm$ SD değerleri Tablo 19'da gösterilmektedir.

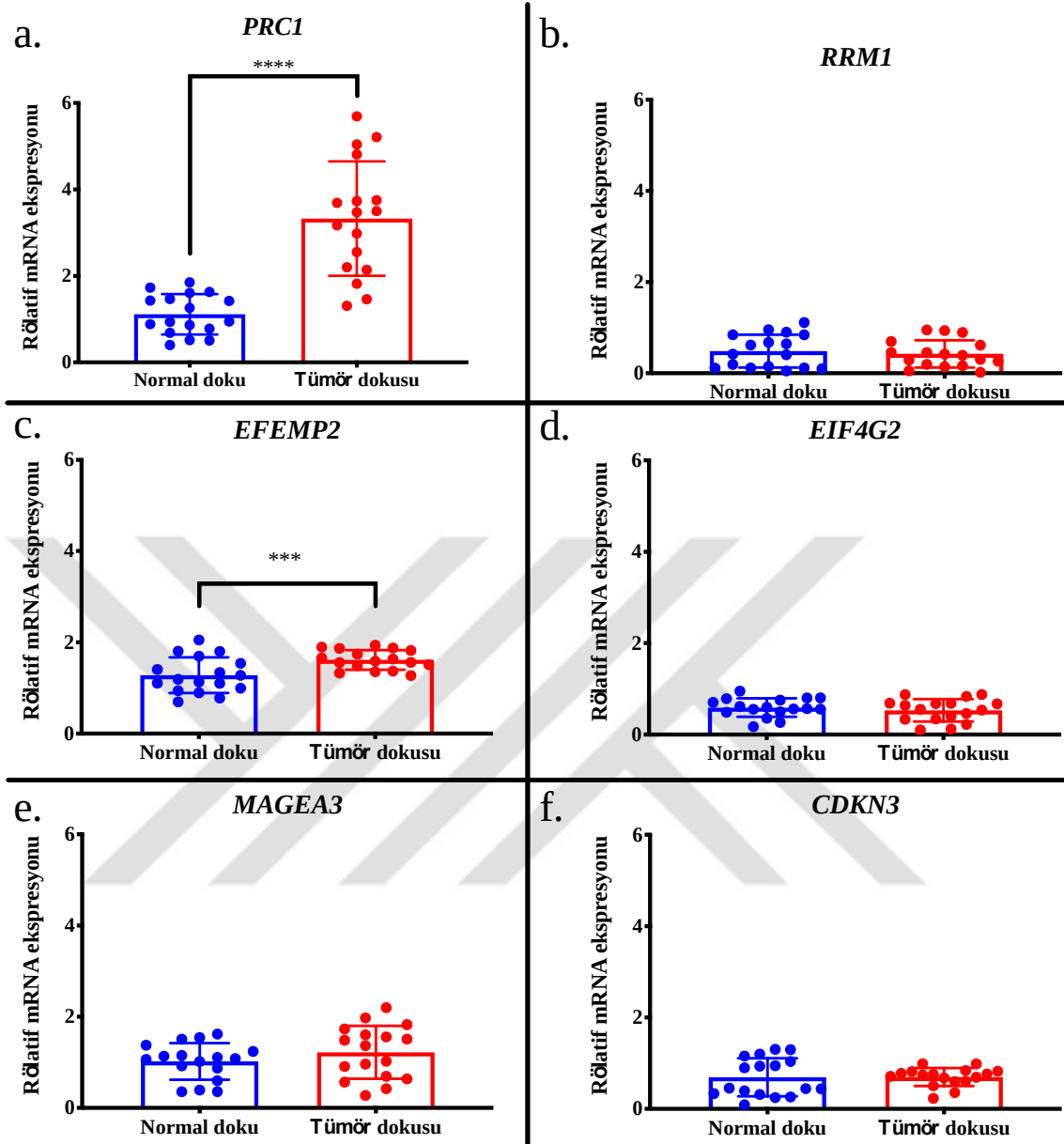
Tablo 19. Rölatif mRNA ekspresyon seviyelerinin ortalama $\pm$ SD değerleri

	<i>PRC1</i>	<i>RRM1</i>	<i>EFEMP2</i>	<i>EIF4G2</i>	<i>MAGEA3</i>	<i>CDKN3</i>
Normal doku	1,11 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,36	1,28 $\pm$ 0,39	0,59 $\pm$ 0,20	1,02 $\pm$ 0,40	0,69 $\pm$ 0,42
Tümör dokusu	3,32 $\pm$ 1,32	0,43 $\pm$ 0,30	1,61 $\pm$ 0,21	0,53 $\pm$ 0,25	1,22 $\pm$ 0,58	0,70 $\pm$ 0,20



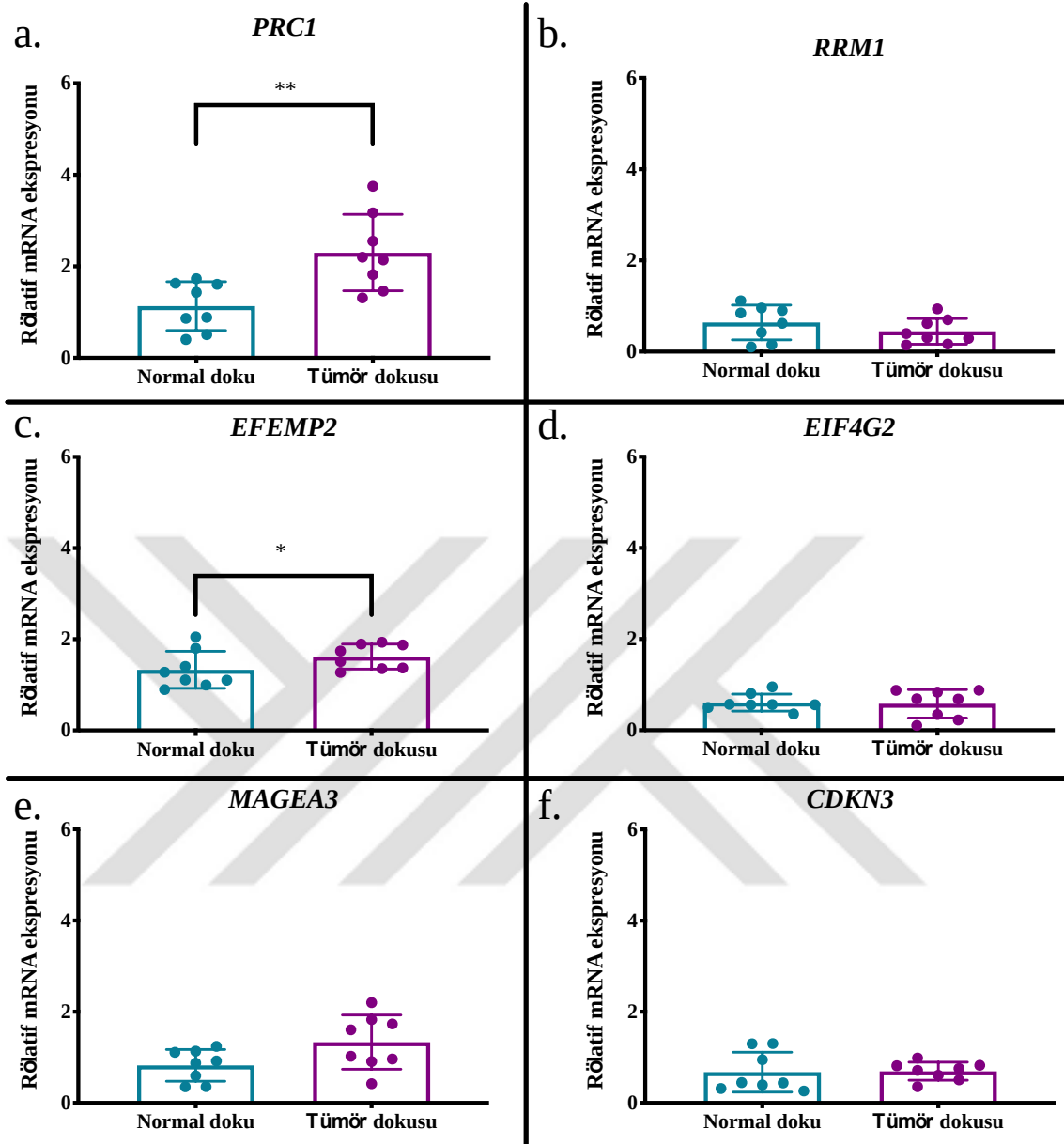
Şekil 23. İncelenen bütün olgulardaki rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri
 (***) $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ göstermektedir)

PRC1 ve *EFEMP2* genlerinin ekspresyonu normal dokularla kıyaslandığında bütün gruplarda artmış olarak bulundu (Şekil 24a-24c). Bütün olgular değerlendirildiğinde, *PRC1* geninin ekspresyonu normal dokulara kıyasla 3 kat, *EFEMP2* geninin ekspresyonu ise 1,3 kat artmış olarak gözlemlendi. *RRM1*, *EIF4G2* ve *CDKN3* genlerinin ekspresyonunda normal dokuyla kıyasla değişiklik gözlenmedi. *MAGEA3* geninin ekspresyonunu ise 1,2 kat artmakla birlikte bu bulgu istatistiki bir anlamlılık göstermedi.



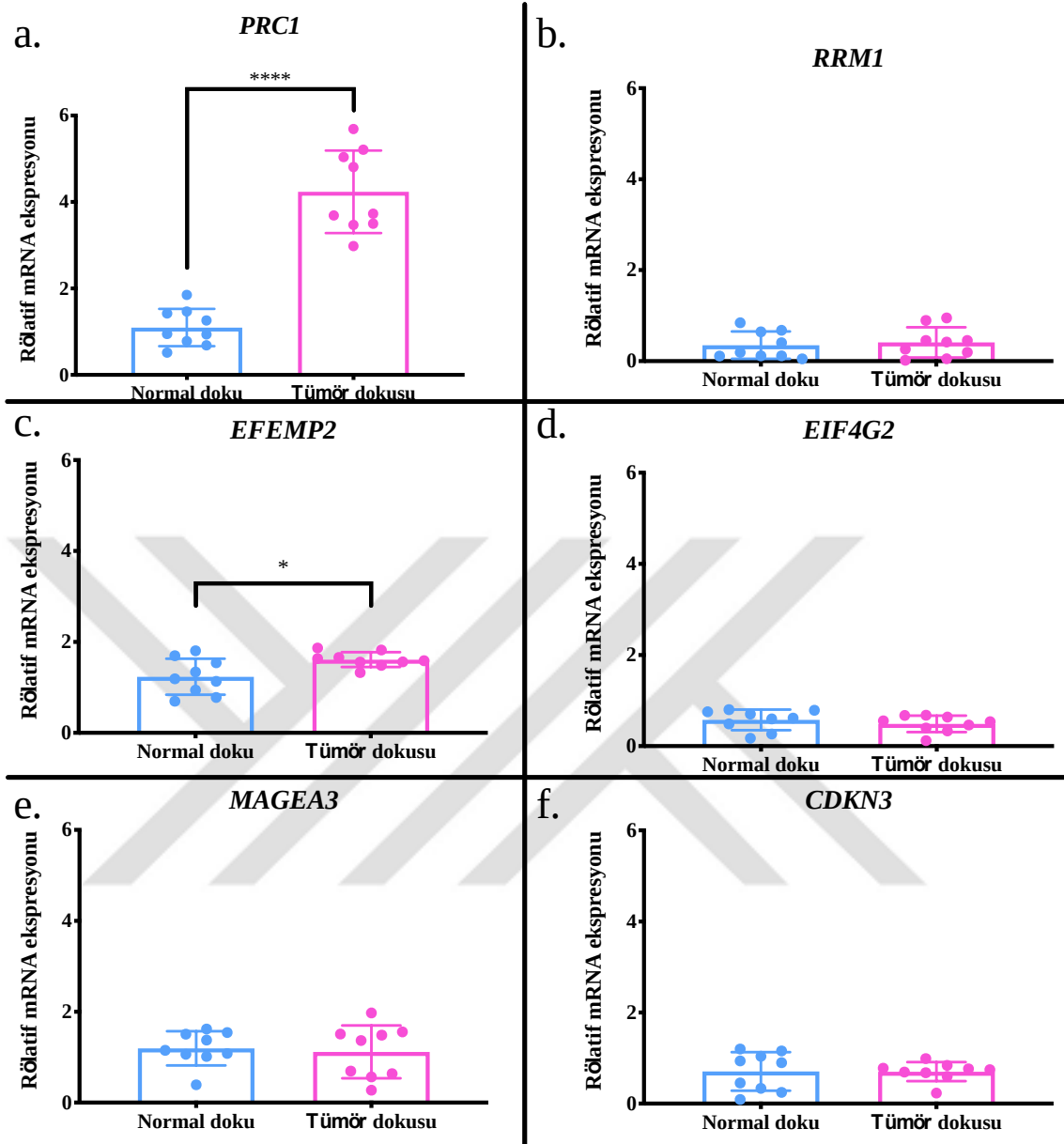
Şekil 24. İncelenen bütün olgularda *PRC1*, *RRM1*, *EFEMP2*, *EIF4G2*, *MAGEA3* ve *CDKN3* genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri
 (** p≤0,001 ve **** p≤0,0001'i göstermektedir)

Sadece OS grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde, *PRC1* ve *EFEMP2* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış istatistiki olarak anlamlı bulundu (sırasıyla p=0,0053 ve p=0,0371) (Şekil 25a-25c). *PRC1* geninin ekspresyon seviyeleri normal dokuya kıyasla 2 kat, *EFEMP2* geninin ekspresyonu ise 1,2 kat artmış olarak gözlemlendi.



Şekil 25. OS grubunda *PRC1*, *RRM1*, *EFEMP2*, *EIF4G2*, *MAGEA3* ve *CDKN3* genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri
 (* $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$ 'i göstermektedir)

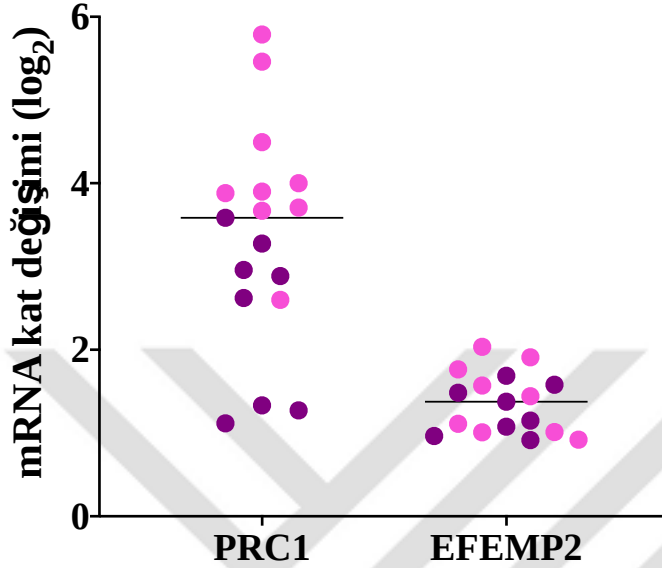
Sadece MOS grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde, *PRC1* ve *EFEMP2* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış istatistiki olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p = 0,0144$) (Şekil 26a-26c). *PRC1* geninin ekspresyon seviyeleri normal dokuya kıyasla 3,9 kat, *EFEMP2* geninin ekspresyonu ise 1,3 kat artmış olarak gözlemlendi.



Şekil 26. MOS grubunda *PRC1*, *RRM1*, *EFEMP2*, *EIF4G2*, *MAGEA3* ve *CDKN3* genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri
 (* $p < 0,05$ ve **** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)

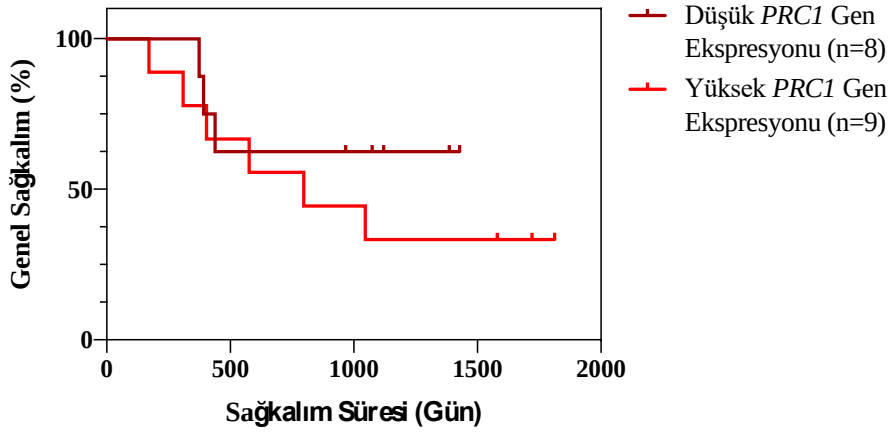
OS ve MOS gruplarındaki toplam 17 olgunun normal dokularına kıyasla *PRC1* ve *EFEMP2* genlerindeki kat değişimleri incelendiğinde; *EFEMP2* ekspresyonunda iki grup arasında bir tutarlılık görülmemesine rağmen, *PRC1* ekspresyonunun MOS grubunda daha yüksek olduğu görüldü. *PRC1* genindeki kat değişimleri için medyan değer 3,58 olarak bulundu ve MOS grubundaki 8 olgu medyan değer üstünde kalırken, sadece 1 olgu medyan değerinin altında kaldı. OS grubundaki bütün olgular ise medyan değerinin altında yer aldı. *EFEMP2* genindeki kat değişimleri için ise

medyan değeri 1,37 olarak bulundu ve MOS grubundan 5 olgu, OS grubundan 3 olgu medyan değeri üzerinde kaldı (Şekil 27).

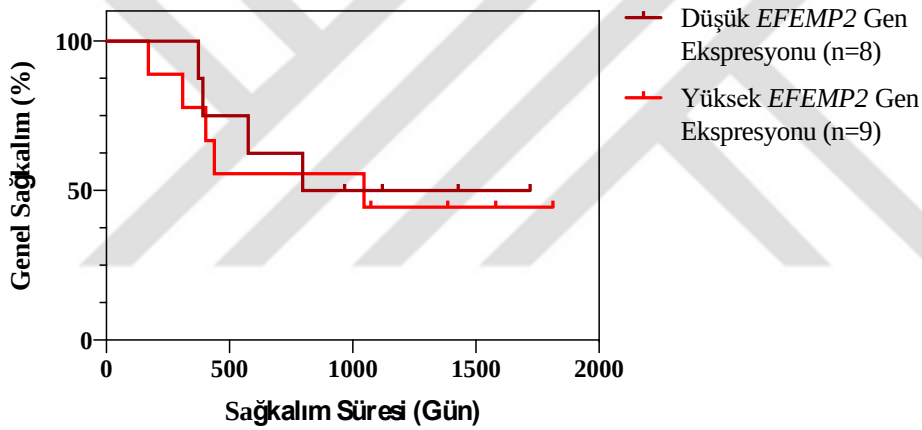


Şekil 27. İncelenen bütün olgularda *PRC1* ve *EFEMP2* genlerinin kat değişimleri
(Mor noktalar OS grubundaki olguları, pembe noktalar MOS grubundaki olguları, siyah çizgi ise medyan değeri temsil etmektedir)

Tüm olgularda *PRC1* ve *EFEMP2* ekspresyonlarının medyan değerleri (sırasıyla 3,58 ve 1,37) OS ve MOS gruplarını yüksek ve düşük ekspresyon gruplarına ayırmak için kullanıldı. Bütün olgular için yüksek *PRC1* gen ekspresyonu grubu (n=9), yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonu grubu (n=9), düşük *PRC1* gen ekspresyonu grubu (n=8) ve düşük *EFEMP2* gen ekspresyonu grubu (n=8) oluşturularak sağkalım analizi yapıldı. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, *PRC1* ve *EFEMP2* gen ekspresyonlarının sağkalım süresi ile anlamlı olarak değişimi gözlenmedi (sırasıyla $p < 0,3432$ ve $p < 0,7960$) (Şekil 28-29) . Tüm olgularda yüksek *PRC1* gen ekspresyonu grubunda sağkalım süresinin medyanı 797 gün, yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonu grubunda ise 1046 gün olarak bulundu.



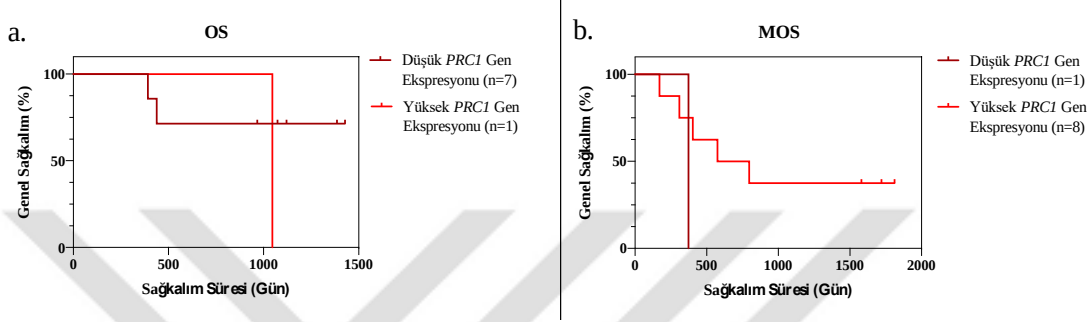
Şekil 28. Bütün olgularda düşük ve yüksek *PRC1* gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi



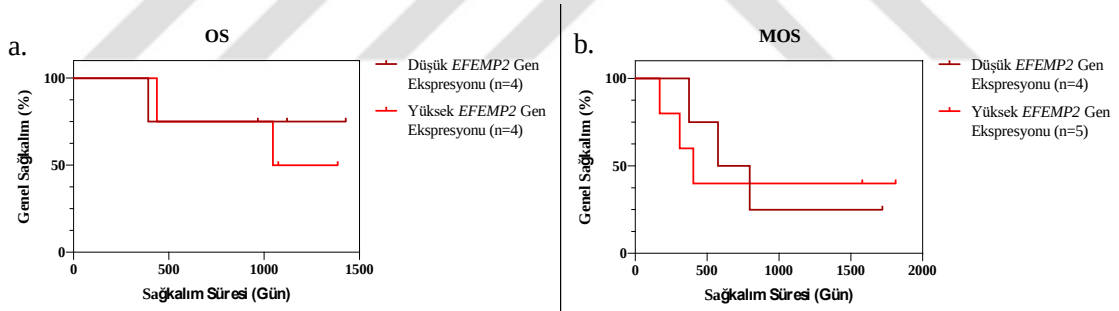
Şekil 29. Bütün olgularda düşük ve yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi

OS grubunda yüksek *PRC1* gen ekspresyonu grubu (n=1), yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonu grubu (n=4), düşük *PRC1* gen ekspresyonu grubu (n=7), düşük *EFEMP2* gen ekspresyonu grubu (n=4) ve MOS grubunda yüksek *PRC1* gen ekspresyonu grubu (n=8), yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonu grubu (n=5), düşük *PRC1* gen ekspresyonu grubu (n=1), düşük *EFEMP2* gen ekspresyonu grubu (n=4) için sağkalım analizleri yapıldı (Şekil 30-31). OS olgularında yüksek *PRC1* gen ekspresyonuna sahip olgularda sağkalım süresinin medyanı 1046 gün, MOS olgularında ise 404 gün olarak bulundu. Yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonuna sahip olgularda sağkalım süresinin medyanı ise OS grubunda 1216 gün iken, MOS grubunda 686,5 gün olarak bulundu. Yüksek *PRC1*

ve *EFEMP2* gen ekspresyonu gösteren olguların sağkalım süresi düşük gen ekspresyonları gösteren olgulara kıyasla daha kısa olduğu görüldü. Sağkalım eğrisi *PRC1* ve *EFEMP2* gen ekspresyonları açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise OS (sırasıyla $p<0,3953$ ve $p<0,7015$) ve MOS ($p<0,2801$ ve $p<0,9242$) grupları arasında anlamlılık bulunmadı.



Şekil 30. Düşük ve yüksek *PRC1* gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi

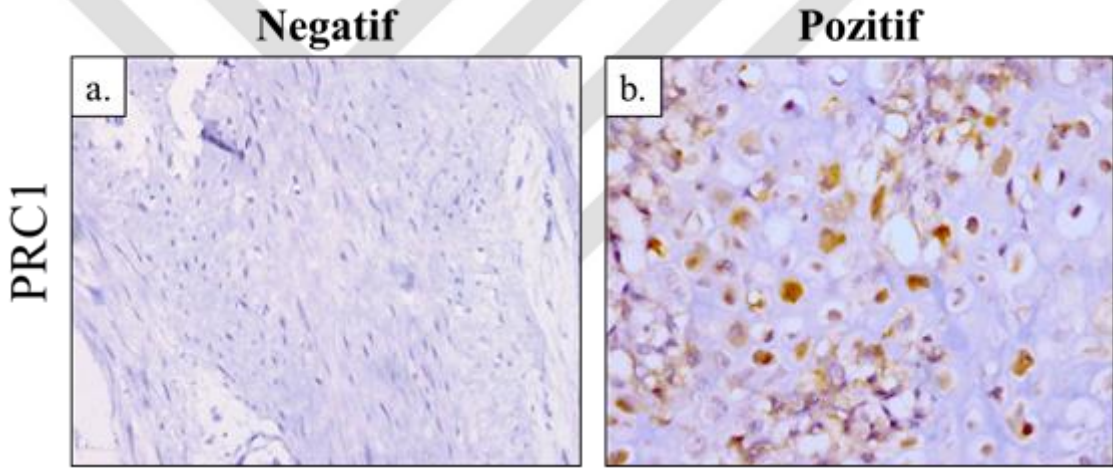


Şekil 31. Düşük ve yüksek *EFEMP2* gen ekspresyonu gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi

Yapılan gen ekspresyonu ve sağkalım analizleri sonucunda; iki olgu grubu arasında metastazı bulunan hastaları içeren MOS grubunda ekspresyon seviyeleri farkı en yüksek, istatistiki olarak anlamlı ve yüksek gen ekspresyon grubunda sağkalım süresi en kısa olan *PRC1* geni ile ilişkili protein ve kromozom seviyesinde olguların dokularında diğer değerlendirmeler yapıldı, ayrıca in vitro deneylerle *PRC1* geni üzerinden analizler yapıldı.

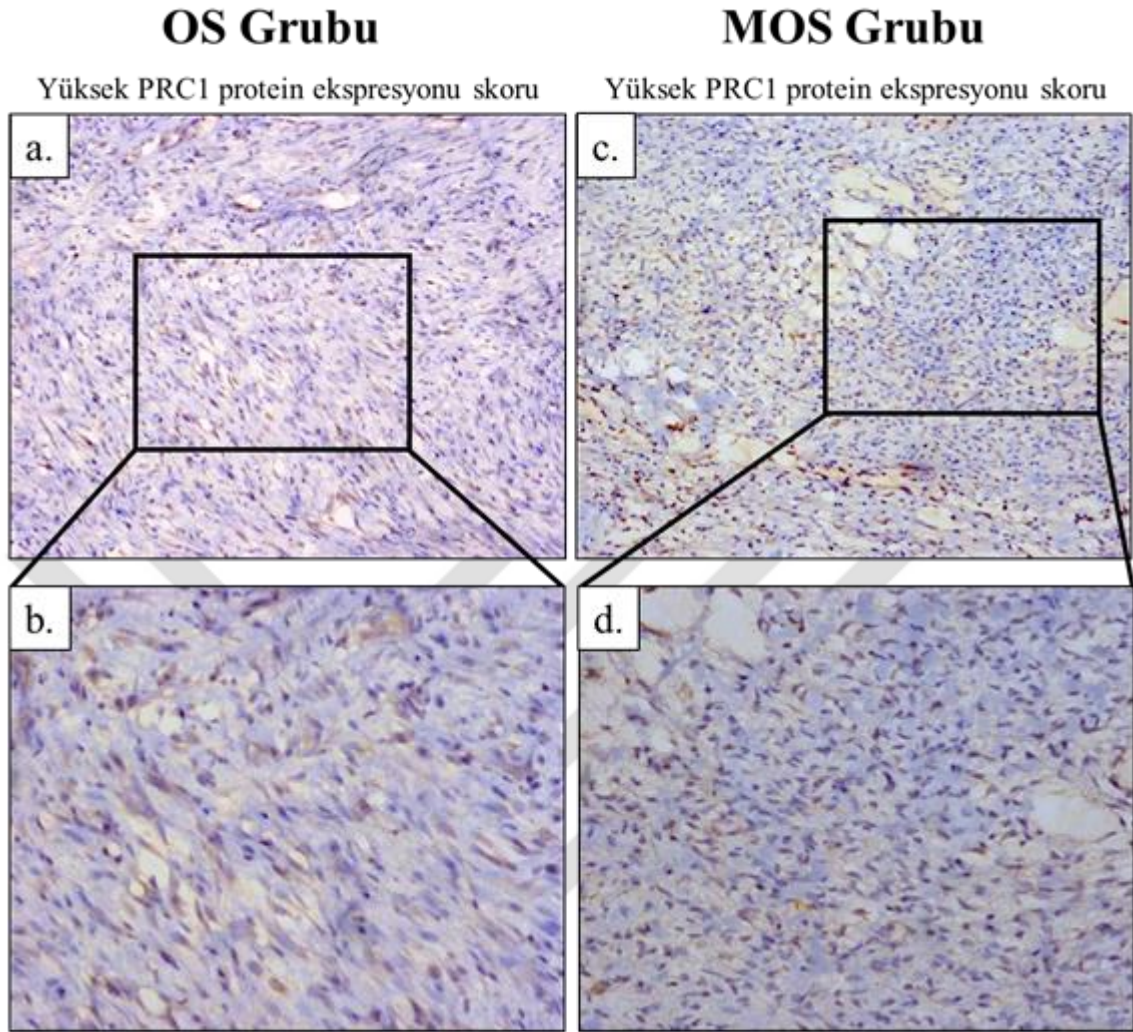
4.3. OS VE MOS DOKULARINDA PRC1'İN İHK DEĞERLENDİRMELERİ

FFPE bloklarından alınan kesitlerdeki PRC1 protein ekspresyonunun semi-kantitatif olarak belirlenmesi için, incelenen preparatlarda nükleer ve sitoplazmik boyanmalar iki farklı göz tarafından bağımsız olarak değerlendirildi. PRC1 proteini genel olarak; interfaz hücrelerinin çekirdeklerinde, mitozda iç iplikçikleri ile bağlantılı ve sitokinez sırasında ise hücrenin ortasında yer almaktadır. İHK skorlaması için boyanın yoğunluğu ve pozitif hücrelerin yaygınlığı kriterleri değerlendirildi. Buna göre boyanın yoğunluğu skorlaması negatif; 0, zayıf; 1, orta; 2 ve kuvvetli; 3 olarak, pozitif hücrelerin yaygınlığı skorlaması ise tüm tümör alanının pozitif boyanmış tümör hücrelerine yüzdesine göre; 0; %0-4, 1; %5-24, 2; %25-49, 3; %50-74 ve 4; %75-100 olarak yapıldı (Şekil 32a-b).



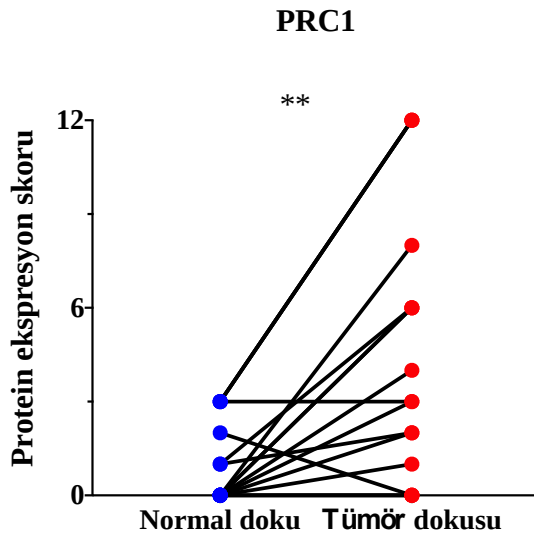
Şekil 32. (a) OS17 ve (b) OS14 olgularında İHK ile değerlendirilen PRC1 boyamasına ait örnekler (x200 büyütme)

Her olgu için PRC1 protein ekspresyon skoru ise, yoğunluk ve yaygınlık skorlarının çarpılması ile belirlendi. Skor; en büyük sayı en yüksek protein ekspresyonunu göstermek kaidesi ile 0 - 12 arasında değişmektedir. PRC1 protein ekspresyon skorunun cutoff değerinin belirlenmesi için medyan (ortanca) değer hesaplandı (medyan=3) ve düşük ekspresyon grubu medyan değer altı, yüksek ekspresyon grubu medyan değer üstü olarak belirlendi (Şekil 33).



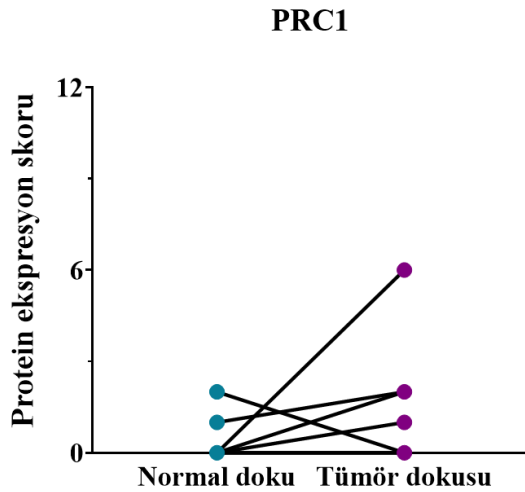
Şekil 33. (a) OS grubunda yüksek PRC1 protein skoruna sahip OS2 olgusunun (Skor:6) x100 ve (b) x200 büyütmedeki görüntüleri, (c) MOS grubunda yüksek PRC1 protein skoruna sahip OS4 olgusunun (Skor:12) x100 ve (d) x200 büyütmedeki görüntüleri

İncelenen tüm olguların tümör ve normal doku örneklerindeki protein ekspresyon skorları karşılaştırıldığında, PRC1 proteinin nükleus ve sitoplazmadaki ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Tüm olguların normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında istatistiksel olarak PRC1 protein ekspresyonunda anlamlı bir artış bulundu ($p=0,0011$) (Şekil 34).



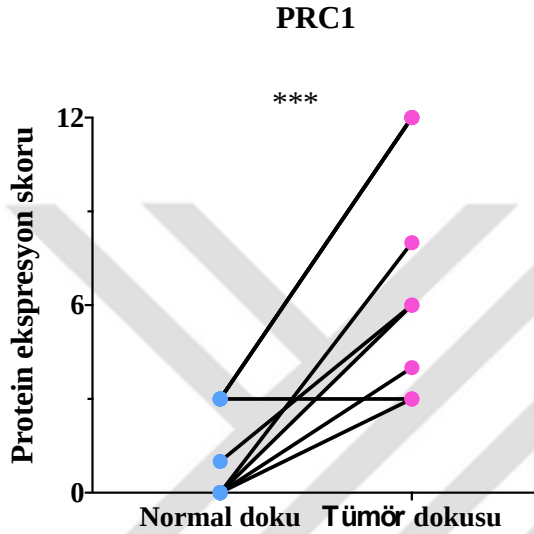
Şekil 34. Bütün olgularda PRC1 protein ekspresyon skorunun istatistiksel analizi
 (** $p < 0,01$ 'i göstermektedir)

Yalnızca OS grubundaki olgular değerlendirildiğinde; en yüksek protein ekspresyon skoru 6 olarak gözlemlendi (normal doku İHK skor ortalaması = $0,3750 \pm 0,2631$, tümör dokusu İHK skor ortalaması = $1,375 \pm 0,7304$), ve normal doku örnekleri ile kıyaslandığında, PRC1 protein seviyelerinde immünohistokimyasal olarak istatistiksel anlamlılık bulunamadı ($p = 0,2641$) (Şekil 35).



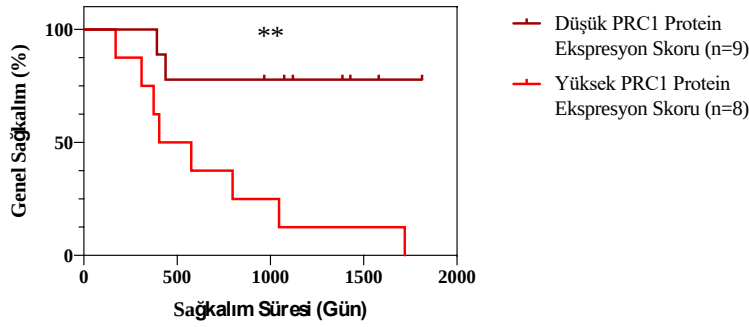
Şekil 35. OS grubunda PRC1 protein ekspresyon skorunun istatistiksel analizi

MOS grubundaki olgular değerlendirildiğinde ise; en yüksek protein ekspresyon skoru 12 olarak gözlemlendi (normal doku İHK skor ortalaması = $1,444 \pm 0,5031$, tümör dokusu İHK skor ortalaması = $7,333 \pm 1,280$), ve normal doku örnekleri ile kıyaslandığında, PRC1 protein ekspresyonunda anlamlı bir artış bulundu ($p = 0,0005$). (Şekil 36).



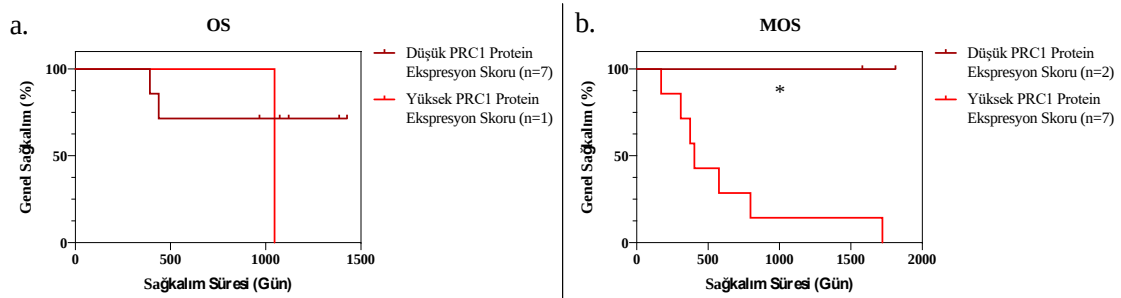
Şekil 36. MOS grubunda PRC1 protein ekspresyon skorunun istatistiksel analizi
 (***) $p \leq 0,001$ 'i göstermektedir

Bütün olgularda düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon gruplarının (sırasıyla $n=9$, $n=8$) sağkalım eğrisi ve sağkalım analizleri sonuçları değerlendirildiğinde ise, düşük PRC1 protein ekspresyonu gösteren olguların %22,2'sinin hayatını kaybettiği, yüksek PRC1 protein ekspresyonu gösteren olguların ise %87,5'inin hayatını kaybettiği görüldü. Yüksek PRC1 protein ekspresyonu gösteren olgularda sağkalım süresinin medyanı 490 gün olarak hesaplandı. Sağkalım eğrisi istatistiksel olarak analiz edildiğinde sağkalım süresi yönünden incelenen bütün olgular ile artan PRC1 protein ekspresyonu ilişkisi anlamlı bulundu ($p=0,0056$) (Şekil 37).



Şekil 37. Bütün olgularda düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon skoru gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi
(** $p < 0,01$ 'i göstermektedir)

OS ve MOS grubu değerlendirildiğinde, OS grubunda düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon gruplarında (sırasıyla $n=7$ ve $n=1$) sağkalım analizi istatistiksel olarak anlam ifade etmezken ($p=0,3953$), MOS grubu düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon gruplarında (sırasıyla $n=2$ ve $n=7$) artan PRC1 protein ekspresyonu anlamlı şekilde olguların sağkalımı ile ilişkilendirildi ($p=0,0438$) (Şekil 38). Yüksek PRC1 protein ekspresyonu gruplarında sağkalım sürelerinin medyanları OS grubunda 1046 gün, MOS grubunda ise 404 gün olarak bulundu.

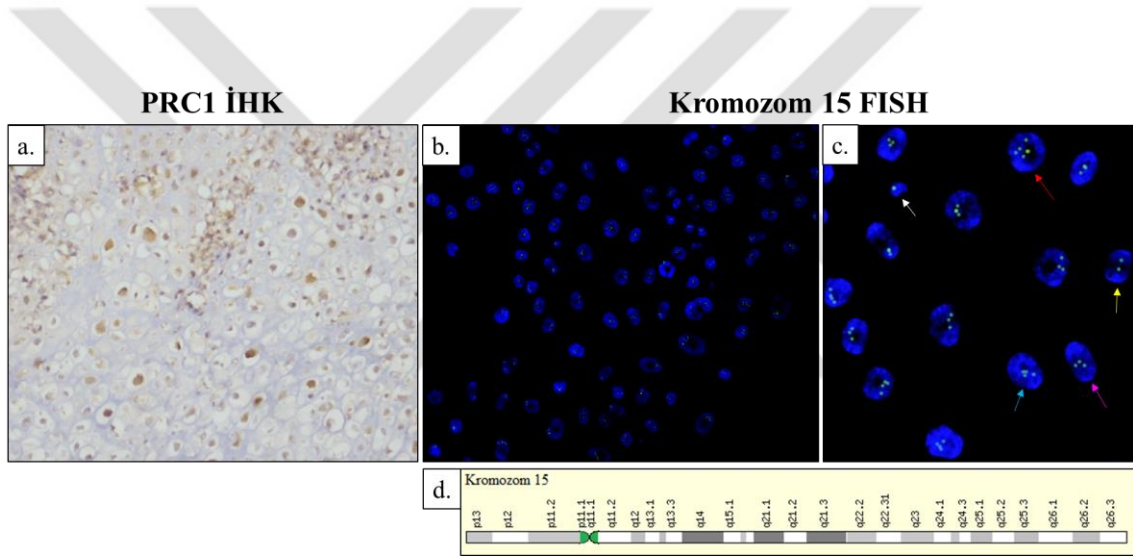


Şekil 38. Düşük ve yüksek PRC1 protein ekspresyon skoru gruplarında genel sağkalımların Kaplan-Meier eğrisi ile gösterimi
(* $p < 0,05$ 'i göstermektedir)

4.4. OS VE MOS DOKULARINDA FISH DEĞERLENDİRMELERİ

OS ve MOS gruplarındaki olguların normal ve tümör doku bloklarından alınan kesitlerde PRC1 genini içeren 15. kromozomun sayısal anomalilerini belirlemek için FISH yöntemi uygulandı. 15. kromozomun sentromer bölgesi (15p11.1-q11.1) 5-

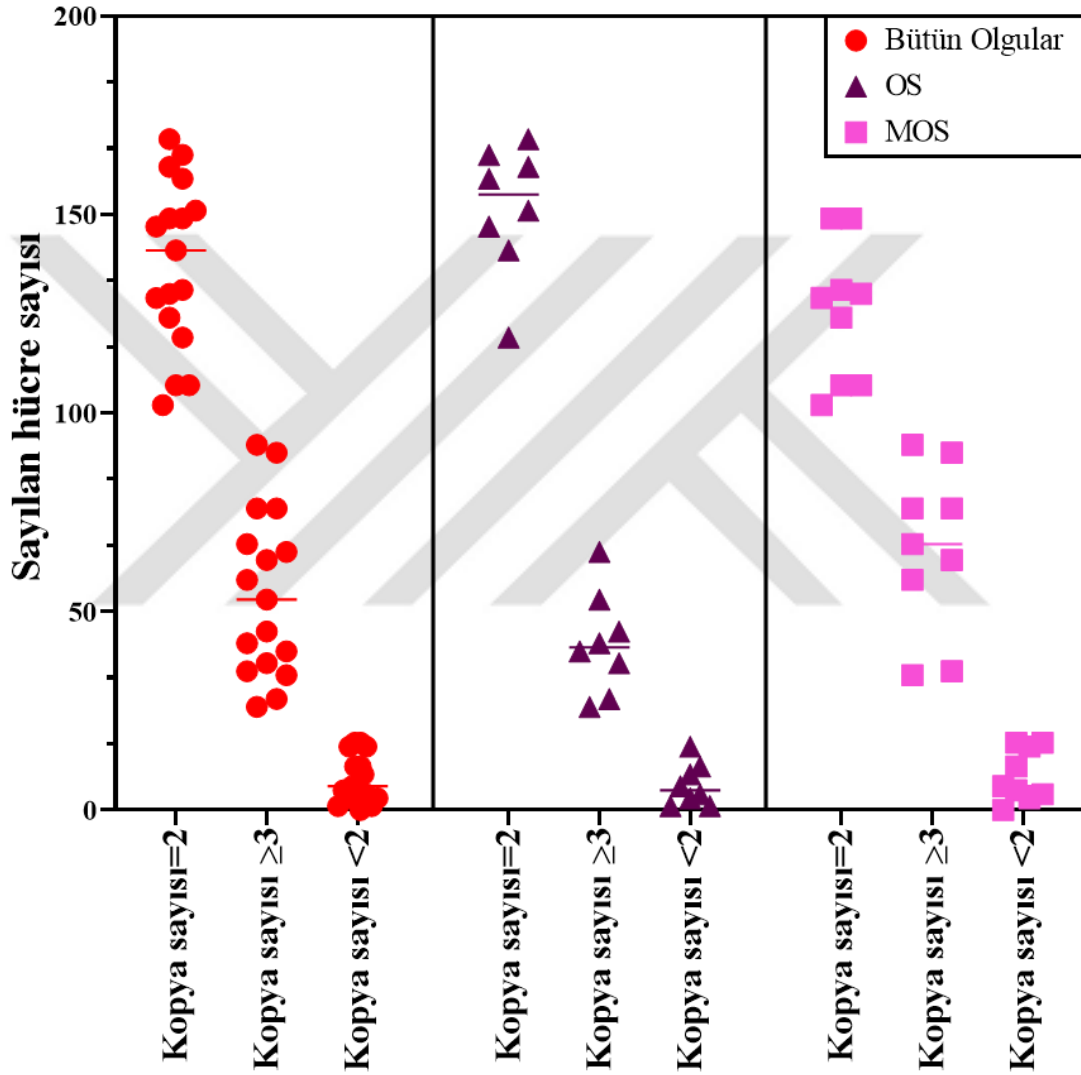
Fluorescein (maksimum absorban=491 nm, maksimum emisyon=515 nm) bağlı prob ile boyanarak hazırlanan preparatlar, fluoressan mikroskopunun DAPI ve FITC filtreleri ile iki farklı göz tarafından bağımsız olarak değerlendirildi (Şekil 39d). FISH skorlanması için her örnekte 200 hücrenin hibridizasyon sinyalleri (yeşil) sayıldı (Şekil 39b-c). Hasarlı, parçalanmış, üst üste gelmiş çekirdekleri olan ve sınırları belirsiz hücreler değerlendirmeye alınmadı. Aralarında bir sinyalin girebileceği kadar mesafe olmayan sinyaller tek olarak değerlendirildi. Toplam 200 hücrede sayılan sentromer sinyalleri sonucunda anöploidiler belirlendi. 15. kromozom için standart sinyal durumu bir hücre için 2 yeşil sinyaldir (normal hücre), ≥ 3 sinyal 15. kromozomun artışı, ≤ 1 sinyal ise 15.kromozomun kaybı olarak değerlendirildi.



Şekil 39. (a) OS14 olgusunda PRC1 proteinin İHK boyanması (x100 büyütme), (b) aynı olgunun 15. kromozom sentromerinin FISH ile boyanması (x100 büyütme), (c) normal hücre (sarı ok), monozomik hücre (beyaz ok), trizomik hücre (pembe ok), tetrazomik hücre (mavi ok) ve pentazomik hücrelerde (kırmızı ok) sinyal görüntüsü (x200 büyütme), (d) 15. kromozom sentromerinin gen lokasyonu

Değerlendirilen bütün olguların %42,85'i 15. kromozomda sayısal artış gösterirken, sadece %5,79'unda 15. kromozomun kaybı gözlemlendi. Sadece OS grubu değerlendirildiğinde, 15. kromozom kazancının oranı %32,43 olarak, MOS grubu değerlendirildiğinde ise aynı oran %55,79 olarak bulundu. OS grubundaki kromozom kaybı oranı %4,91, MOS grubunda ise aynı oran %6,90 olarak bulundu. OS grubunda sayılan ortalama $42 \pm 11,93$ hücrede 15. kromozom artışı, $6,37 \pm 4,94$ hücrede ise 15. kromozomun kaybı gözlemlendi. MOS grubu için ise, ortalama hücre sayıları sırasıyla

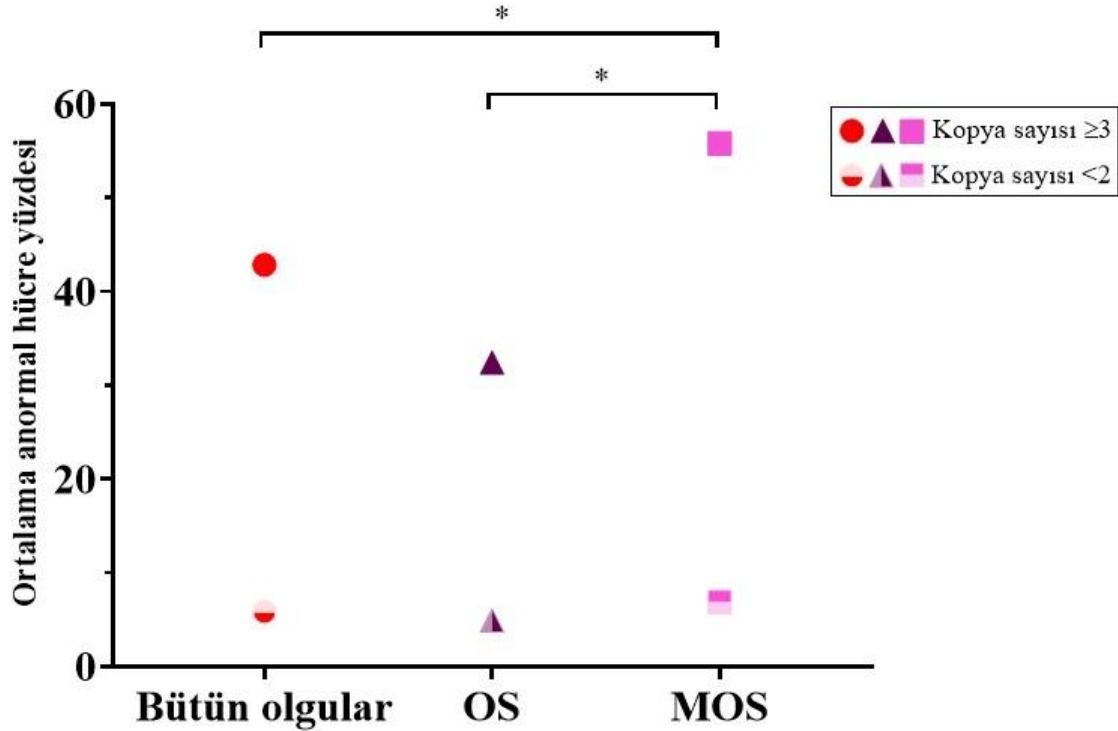
65,66±19,74 ve 8,77±6,21 olarak bulundu (Şekil 40). Hem kromozom kazancı hem de kromozom kaybını içeren ortalama anormal hücre sayısı bütün olgular değerlendirildiğinde %49 olarak, sadece OS grubunda %37 olarak ve sadece MOS grubunda ise %62 olarak bulundu.



Şekil 40. FISH analizi sonrası incelenen gruplarda kopya sayısına göre sayılan hücrelerin dağılımı

İncelenen bütün olgularda FISH yöntemiyle sayımı yapılan anormal hücrelerin 15. kromozomun artışı (kopya sayısı ≥ 3) ve 15. kromozomun kaybı (kopya sayısı < 2) yönünden istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, MOS grubundaki kopya sayısı

artışları hem bütün olgulara hem de OS grubuna göre anlamlı şekilde yükseldiği bulundu (sırasıyla $p<0,0315$ ve $p<0,0166$) (Şekil 41).



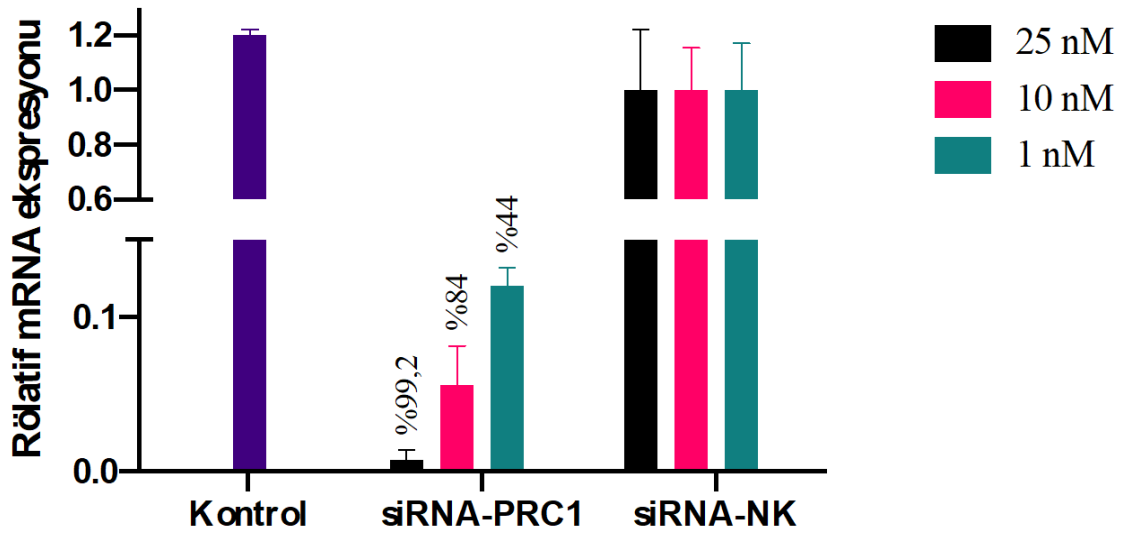
Şekil 41. FISH yöntemiyle sayılan hücrelerdeki ortalama anormal hücre yüzdelерinin gruplar arasındaki dağılımı
(* $p<0,05$ 'i göstermektedir)

4.5. TRANSFEKSİYON VERİMLİLİĞİ VE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

Transfeksiyon çalışmalarında *PRC1* genini baskılayan siRNA-*PRC1* ve gen baskılanmasını spesifik olmayan etkilerden ayırt etmek için negatif kontrol (siRNA-NK) kullanıldı. siRNA-NK, hücrede bilinen bir hedefe sahip olmayacak şekilde tasarlandı. İlk olarak; en uygun konsantrasyon ve transfeksiyon verimliliğinin belirlenmesi için kuyu başına siRNA'ların son konsantrasyonu 25 nM, 10 nM ve 1 nM olacak şekilde transfeksiyon yapıldı, 48 saat bekletildikten sonra hücreler toplanarak, GZ-PZR analizi ile *PRC1* gen ekspresyonları 3.2.8.5 başlığında anlatıldığı şekilde hesaplandı.

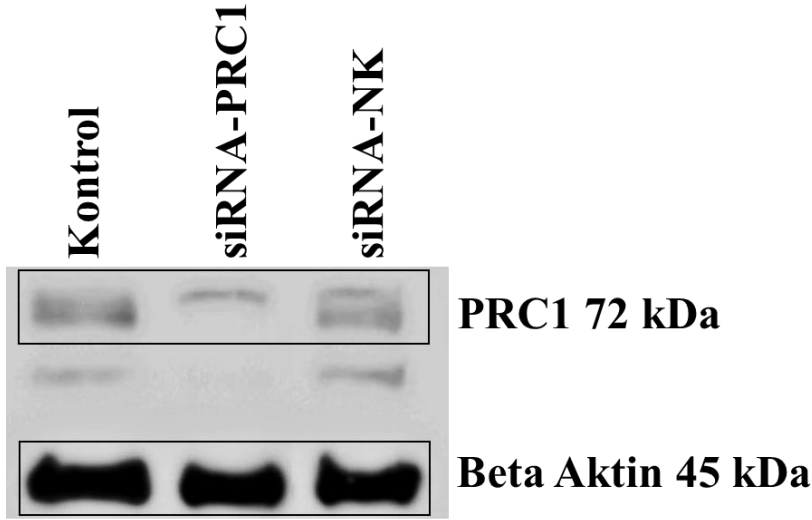
Delta-delta Ct yöntemi ile yapılan hesaplamalar sonucunda, Saos-2 hücre hattı 25 nM, 10 nM ve 1 nM siRNA konsantrasyonu ile muamele edildiğinde doza bağlı

olarak sırasıyla %99, %84 ve %44 oranında *PRC1* gen ekspresyonunu baskıladığı gözlemlendi (normalizasyon için *ACTB* referans alındı) (Şekil 42). Kontrol ve siRNA-NK grubu ile karşılaştırıldığında, transfeksiyon reaktifi ya da siRNA muamelesinin deney düzeneğinde gen ekspresyonu üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görüldü. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; 48 saat inkübasyonda en uygun siRNA konsantrasyonu 25 nM olarak belirlendi ve diğer basamaklardaki transfeksiyon deneyleri bu orana göre yapıldı.



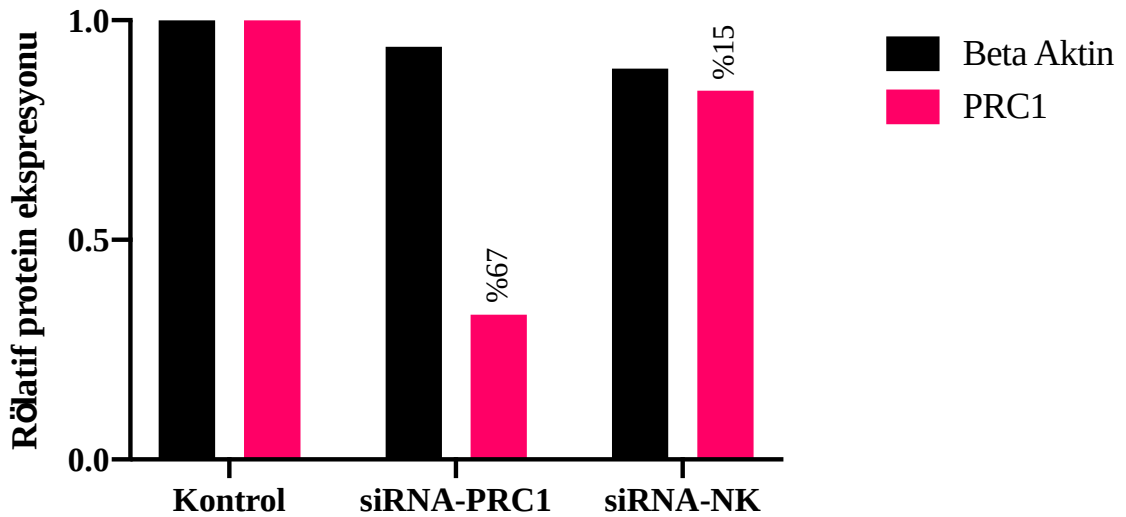
Şekil 42. Farklı konsantrasyonlardaki siRNA uygulamalarının *PRC1* gen ekspresyonu üzerine etkisi

Ayrıca transfeksiyonun verimliliğinin protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için transfeksiyon yapılan ve yapılmayan gruplarda Western blot yöntemiyle *PRC1* proteinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Protein seviyelerindeki değişimin belirlenmesi için membran görüntülenmesi sonucu elde edilen bantların görselleri kullanıldı ve analiz dansitometrik olarak ImageJ programı (National Institutes of Health, Maryland, ABD) kullanılarak yapıldı. *PRC1* proteinin protein ekspresyon düzeyleri beta aktin proteinin ekspresyon düzeylerine göre normalize edildi (Şekil 43).



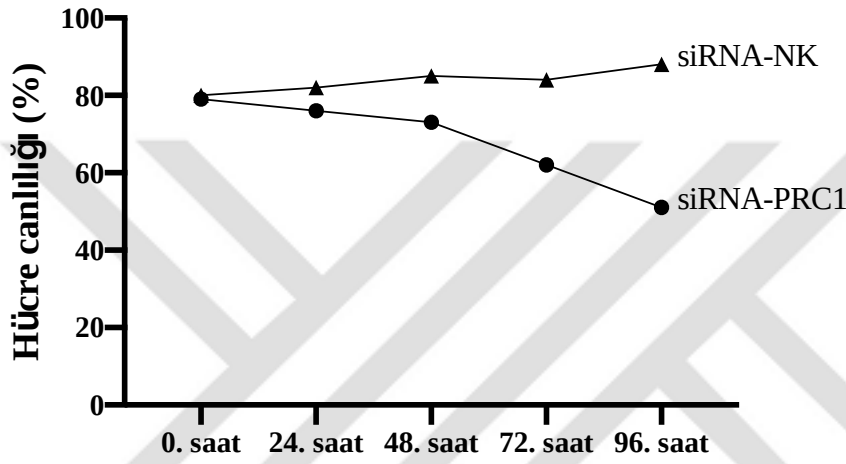
Şekil 43. Saos-2 hücre hattında kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında PRC1 ve Beta aktin protein seviyeleri

PRC1 geninin baskılanması sonucunda, PRC protein seviyesinde de azalma gözlemlendi. Yapılan analizler sonucunda, siRNA-PRC1 grubunda PRC1 protein ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna oranla %67 oranında azaldığı görüldü (Şekil 44).



Şekil 44. Kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında rölatif PRC1 protein ekspresyonu

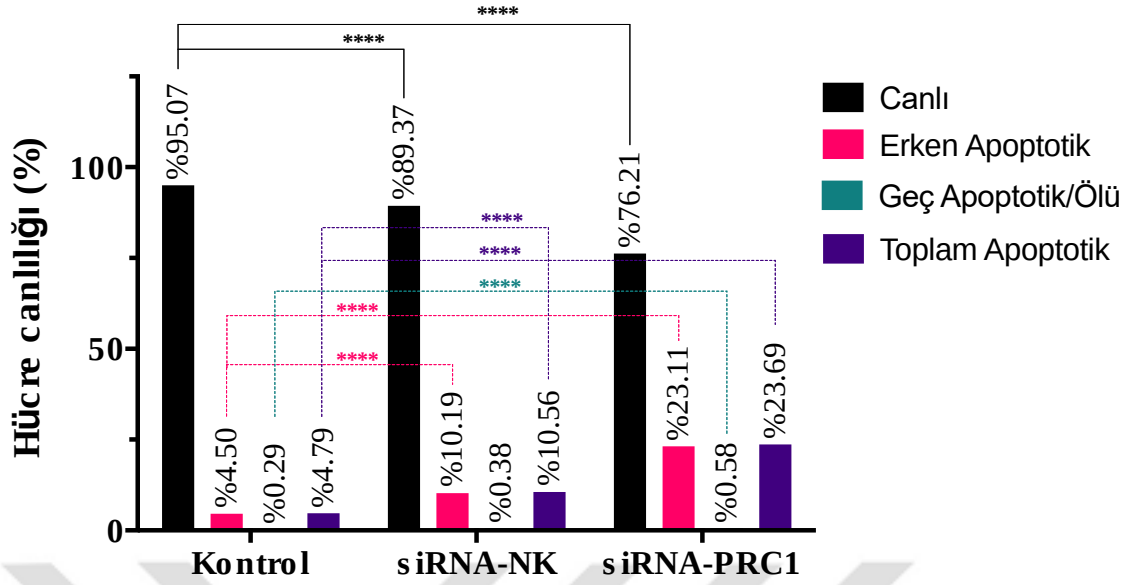
PRC1 geninin baskılanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile belirlendi. siRNA-*PRC1* ile muamele edilen Saos-2 hücrelerinde ilerleyen zaman gruplarında canlılığın azaldığı görüldü. siRNA-*PRC1* grubunda 0. saatte hücre canlılık oranı %79 iken, 24. saatte %76, 48. saatte %73, 72. saatte %62 ve 96. saatte %51 olarak bulundu. siRNA-NK grubunda ise bu oranlar sırasıyla; %80, %82, %85, %84 ve %88 olarak bulundu (Şekil 45).



Şekil 45. siRNA-*PRC1* ve siRNA-NK gruplarındaki hücre canlılık yüzdeleri

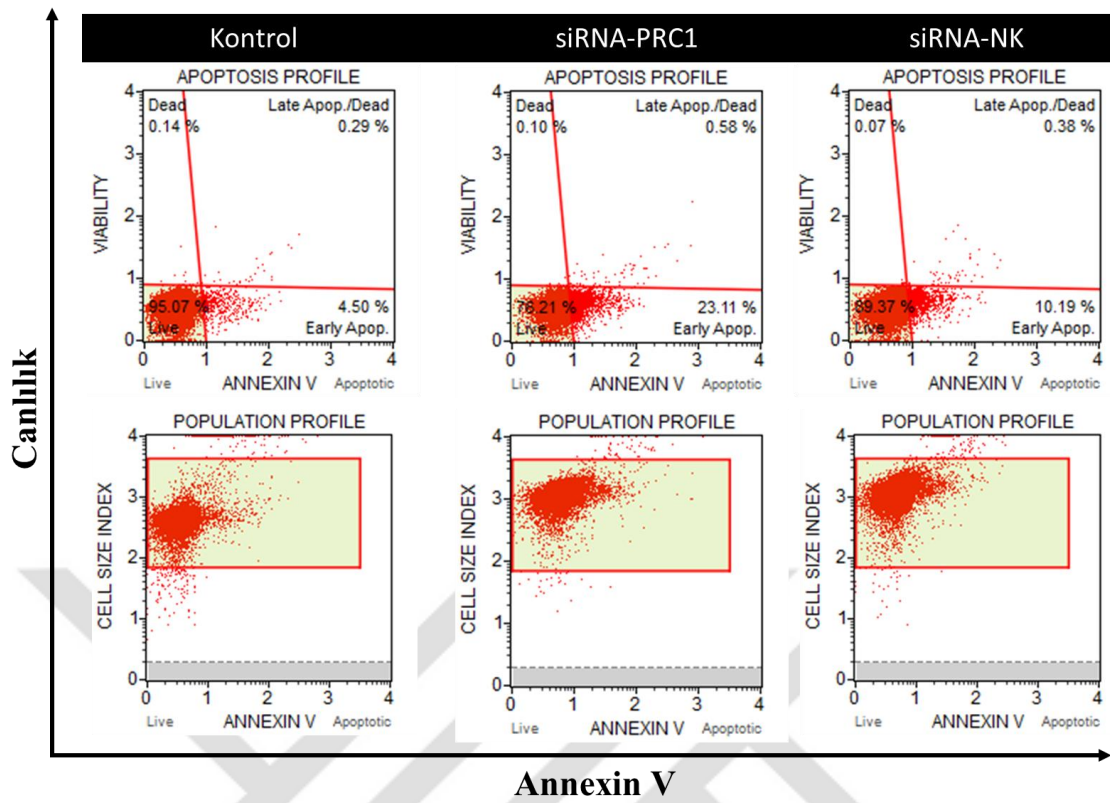
4.6. APOPTOZ VE HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN FLOW SİTOMETRİK ANALİZLERİ

PRC1 genin Saos-2 hücre hattında siRNA transfeksiyonu ile baskılanması sonucunda hücre döngüsünde ve apoptozunda meydana gelen değişimler flow sitometri ile analiz edildi. Transfeksiyon yapılan hücrelerde toplam apoptotik hücre sayısı artış gösterdi, kontrol ve NK grupları ile kıyaslandığında siRNA-*PRC1* ile baskılanan hücrelerde erken, geç ve toplam apoptotik hücre sayısındaki artış ve canlı hücre oranlarındaki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0001$) (Şekil 46).



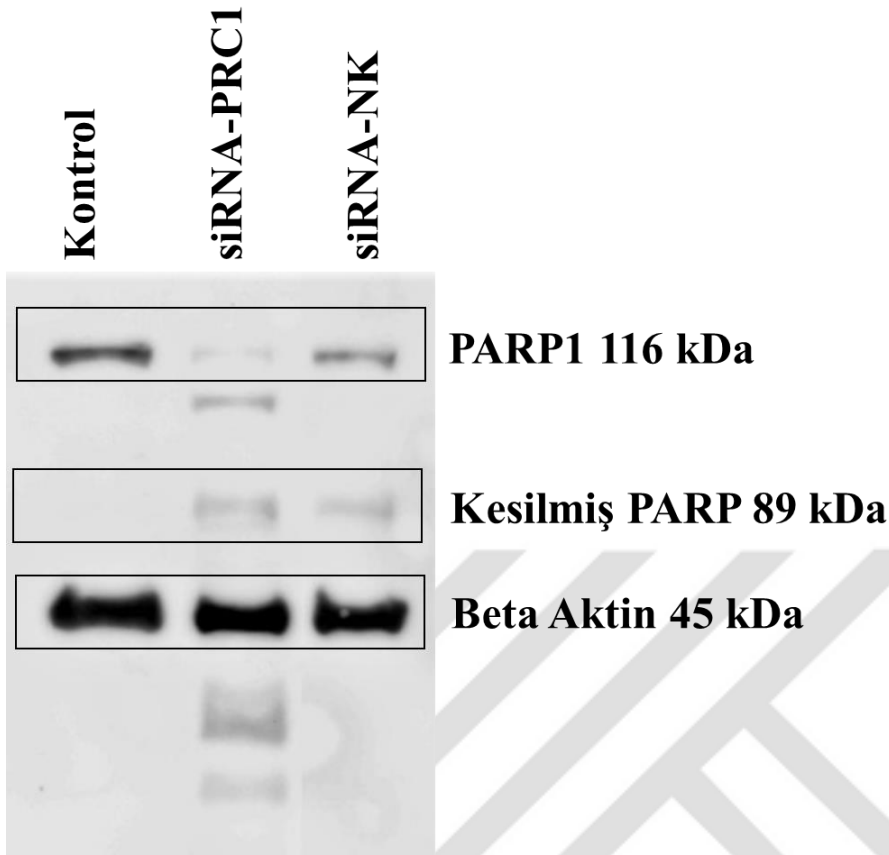
Şekil 46. siRNA-PRC1, siRNA-NK ve Kontrol gruplarında canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri
 (**** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)

Canlılık açısından değerlendirildiğinde, hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubunda canlı hücre oranı %95,07 iken, siRNA-NK grubunda %89,37 ve siRNA-PRC1 grubunda %76,21 olarak gözlemlendi. Erken apoptotik hücreler ise en fazla siRNA-PRC1 grubunda %23,11 olarak bulundu. Toplam apoptotik hücre yüzdeleri; kontrol grubunda %4,79, siRNA-NK grubunda %10,56 ve siRNA-PRC1 grubunda %23,69 olarak bulundu (Şekil 47).



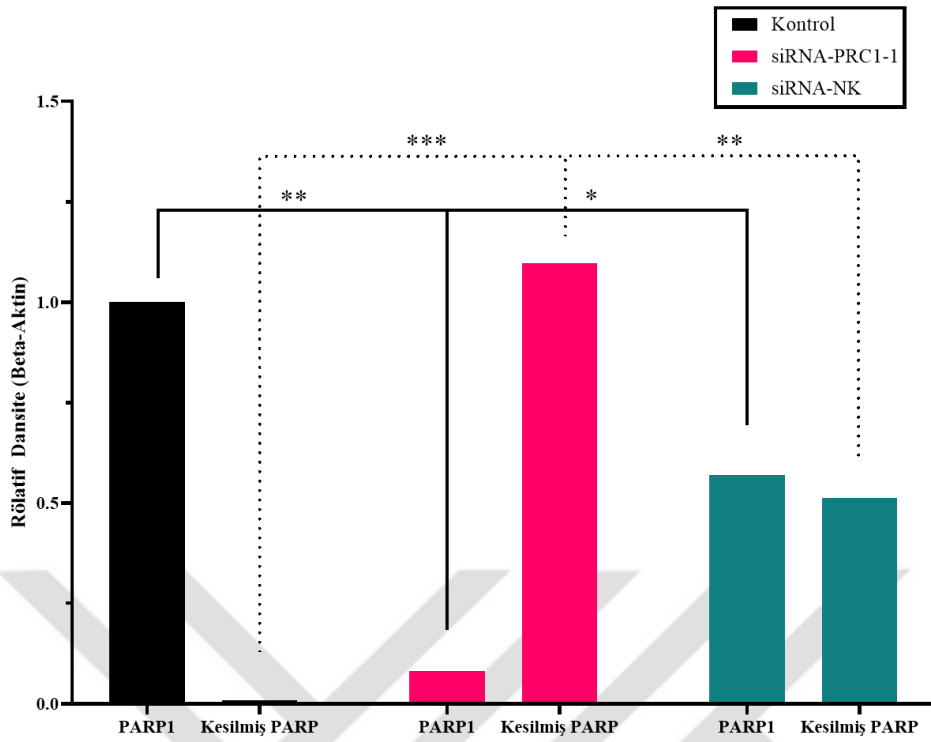
Şekil 47. Kontrol, siRNA-NK ve siRNA-PRC1 gruplarında apoptoz ve popülasyon profilleri

Aynı zamanda kaspaz kaskadının aktivasyonunu göstermek ve flow sitometri bulgularını doğrulamak için kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında western blot yöntemi ile Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) antikoru ile protein seviyeleri değerlendirildi (Şekil 48).



Şekil 48. Saos-2 hücre hattında kontrol, siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında PARP1, kesilmiş PARP ve Beta aktin protein seviyeleri

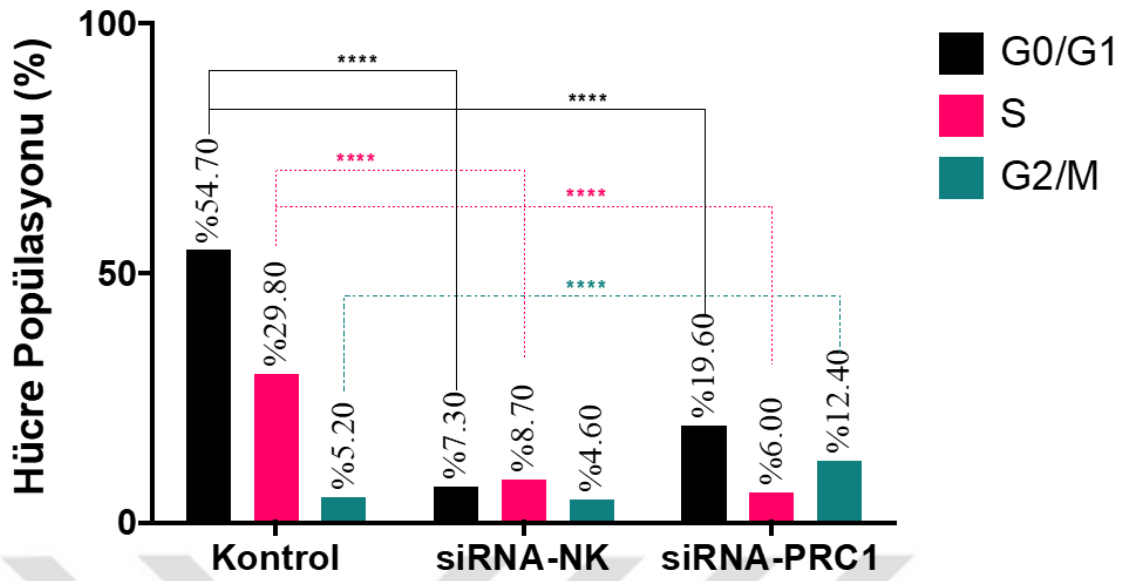
PARP1 protein seviyeleri, kontrol grubuna göre siRNA-PRC1 grubunda %93, siRNA-NK grubunda %59 azaldı. Kesilmiş PARP proteini ise kontrol grubunda eksprese olmadı. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre siRNA-PRC1 grubunda PARP1'deki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0067$). siRNA-PRC1 grubunda kesilmiş PARP protein ekspresyon seviyesindeki artış da kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak bulundu ($p=0,0005$) (Şekil 49).



Şekil 49. siRNA-PRC1 ve siRNA-NK gruplarında PARP1 ve kesilmiş PARP rölatif protein seviyelerinin kontrol grubuna göre karşılaştırılması

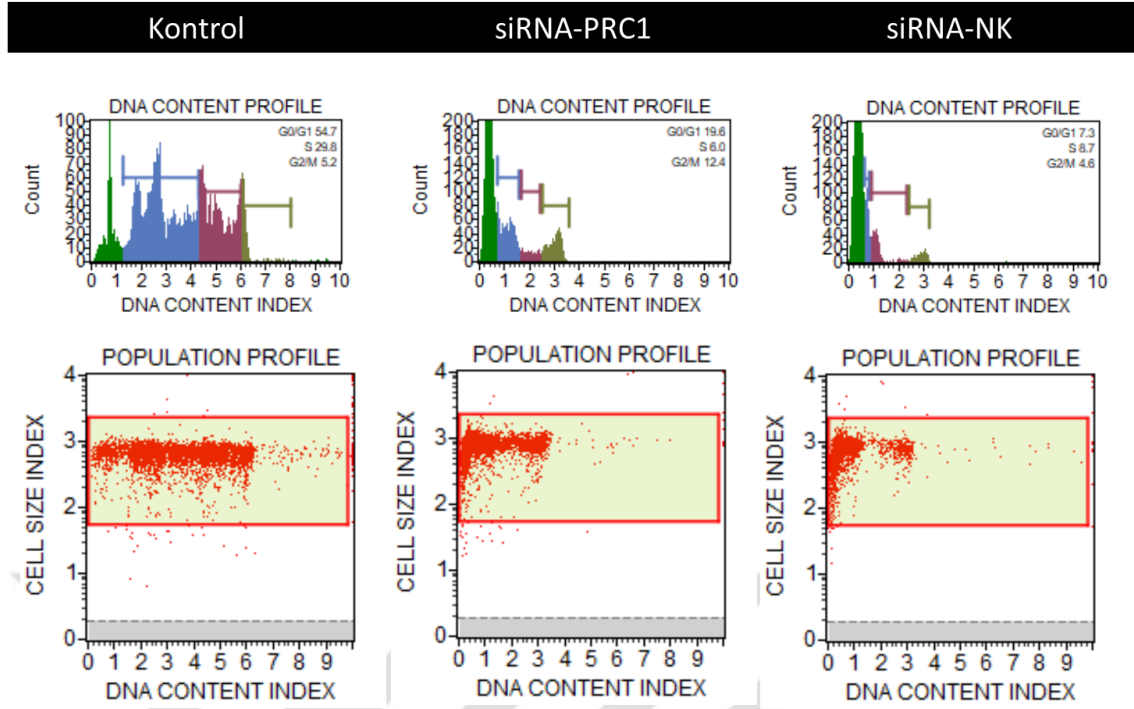
(* p<0,05 , ** p<0,01 ve *** p<0,001'i göstermektedir)

Transfeksiyon sonrası hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M ardışık evrelerindeki değişimler hücre döngüsü analizi ile incelendi. Dinlenme halinde (G0/G1 fazı) hücreler her kromozomun iki kopyasını içermektedir. Hücre döngüye girdiğinde kromozom DNA'sı sentezlenmeye başlamakta (S fazı) ve G2/M fazında bütün kromozom DNA'sı iki katına çıkmaktadır. Bu aşamadaki hücreler, G0/G1 fazındaki hücrelere oranla iki kat daha yoğun floresan ışığı yaymakta ve testin prensibi buna dayanmaktadır. Hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücreleri ile kıyaslandığında, hem siRNA-PRC1 hem de siRNA-NK grubunda G0/G1 ve S fazlarında azalma görüldü ve bu azalma istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$). G2/M fazında ise, kontrol grubuna kıyasla sadece siRNA-PRC1 grubu istatistiki olarak anlamlı şekilde bir artış gösterdi ($p<0,0001$) (Şekil 50).



Şekil 50. siRNA-PRC1, siRNA-NK ve Kontrol gruplarında hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre yüzdeleri
 (**** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)

Kontrol grubunda G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücrelerin yüzdeleri sırasıyla %54,7 , %29,8 ve %5,2 , siRNA-NK grubunda sırasıyla %7,3 , %8,7 ve %4,6 iken siRNA-PRC1 grubunda bu oranlar sırasıyla %19,6 , %6 ve %12,4 olarak bulundu. *PRC1*'in baskılanması ile G2/M fazında kalan hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü. Kontrol grubuna oranla, yaklaşık iki kattan daha fazla hücre mitotik evreye geçiş yapamadığı gözlemlendi (Şekil 51).



Şekil 51. Kontrol, siRNA-NK ve siRNA-PRC1 gruplarında DNA içerik indeksi ve popülasyon profilleri

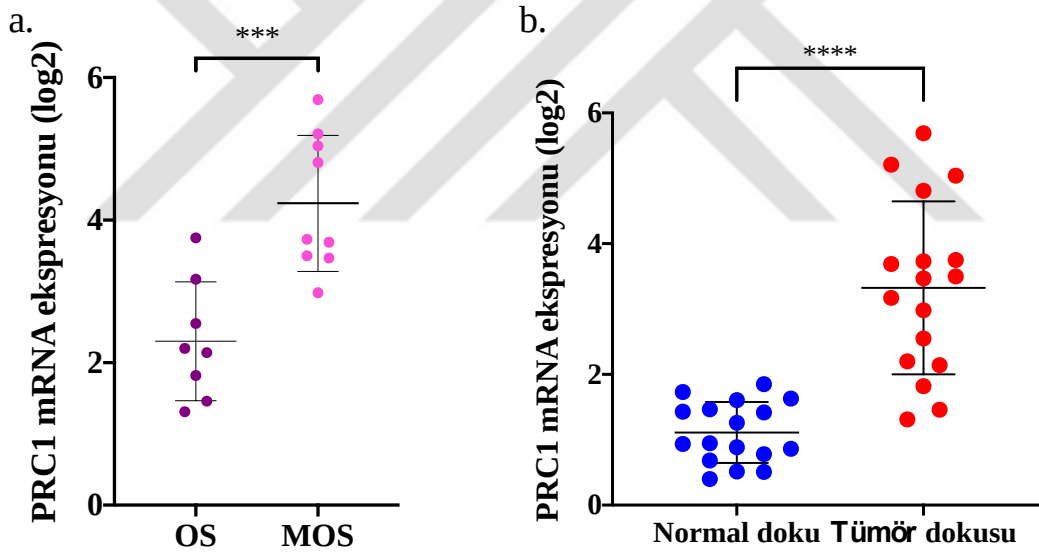
5. TARTIŞMA

Çoğunlukla mezenkimal hücrelerden kaynaklanan malign kemik tümörü OS, sıklıkla nüks ve metastaz yaparak, kötü prognoz ve yüksek mortalite ile seyretmektedir. MOS'larda görülen ağır tablolar, hastaların sağkalımını etkileyen ana faktörlerden biridir. Mevcut tedavi stratejileri, hem OS hem de MOS hastalarında sınırlı etkinliğe sahiptir. Bu sebeple, OS ve MOS hastalarında tanı ve tedavi amaçlı erken dönem moleküler biyobelirteçlerinin geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda, kemik tümörlerinde proliferasyon, invazyon ve tedaviye direncin altında yatan biyolojik mekanizmalar oldukça kompleks ve çok aşamalı olmakla birlikte, hala belirsizliklerini korumaktadırlar. Bu nedenle, farklı tedavi yaklaşımları araştırmak, hastaların klinik seyirlerini iyileştirmek için yeni belirteçleri tanımlamak ve moleküler yolları karakterize etmek hastalığın patogenezinin tanımlanması için oldukça kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızda incelediğimiz 17 olgunun normal ve tümör dokularındaki *PRC1*, *RRM1*, *EFEMP2*, *EIF4G2*, *MAGEA3* ve *CDKN3* genlerinin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, hem *PRC1* hem de *EFEMP2* gen ekspresyonlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p = 0,0008$). Fibulin-4 olarak da adlandırılan *EFEMP2*, ESM'de görev yapan fibulin ailesinden bir glikoproteindir [127]. *EFEMP2*, bağ dokusu gelişimi ve elastik lif oluşumu için gereklidir [128]. Bazal membrana lokalize olmaları sebebiyle, hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen yapılarda rol almakta, görev bozuklukları durumunda ise tümör oluşumunu destekledikleri gösterilmiştir [129-132]. Li ve ark. yaptıkları çalışmada, *EFEMP2* protein seviyelerini OS olgularında İHK ile değerlendirerek, artışını bulmuşlardır. Ayrıca *EFEMP2* artışının tümör büyümesi ile ilişki olduğunu göstermişlerdir [133]. Yapılan benzer diğer bir çalışmada ise, artmış *EFEMP2* seviyelerinin OS hastalarının kötü prognozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [134]. Bizim çalışmamızda da normal dokularla kıyaslandığında, *EFEMP2* rölatif gen ekspresyon seviyelerinin tümör dokularında istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. OS ve MOS gruplarında gen seviyelerindeki artış, kendi içinde değerlendirildiğinde anlamlı olarak bulunsa da, iki grup birbirleriyle kıyaslandığında aralarında bir fark bulunamamıştır. Bu bulgu *EFEMP2*'nin OS hastalığının oluşumunda

onkojenik özellik göstermesine rağmen, metastaz yapan hastalar için ayırıcı bir molekül olabilme ihtimalinin yüksek olmadığını düşündürmüştür.

Yapılan analizler, özellikle MOS grubunda *PRC1*'in hem mRNA hem de protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiğini gösterilmiştir (Şekil 52-53). Gen ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde, hem bütün olgularda hem de OS grubuna kıyasla MOS grubunda *PRC1* mRNA ekspresyonunun yükseldiği bulunmuştur (Şekil 52a-b). Bununla birlikte *PRC1* protein ekspresyonu için de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 53a-b). *PRC1*'in aşırı ekspresyonunun hem mRNA hem de protein seviyesinde metastaz varlığı ile ilişkili olduğu ve artmış protein seviyelerinin kısa sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular *PRC1*'in agresif tümör gelişimiyle bağlantılı olabileceğini düşündürmüştür.



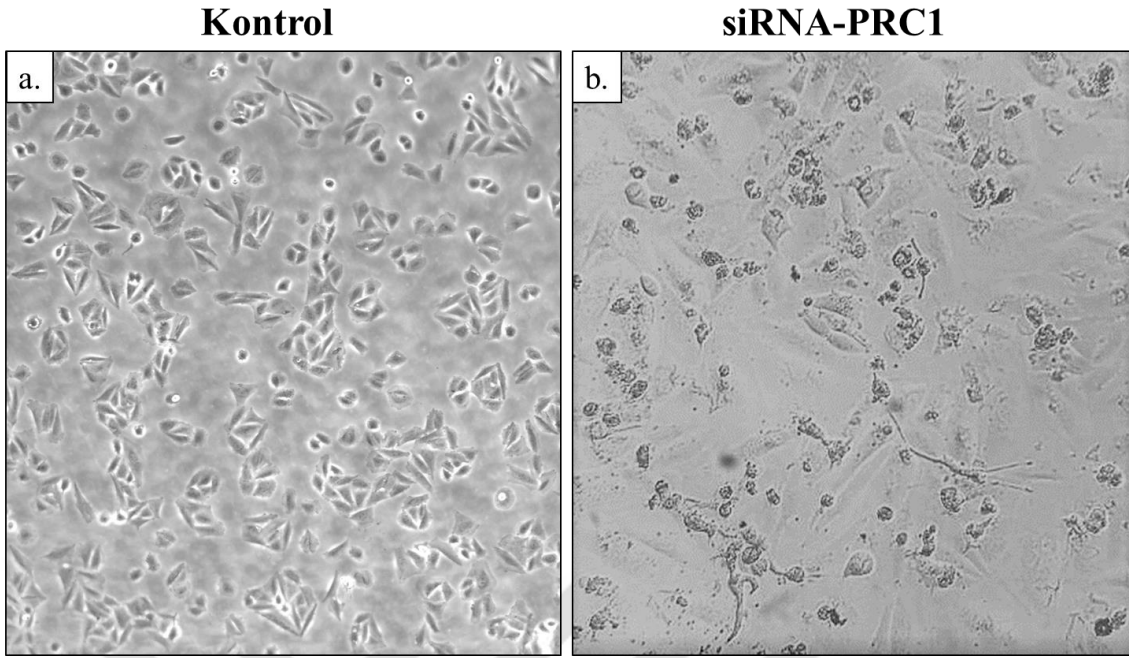
Şekil 52. (a) *PRC1* gen ekspresyon seviyelerinin metastaz yapmayan ve yapan olgular ile (b) normal ve tümör dokuları arasında karşılaştırılması
(*** $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ 'i göstermektedir)

sayısal anomaliler OS patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Yüksek gradlı tümörlerde kromozomal instabilite ve kompleks karyotipler sıklıkla görülmektedir. 13q14.2'de *RB1* ve 17p13.1'de *TP53* TSG'lerini içeren kromozomların kısmi ya da tamamen kaybı OS'lerde görülen bir bulgudur [137]. DNA hasarı sonrası aktive olan *RB1* ve *TP53* proteinleri hücre döngüsünü durdurarak, apoptozu indüklemeye özelliğine sahiptir. Bu proteinleri kodlayan genlerin kaybı sonrasında hücre bölünme kontrolünü kaybederek, malign özellik kazanmaktadır [138, 139]. Bununla beraber *MYC*, *RUNX2* ve *E2F3* gibi protoonkogenleri üzerinde bulunduran kromozomların sayısal artışları ve gen amplifikasyonları ise bu genlerin kopya sayılarını arttırarak, OS patogeneğinde onkojenik bir rol oynamasını sağlamaktadır [140-143]. Çalışmamızda yapılan FISH analiziyle, MOS olgularında 15. kromozomun anöploidisinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak, hücredeki gen ve protein seviyelerinin değişmesiyle, *PRC1*'in olası bir onkogen olarak işlev göstererek tümör oluşumunu destekleyici bir rol oynayabileceği akla gelmiştir.

Sitokinezde önemli rol oynayan *PRC1*'in OS hücrelerinde aşırı ekspresyonu sitokinezde anomalilere neden olarak, kromozom instabilitesi ve malign transformasyona yol açmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda *PRC1*; meme, akciğer, yumurtalık, hepatosellüler, prostat ve oral skuamöz hücreli kanser ile retinoblastomada tümör oluşumunda rol oynayan onkojenik bir faktör olarak bulmuştur. Luo ve ark. prostat kanseri hastalarında yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer olarak, *PRC1*'in mRNA ve protein seviyelerini yüksek olarak bulmuşlardır. Bulguları *PRC1*'in anormal ekspresyonunun prostat kanseri olan erkeklerde biyokimyasal olarak rekürrensi öngörebileceğini ve hastalığın önemli bir prognostik belirteç potansiyeli olduğunu göstermiştir [144]. Zhan ve ark. da benzer şekilde, akciğer adenokarsinom hastalarının dokularını normal dokuları ile kıyaslamış, artan *PRC1* mRNA ve protein seviyelerini göstermişlerdir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde yaptıkları analizlerle *PRC1* proteinin aşırı ekspresyonunun lenf düğümleri metastazı ile ilişkili olduğunu ve akciğer adenokarsinomu hastaları için kötü prognoz göstergesi olduğunu bulmuşlardır [145]. Bu ve ark. yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hastalarında *PRC1*'in hem mRNA hem protein seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir. Özellikle *BRCA* gen mutasyonu olmayan hastalarda *PRC1* seviyelerinin yükseldiğini ve in vitro olarak *PRC1*'in baskılanması ile yumurtalık kanseri hücre hattının proliferasyonunun, metastatik özelliğinin ve ilaç direncinin azaldığını belirtmişlerdir [146]. Bunlarla

birlikte oral skuamöz hücreli kanser [147], retinoblastoma [148] , hepatosellüler kanser [149, 150], nazofarenks kanseri [151] ve meme kanserinin [152] artmış *PRC1* ekspresyonu ile olan ilişkileri de gösterilmiştir. *PRC1*'in sadece tümörögenез değil, diğer çeşitli hastalıklarla da ilişkisi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Rao ve ark. *PRC1*'in Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinden glioma ilişkili onkogen homoloğu 1-bağımlı osteopontinin ekspresyonunu artırarak karaciğer fibrozisini kötüleştirdiğini bulmuştur [153].

Bizim çalışmamızda da literatürde ilk defa OS olgularında ve OS hücre hattında *PRC1* seviyelerinin arttığı ve hastalığın metastazı ile olan ilişkisi gösterilmiştir. Yapılan analizler, *PRC1*'in aşırı ekspresyonunun akciğer metastazı ve kötü sağkalım için bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Bununla beraber in vitro çalışmalarımız *PRC1* geninin OS hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozunda önemli bir fonksiyon taşıdığını göstermiştir. *PRC1*, iğ ipliklerinin uzamasını engellemek amacıyla normal hücre bölünmesi sırasında profazda kromozom sentromerlerinde, metafaz ve anafazın başında ise ekvator düzleminde yer almaktadır. Temel işlevini telofaz evresinde aktin ve kinazları boğumlanma bölgesinde toplayarak gerçekleştirmektedir [154]. Yapılan in vitro deneylerde, *PRC1* siRNA'sı ile transfekte edilen Saos-2 hücrelerinin çekirdek bütünlüğünün değiştiği ve hücre şekillerinin bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 54). Çalışmamızda *PRC1* geninin baskılanması ile daha fazla OS hücresinin G2/M fazında bloke olarak mitozun sonlandırılmasına neden olduğu gösterilmiştir. *PRC1*, G2 fazında fazlaca eksprese edildiği için iğ ipliklerinin uzamasını ve polaritesini düzenlemektedir [155]. Bu nedenle, *PRC1* geninin baskılanması ile iğ iplikleri normal işlevlerini yerine getirememiş ve G2/M fazında birikme meydana gelmiştir. Hücre döngüsünde meydana gelen bozulma sonucunda ise hücre proliferasyonu baskılanmıştır. Bu bulgular, *PRC1*'in hücre döngüsünü düzenlenmede önemli bir katkısının olduğunu göstermiştir.



Şekil 54. Kontrol olarak muamele edilmeden kültüre edilen Saos-2 hücre hattı (a) ile *PRC1* geni ile transfeke edildikten sonra kültüre edilen Saos-2 hücre hattının faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü
(x200 büyütme)

Bu bulguyu destekleyecek şekilde; siRNA-PRC1 grubunda kültürü yapılan Saos-2 hücrelerinde yüzeye yapışmayan ve ölü hücre sayısının arttığı görülmüştür. Yapılan apoptoz deneyleri sonucunda, *PRC1* geninin baskılanması ile mitoz-ilişkili mekanizmaların etkilendiği ve OS hücrelerinin apoptoza uğradığı gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, siRNA-NK grubundaki toplam apoptotik hücre sayısı 2 kat artmışken, siRNA-PRC1 grubunda toplam apoptotik hücre sayısı 5 kat artmıştır. Bu bulgular transfeksiyon sonrası hücre canlılık yüzdeleri ile tutarlı olarak bulunmuştur. MTT testi ile 48 saat sonunda siRNA-NK hücrelerinde ölüm oranları (Ölüm oranı=100-Canlı hücre yüzdesi) %15 iken, siRNA-PRC1 grubunda bu oran %27 olarak gözlenmiştir. *PRC1* ile transfeksiyon yapılan Saos-2 hücrelerinde apoptotik hücre sayısı apoptoz analizinde siRNA-NK grubuna göre 2,2 kat, MTT analizinde ise 1,8 kat artmış olarak gözlenmiştir. MTT analizi, *PRC1* yokluğunda hücre canlılığının zamanla azaldığını göstermiştir. Bu bulgu OS hücrelerinin proliferasyon için *PRC1*'e ihtiyacı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, *PRC1*'in OS hastalarında sitokinez ile ilişkili yollar aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyonunu teşvik ettiği sonucuna varılmıştır.

Aynı zamanda kaspaz kaskadının aktivasyonunu göstermek ve flow sitometri bulgularını doğrulamak için western blot yöntemi ile PARP1 ve kesilmiş PARP'ın protein seviyeleri incelenmiştir. PARP, DNA hasarlarının tamiri sürecinde, apoptozda ve genetik stabilitenin korunmasında rol oynayan DNA-bağlayıcı bir enzim olarak görev yapmaktadır. DNA'da oluşan hasarın onarımını sağlamak için hücre döngüsünde kontrol noktaları ve apoptotik yolak seri olarak koordine olmaktadır. Eğer onarım hızlıca gerçekleşmezse, oluşan hasar hücre döngüsünü etkileyerek, hücrenin apoptozdan kaçmasına ve genom stabilitesinin bozulmasına neden olur [156]. Hasar kontrolünde önemli bir görevi olan PARP, DNA hasarlarına yanıt olarak aktive olmakta ve p53'ü aktifleştirmektedir. p53 proteini Bcl-2'yi baskılayarak ve Fas'ı aktive ederek hasarlı hücreyi apoptozla yönlendirmesi sonucu hücre ölümünü sağlamaktadır. DNA tamirinde görev yapan PARP'ın ekspresyonunun artması hücre döngüsü arresti ve apoptozu indükleyerek hücrenin kontrolden çıkmasına ve malign özellik kazanmasına neden olmaktadır [157, 158]. Çalışmamızda beklenildiği gibi, siRNA-PRC1 grubunda kesilmiş-PARP protein seviyesi, kontrol ve siRNA-NK gruplarına göre artmış olarak gözlemlenmiştir. Kontrol ve siRNA-NK gruplarında PARP1 protein ekspresyon seviyeleri artmışken, siRNA-PRC1 grubunda PARP1 protein ekspresyon seviyesi azalmış, kesilmiş-PARP protein ekspresyon seviyesi ise artmıştır. Kesilmiş-PARP düzeylerindeki artış, PRC1 geninin OS hücrelerinde baskılanması ile malign hücrelerin apoptozunun uyarıldığını ve PARP-ilişkili DNA onarımının indüklendiğini göstermektedir.

Hücrelerin büyümesini teşvik edici sinyal yollarının engellenmesi ile tümör hücrelerini apoptozla yönlendirmek çoğu kanser tedavisi için önemli bir yaklaşımdır [159]. Çalışmamızda OS hücrelerinde PRC1'in hücre ölümündeki rolü araştırılmış ve genin baskılanması ile apoptozun anlamlı bir şekilde indüklendiği gösterilmiştir. Sonuçlarımız, özellikle metastatik OS hastalarının tedavisinde, *PRC1*'in baskılanması ile tümör hücrelerinin büyümesinin engellenebileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde edilen veriler ile PRC1 gen ve protein seviyelerinin OS'de yükseldiği gösterilmiştir. Yapılan literatür taraması daha önce benzer bir sonucun bulunmadığını göstermiştir. Ayrıca, PRC1'in klinikopatolojik, özellikle metastaz ile olan ilişkisi ve hastalığın patogeneziindeki rolü ilk kez gösterilmiş, prognostik bir belirteç olarak malignite tedavisinde yüksek potansiyel taşıdığı

bulunmuştur. Bunlarla birlikte, OS hastalığının düşük insidans oranı nedeniyle analizlerin yapıldığı örneklem grubu limitli olarak kalmıştır ve hastalığın altında yatan moleküler mekanizmanın tam olarak anlaşılması için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Kierszenbaum, A.L. and L.L. Tres, *Histology and cell biology : an introduction to pathology*. Fourth edition. ed. 2016, Philadelphia, PA: Elsevier. xiv, 734 pages.
2. Ralston, S.H., *Bone structure and metabolism*. Medicine, 2017. **45**(9): p. 560-564.
3. Guadalupe-Grau, A., et al., *Exercise and bone mass in adults*. Sports Med, 2009. **39**(6): p. 439-68.
4. Golden, N.H., S.A. Abrams, and N. Committee on, *Optimizing bone health in children and adolescents*. Pediatrics, 2014. **134**(4): p. e1229-43.
5. Mescher, A., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition: Text and Atlas, Thirteenth Edition*. 2013: McGraw-Hill Education.
6. Katsimbri, P., *The biology of normal bone remodelling*. Eur J Cancer Care (Engl), 2017. **26**(6).
7. Gkias, I., et al., *Factors affecting bone growth*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2015. **44**(2): p. 61-7.
8. Wang, Y., et al., *Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 379-407.
9. Kansara, M., et al., *Translational biology of osteosarcoma*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 722-35.
10. Mortus, J.R., Y. Zhang, and D.P. Hughes, *Developmental pathways hijacked by osteosarcoma*. Adv Exp Med Biol, 2014. **804**: p. 93-118.
11. Collins, M.T. and C.A. Stratakis, *Bone Formation, Growth, and Repair*. Horm Metab Res, 2016. **48**(11): p. 687-688.
12. Bianco, P., et al., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 180-92.
13. Rauch, F., *Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005. **5**(3): p. 194-201.
14. van der Eerden, B.C., M. Karperien, and J.M. Wit, *Systemic and local regulation of the growth plate*. Endocr Rev, 2003. **24**(6): p. 782-801.

15. Daughaday, W.H., et al., *Somatomedin: proposed designation for sulphation factor*. Nature, 1972. **235**(5333): p. 107.
16. Wassner, A.J., *Pediatric Hypothyroidism: Diagnosis and Treatment*. Paediatr Drugs, 2017. **19**(4): p. 291-301.
17. Leger, J., et al., *Graves' disease in children*. Ann Endocrinol (Paris), 2018. **79**(6): p. 647-655.
18. Kim, H.Y. and S. Mohan, *Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development*. Bone Res, 2013. **1**(2): p. 146-61.
19. Kim, H.J., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2152-60.
20. Abu, E.O., et al., *The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(2): p. 883-9.
21. Kim, H.J., et al., *Glucocorticoids and the osteoclast*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1116**: p. 335-9.
22. Canalis, E. and A.M. Delany, *Mechanisms of glucocorticoid action in bone*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 73-81.
23. Montecucco, C., et al., *Sex hormones and bone metabolism in postmenopausal rheumatoid arthritis treated with two different glucocorticoids*. J Rheumatol, 1992. **19**(12): p. 1895-900.
24. Robson, H., et al., *Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth*. Pediatr Res, 2002. **52**(2): p. 137-47.
25. Menagh, P.J., et al., *Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(4): p. 757-68.
26. Yeh, J.K., M.M. Chen, and J.F. Aloia, *Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy*. Am J Physiol, 1997. **273**(4): p. E734-42.
27. Kidder, L.S., et al., *Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats*. Calcif Tissue Int, 1997. **61**(4): p. 327-35.
28. Vanderschueren, D., et al., *Androgens and bone*. Endocr Rev, 2004. **25**(3): p. 389-425.

29. Manolagas, S.C., C.A. O'Brien, and M. Almeida, *The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(12): p. 699-712.
30. St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, and A.P. McMahon, *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2072-86.
31. Vortkamp, A., et al., *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. Science, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
32. Turner, C.H., *Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli*. Bone, 1998. **23**(5): p. 399-407.
33. Gkias, I., et al., *The Multifactorial Role of Peripheral Nervous System in Bone Growth*. 2017. **5**(44).
34. Bilezikian, J.P., L.G. Raisz, and T.J. Martin, *Principles of bone biology*. 3rd ed. 2008, San Diego, Calif.: Academic Press/Elsevier.
35. Specker, B. and T. Binkley, *Randomized trial of physical activity and calcium supplementation on bone mineral content in 3- to 5-year-old children*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(5): p. 885-92.
36. Parfitt, A.M., *Parathyroid hormone and periosteal bone expansion*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(10): p. 1741-3.
37. in *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General*. 2004: Rockville (MD).
38. Özer, M., A. Erol, and C. Celik, *Paget's Disease of bone: A case report*. Türk Osteoporoz Dergisi, 2015. **22**.
39. Ashford, R.U.J.E.J.o.O.S. and Traumatology, F. Bronner, M. C. Farach-Carson (eds): *Bone and cancer*. 2011. **21**(3): p. 219-219.
40. Rickel, K., F. Fang, and J. Tao, *Molecular genetics of osteosarcoma*. Bone, 2017. **102**: p. 69-79.
41. Rosenberg, A.E., *WHO Classification of Soft Tissue and Bone, fourth edition: summary and commentary*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(5): p. 571-3.
42. Franchi, A., *Epidemiology and classification of bone tumors*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2012. **9**(2): p. 92-5.
43. Bronner, F. and M.C. Farach-Carson, *Bone and cancer*. Topics in bone biology. 2009, London: Springer. xviii, 264 pages.

44. Simpson, E. and H.L. Brown, *Understanding osteosarcomas*. JAAPA, 2018. **31**(8): p. 15-19.
45. Hasegawa, T., et al., *Osteosarcoma with epithelioid features. An immunohistochemical study*. Arch Pathol Lab Med, 1993. **117**(3): p. 295-8.
46. Kramer, K., et al., *Epithelioid osteosarcoma of bone. Immunocytochemical evidence suggesting divergent epithelial and mesenchymal differentiation in a primary osseous neoplasm*. Cancer, 1993. **71**(10): p. 2977-82.
47. Kansara, M. and D.M. Thomas, *Molecular pathogenesis of osteosarcoma*. DNA Cell Biol, 2007. **26**(1): p. 1-18.
48. Misaghi, A., et al., *Osteosarcoma: a comprehensive review*. SICOT J, 2018. **4**: p. 12.
49. Jaffe, N., Ø.S. Bruland, and S.S. Bielack, *Pediatric and adolescent osteosarcoma*. Cancer treatment and research. 2009, New York: Springer. xx, 591 p.
50. Abate, M.E., et al., *Non-metastatic osteosarcoma of the extremities in children aged 5 years or younger*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(4): p. 652-4.
51. Hartford, C.M., et al., *Osteosarcoma among children aged 5 years or younger: the St. Jude Children's Research Hospital experience*. J Pediatr Hematol Oncol, 2006. **28**(1): p. 43-7.
52. Nie, Z. and H. Peng, *Osteosarcoma in patients below 25 years of age: An observational study of incidence, metastasis, treatment and outcomes*. Oncol Lett, 2018. **16**(5): p. 6502-6514.
53. Ottaviani, G. and N. Jaffe, *The epidemiology of osteosarcoma*. Cancer Treat Res, 2009. **152**: p. 3-13.
54. Bertuccio, P., et al., *Cancer mortality in Europe in 2015, and an overview of trends since 1990*. Ann Oncol, 2019.
55. Tiwari, A., *Current concepts in surgical treatment of osteosarcoma*. J Clin Orthop Trauma, 2012. **3**(1): p. 4-9.
56. Li, W. and S. Zhang, *Survival of patients with primary osteosarcoma and lung metastases*. J BUON, 2018. **23**(5): p. 1500-1504.
57. Isakoff, M.S., et al., *Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success*. J Clin Oncol, 2015. **33**(27): p. 3029-35.

58. Anderson, M.E., *Update on Survival in Osteosarcoma*. Orthop Clin North Am, 2016. **47**(1): p. 283-92.
59. Fuchs, B. and D.J. Pritchard, *Etiology of osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 2002(397): p. 40-52.
60. Finkel, M.P., B.O. Biskis, and P.B. Jinkins, *Virus induction of osteosarcomas in mice*. Science, 1966. **151**(3711): p. 698-701.
61. Finkel, M.P., C.A. Reilly, Jr., and B.O. Biskis, *Pathogenesis of radiation and virus-induced bone tumors*. Recent Results Cancer Res, 1976(54): p. 92-103.
62. Van der Spuy, D. and G.J.S.O.J. Vlok, *Osteosarcoma: Pathology, staging and management*. 2009. **8**(3): p. 69-78.
63. Mohseny, A.B.J.A.o.G., C.i. Oncology, and Haematology, *Bone: conventional osteosarcoma*. 2009.
64. Kumar, V., et al., *Robbins basic pathology*. Tenth edition. ed. 2018, Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier. xiv, 935 pages.
65. Wadhwa, N., *Osteosarcoma: Diagnostic dilemmas in histopathology and prognostic factors*. Indian J Orthop, 2014. **48**(3): p. 247-54.
66. Nielsen, G.P. and A.E. Rosenberg, *Diagnostic Pathology: Bone*. 2017: Elsevier Health Sciences.
67. Moore, D.D. and H.H. Luu, *Osteosarcoma*. Cancer Treat Res, 2014. **162**: p. 65-92.
68. Ritter, J. and S.S. Bielack, *Osteosarcoma*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii320-5.
69. McDonald, J. and T.D. DenOtter, *Codman Triangle*, in *StatPearls*. 2019: Treasure Island (FL).
70. Simpson, S., et al., *Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics*. Acta Vet Scand, 2017. **59**(1): p. 71.
71. Steffner, R.J. and E.S. Jang, *Staging of Bone and Soft-tissue Sarcomas*. J Am Acad Orthop Surg, 2018. **26**(13): p. e269-e278.
72. Enneking, W.F., S.S. Spanier, and M.A. Goodman, *A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 1980(153): p. 106-20.

73. Casali, P.G., et al., *Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv79-iv95.
74. Bishop, M.W., K.A. Janeway, and R. Gorlick, *Future directions in the treatment of osteosarcoma*. Curr Opin Pediatr, 2016. **28**(1): p. 26-33.
75. Luetke, A., et al., *Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(4): p. 523-32.
76. Harrison, D.J., et al., *Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma*. Expert Rev Anticancer Ther, 2018. **18**(1): p. 39-50.
77. Rode, A., et al., *Chromothripsis in cancer cells: An update*. Int J Cancer, 2016. **138**(10): p. 2322-33.
78. Gorlick, R., *Current concepts on the molecular biology of osteosarcoma*. Cancer Treat Res, 2009. **152**: p. 467-78.
79. Lin, Y.H., et al., *Osteosarcoma: Molecular Pathogenesis and iPSC Modeling*. Trends Mol Med, 2017. **23**(8): p. 737-755.
80. Du, W. and J. Pogoriler, *Retinoblastoma family genes*. Oncogene, 2006. **25**(38): p. 5190-200.
81. Kovac, M., et al., *Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8940.
82. Franceschini, N., et al., *What's new in bone forming tumours of the skeleton?* Virchows Arch, 2019.
83. Chen, X., et al., *Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma*. Cell Rep, 2014. **7**(1): p. 104-12.
84. Nishijo, K., et al., *Mutation analysis of the RECQL4 gene in sporadic osteosarcomas*. Int J Cancer, 2004. **111**(3): p. 367-72.
85. Goto, M., et al., *Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**(4): p. 239-46.
86. Moll, U.M. and O. Petrenko, *The MDM2-p53 interaction*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1001-8.
87. Mejia-Guerrero, S., et al., *Characterization of the 12q15 MDM2 and 12q13-14 CDK4 amplicons and clinical correlations in osteosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(6): p. 518-25.

88. Salinas-Souza, C., et al., *GNAS mutations are not detected in parosteal and low-grade central osteosarcomas*. *Mod Pathol*, 2015. **28**(10): p. 1336-42.
89. Sinovic, J.F., J.A. Bridge, and J.R. Neff, *Ring chromosome in parosteal osteosarcoma. Clinical and diagnostic significance*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992. **62**(1): p. 50-2.
90. Szymanska, J., et al., *Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13-15: a combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996. **16**(1): p. 31-4.
91. Baumhoer, D., F. Amary, and A.M. Flanagan, *An update of molecular pathology of bone tumors. Lessons learned from investigating samples by next generation sequencing*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019. **58**(2): p. 88-99.
92. Stephens, P.J., et al., *Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development*. *Cell*, 2011. **144**(1): p. 27-40.
93. Behjati, S., et al., *Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15936.
94. Cress, W.D., P. Yu, and J. Wu, *Expression and alternative splicing of the cyclin-dependent kinase inhibitor-3 gene in human cancer*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017. **91**(Pt B): p. 98-101.
95. Fan, C., et al., *Overexpression of major CDKN3 transcripts is associated with poor survival in lung adenocarcinoma*. *Br J Cancer*, 2015. **113**(12): p. 1735-43.
96. Yu, Y., et al., *Aberrant splicing of cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase KAP increases proliferation and migration in glioblastoma*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 130-8.
97. Yeh, C.T., et al., *Aberrant transcripts of the cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4697-700.
98. Nalepa, G., et al., *The tumor suppressor CDKN3 controls mitosis*. *J Cell Biol*, 2013. **201**(7): p. 997-1012.
99. Gu, Y., J. Rosenblatt, and D.O. Morgan, *Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15*. *EMBO J*, 1992. **11**(11): p. 3995-4005.
100. Li, J., et al., *PRC1: Linking Cytokinesis, Chromosomal Instability, and Cancer Evolution*. *Trends Cancer*, 2018. **4**(1): p. 59-73.

101. She, Z.Y., et al., *Mechanisms of the Ase1/PRC1/MAP65 family in central spindle assembly*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2019. **94**(6): p. 2033-2048.
102. Lee, K.Y., T. Davies, and M. Mishima, *Cytokinesis microtubule organisers at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 15): p. 3495-500.
103. Lens, S.M.A. and R.H. Medema, *Cytokinesis defects and cancer*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(1): p. 32-45.
104. Tanaka, K. and T. Hirota, *Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1866**(1): p. 64-75.
105. Potapova, T.A., J. Zhu, and R. Li, *Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(3-4): p. 377-89.
106. Bepler, G., et al., *RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4731-7.
107. Zhu, C.M., et al., *Prognostic value of ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) in non-small cell lung cancer: A meta-analysis*. Clin Chim Acta, 2018. **485**: p. 67-73.
108. Xu, X.L., et al., *RRM1 *151A>T, RRM1 -756T>C, and RRM1 -585T>Gis associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese patients*. Cancer Med, 2016. **5**(8): p. 2084-90.
109. Wang, Q., et al., *Ribonucleotide reductase large subunit M1 predicts poor survival due to modulation of proliferative and invasive ability of gastric cancer*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70191.
110. Besse, B., K.A. Olaussen, and J.C. Soria, *ERCC1 and RRM1: ready for prime time?* J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 1050-60.
111. Gautam, A., Z.R. Li, and G. Bepler, *RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways*. Oncogene, 2003. **22**(14): p. 2135-42.
112. Huang, L., et al., *EFEMP2 indicates assembly of M0 macrophage and more malignant phenotypes of glioma*. Aging (Albany NY), 2020. **12**(9): p. 8397-8412.
113. Song, L., et al., *EFEMP2 Suppresses the Invasion of Lung Cancer Cells by Inhibiting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Down-Regulating MMPs*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 1375-1396.

114. Kang, N., et al., *EFEMP2 Inhibits Breast Cancer Invasion And Metastasis In Vitro And In Vivo*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 8915-8933.
115. Liberman, N., L. Marash, and A. Kimchi, *The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis*. Cell Cycle, 2009. **8**(2): p. 204-9.
116. Sonenberg, N. and T.E. Dever, *Eukaryotic translation initiation factors and regulators*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(1): p. 56-63.
117. Henis-Korenblit, S., et al., *The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5400-5.
118. Emmrich, S., et al., *miR-139-5p controls translation in myeloid leukemia through EIF4G2*. Oncogene, 2016. **35**(14): p. 1822-31.
119. Xie, X., et al., *MicroRNA-379 inhibits the proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma cells by targetting EIF4G2*. Biosci Rep, 2017. **37**(3).
120. Imataka, H., H.S. Olsen, and N. Sonenberg, *A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G*. EMBO J, 1997. **16**(4): p. 817-25.
121. Wischnewski, F., K. Pantel, and H. Schwarzenbach, *Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(5): p. 339-49.
122. Scanlan, M.J., et al., *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 22-32.
123. Esfandiary, A. and S. Ghafouri-Fard, *MAGE-A3: an immunogenic target used in clinical practice*. Immunotherapy, 2015. **7**(6): p. 683-704.
124. Adam, V., I. Wauters, and J. Vansteenkiste, *Melanoma-associated antigen-A3 vaccination in the treatment of non-small-cell lung cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(3): p. 365-76.
125. Haimes, J. and M. Kelley, *Demonstration of a AACq calculation method to compute relative gene expression from qPCR data*. Thermo Fisher Scientific Tech Note, 2010. **1**(1): p. 1-4.
126. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

127. Timpl, R., et al., *Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 479-89.
128. Giltay, R., R. Timpl, and G. Kostka, *Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4*. Matrix Biol, 1999. **18**(5): p. 469-80.
129. McLaughlin, P.J., et al., *Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1700-9.
130. Wang, T., et al., *Fibulin-4 is associated with prognosis of endometrial cancer patients and inhibits cancer cell invasion and metastasis via Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Oncotarget, 2017. **8**(12): p. 18991-19012.
131. Chen, J., et al., *Overexpression of fibulin-4 is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with cervical carcinoma*. Oncol Rep, 2014. **31**(6): p. 2601-10.
132. Chen, J., et al., *Fibulin-4 is associated with tumor progression and a poor prognosis in ovarian carcinomas*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 91.
133. Li, R. and L. Wang, *Fibulin-4 is a novel Wnt/beta-Catenin pathway activator in human osteosarcoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **474**(4): p. 730-735.
134. Zhang, D., et al., *Fibulin-4 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition via the PI3K/Akt/mTOR pathway*. Int J Oncol, 2017. **50**(5): p. 1513-1530.
135. Jiang, W., et al., *PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 877-85.
136. Subramanian, R., et al., *Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein*. Cell, 2010. **142**(3): p. 433-43.
137. Bridge, J.A., et al., *Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **95**(1): p. 74-87.
138. Miller, C.W., et al., *Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 1996. **122**(9): p. 559-65.
139. Yamaguchi, T., et al., *Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q*. Cancer Res, 1992. **52**(9): p. 2419-23.

140. Gupta, S., et al., *RUNX2 (6p21.1) amplification in osteosarcoma*. Hum Pathol, 2019. **94**: p. 23-28.
141. Smida, J., et al., *Genomic alterations and allelic imbalances are strong prognostic predictors in osteosarcoma*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(16): p. 4256-67.
142. Martin, J.W., et al., *Analysis of segmental duplications, mouse genome synteny and recurrent cancer-associated amplicons in human chromosome 6p21-p12*. Cytogenet Genome Res, 2010. **128**(4): p. 199-213.
143. Stock, C., et al., *Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **28**(3): p. 329-36.
144. Luo, H.W., et al., *Protein regulator of cytokinesis 1 overexpression predicts biochemical recurrence in men with prostate cancer*. Biomed Pharmacother, 2016. **78**: p. 116-120.
145. Zhan, P., et al., *PRC1 contributes to tumorigenesis of lung adenocarcinoma in association with the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 108.
146. Bu, H., et al., *Overexpression of PRC1 indicates a poor prognosis in ovarian cancer*. Int J Oncol, 2020. **56**(3): p. 685-696.
147. Wu, F., et al., *Regulation of proliferation and cell cycle by protein regulator of cytokinesis 1 in oral squamous cell carcinoma*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 564.
148. Liao, Y.J., et al., *PRC1 gene silencing inhibits proliferation, invasion, and angiogenesis of retinoblastoma cells through the inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. J Cell Biochem, 2019. **120**(10): p. 16840-16852.
149. Chen, J., et al., *The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/beta-catenin signalling pathway*. Gut, 2016. **65**(9): p. 1522-34.
150. Liu, X., et al., *Reducing protein regulator of cytokinesis 1 as a prospective therapy for hepatocellular carcinoma*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 534.
151. Yi, L., et al., *Long noncoding RNA PTPRG-AS1 acts as a microRNA-194-3p sponge to regulate radiosensitivity and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via PRC1*. J Cell Physiol, 2019. **234**(10): p. 19088-19102.

152. Shimo, A., et al., *Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells*. Cancer Sci, 2007. **98**(2): p. 174-81.
153. Rao, S., et al., *PRC1 promotes GLI1-dependent osteopontin expression in association with the Wnt/beta-catenin signaling pathway and aggravates liver fibrosis*. Cell Biosci, 2019. **9**: p. 100.
154. Mollinari, C., et al., *Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(3): p. 1043-55.
155. Shrestha, S., et al., *PRC1 controls spindle polarization and recruitment of cytokinetic factors during monopolar cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(7): p. 1196-207.
156. Tanuma, S.I., et al., *Targeting poly(ADP-ribose) glycohydrolase to draw apoptosis codes in cancer*. Biochem Pharmacol, 2019. **167**: p. 163-172.
157. Jin, W., et al., *Theabrownin triggers DNA damage to suppress human osteosarcoma U2OS cells by activating p53 signalling pathway*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(9): p. 4423-4436.
158. Cohausz, O. and F.R. Althaus, *Role of PARP-1 and PARP-2 in the expression of apoptosis-regulating genes in HeLa cells*. Cell Biol Toxicol, 2009. **25**(4): p. 379-91.
159. Pfeffer, C.M. and A.T.K. Singh, *Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).

ETİK KURUL KARARI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: A-05	Tarih: 03 NİSAN 2018
	Prof.Dr.Ayhan DEVİREN'in danışmanlığında Doktora Öğrencisi Uzm.Biyolog Sezen ATASOY'un yürütücülüğünde Yard.Doç.Dr.Tuğçe KIRAN'ın yardımcılığında yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
---------------	----------------------------------

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
--

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Muhlis Cem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Öner SÜZER	Tıbbi Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nurten Uzun ADATEPE	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Kongrede
Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oktay DEMİRKIRAN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr.Gülten DİNÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İstanbul Bilim Üniversitesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Zeynep Hande TURNA	İç Hastalıkları Medikal Onkoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mutlu NİYZOĞLU	İç Hastalıkları End./Metb./Diabet	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

Evrak Tarih ve Sayısı: 16/03/2018-1757



T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi



Sayı : 97706721-900-
Konu : Etik Kurul

İLGİLİ MAKAMA

İlgi : Uz. Bio. Sezen ATASOY'un, 12.03.2018 tarihli dilekçesi.

Uz. Bio. Sezen ATASOY'un ilgi dilekçesi gereğince, araştırma olarak belirlenen, "Osteosarkom Tanılı Hastalarda Genetik ve Kromozom Değişimlerinin Metastaz İle İlişkisinin İncelenmesi" isimli doktor tez projesinin Hastanemiz Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilecek materyaller ile yapılması adı geçenin, Etik Kurul onayı ile beraber başvurusu halinde Tıbbi Direktörlüğümüzce uygun bulunmuştur.

Gereğini bilgilerinize arz ve rica ederim.

e-imzalıdır

Prof.Dr. Fadlullah AKSOY
Hastane Tıbbi Direktörü

Mevcut Elektronik İmzalar

MEHMET FADLULLAH AKSOY (Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi - Hastane Tıbbi Direktörü) 16/03/2018 09:22

Evrak Doğrulama İçin : <https://etbys.bezmialem.edu.tr/en/Vision/Dogrula/AC11110>

Adres: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih /
İstanbul

Bilgi için: Esma ARAC
Ünvanı: Evrak Sorumlusu



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

OSTEOSARKOM TANILI HASTALARDA GENETİK VE KROMOZOM DEĞİŞİMLERİNİN METASTAZ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

orca.cf.ac.uk

İnternet Kaynağı

<%**1**

2

www.medicinescience.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

3

www.jove.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

DEMİRHAN, Özkan, DEMİRKAYA, Ahmet, ERŞEN, Ezel, ERCAN, Meltem and KAYNAK, Kamil. "Akciğer kanserinde serum ve dokuda eser element değişimlerinin incelenmesi", Türk Tüberküloz ve Toraks Derneği, 2010.

Yayın

<%**1**

5

Submitted to National University of Singapore

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

docplayer.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sezen	Soyadı	Atasoy
Email		Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE	2020
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE	2014
Lisans	Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2018 –
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		95

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri:

Doğanay Özge, Atasoy Sezen, Diker Nurettin, Alkan Alper (2020). Albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının insan dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi. Yeditepe J Dent. 2020; 16(3): 213-219 DOI: 10.5505/yeditepe.2020.71501

Şenol Halil, Çokuludağ Kübra, Aktaş Asude Sena, Atasoy Sezen, Dağ Aydan, Topçu Gülaçtı (2020). Synthesis of new fatty acid derivatives of oleanane and ursane triterpenoids and investigation of their in vitro cytotoxic effects on 3T3 fibroblast and PC3 prostate cancer cell lines. Organic Communications , vol.13, 114-126. DOI: <http://doi.org/10.25135/acg.oc.84.20.09.1792>

Birlik Demirel Gökçen, Aygül Ebru, Dağ Aydan, Atasoy Sezen, Çimen Zeynep, Çetin Büşra (2020). Folic Acid Conjugated pH and Redox-Sensitive Ellipsoidal Hybrid Magnetic Nanoparticles for Dual-Triggered Drug Release. ACS Applied Bio Materials, 3(8), 4949-4961. DOI: 10.1021/acsabm.0c00488

Atasoy Sezen (2020). Diz osteoartrit hastalarının periferik kan ve kıkırdak doku örneklerinde proinflatuvar sitokinlerin etkilerinin araştırılması. Akd Tıp Derg; 6: 373-381. DOI: 10.17954/amj.2020.2176

Omurtag Özgen Pınar Sinem, Atasoy Sezen, Zengin Kurt Belma, Durmuş Zehra, Yiğit Gülşah, Dağ Aydan (2020). Glycopolymer decorated multiwalled carbon nanotubes for dual targeted breast cancer therapy. Journal of Materials Chemistry B, 8(15), 3123-3137., DOI: 10.1039/C9TB02711D

Dağ Aydan, Omurtag Özgen Pınar Sinem, Atasoy Sezen (2019). Glyconanoparticles For Targeted Tumor Therapy Of Platinum Anticancer Drug. Biomacromolecules, 20(8), 2962-2972., DOI: 10.1021/Acs.Biomac.9b00528

Öden Seda, Atasoy Sezen, Deviren Ayhan, Demir Mustafa (2019). Cytogenetic Studies Of Chromosome Abnormalities In Thyroid Cancer Patients Before And After Iodine-131 Treatment. Bezmialem Science, 7(2), 118-123., DOI:10.14235/Bas.Galenos.2018.2571

Şenol, H., Güzeldemirci, N., & Atasoy, S. (2019). Synthesis Of New 4-Thiazolidinone Derivatives And Investigation Of Their In Vitro Cytotoxic Effects On Breast Cancer . 7th International Bau Drug Design Congress

Aktaş, A. S. , Şenol, H., Dağ, A., Atasoy, S., & Topçu, G., (2019). Synthesis Of New Oleanane Triterpenoids Including Fatty Acids Esters And Investigation Of Their In Vitro Cytotoxic Effects On 3t3 Fibroblast And Pc3 Prostate Cancer Cell Lines . 7th International Bau Drug Design Congress, İstanbul, Turkey

Omurtag Özgen, P. S. , Atasoy, S., Zengin Kurt, B., Durmuş, Z., Yiğit, G., & Dağ, A., (2019). Meme Kanseri Terapisinde Doksorubisin Konjuge Glikopolimer ile Kaplanmış Karbon Nanotüpler (CNT) . 6. Biyomalzeme Günleri (pp.1). İstanbul, Turkey

Dağ, A., Çakılkeya, E., Yiğit, G., Atasoy, S., & Gürek, A. G. , (2019). Phtalocyanine Conjugated Glyconanoparticles For Combination Therapies . 16th Pacific Polymerconference

Atasoy, S., Gökkaya, B., Çırakoğlu, A., Kuru, R. D. , & Deviren, A., (2019). Detection Of Chromosome Aberrations By Fluorescence İn Situ Hybridization Went Unnoticed With The Use Of Conventional Cytogenetics İn Acute Lymphoblastic Leukaemia . V11. International Congress Of Molecular Medicine, İstanbul, Turkey

Doganay, Ö., Atasoy, S., Diker, N., & Alkan, A., (2019). Investigation Of Cytotoxicity Of Sealant Used İn Guided Bone Regeneration . Fd1 2019: Annual World Dental Congress, San Francisco, United States of America

Yuca, T., Zengin Kurt, B., Atasoy, S., Dağ, A., & Güneşer, M. B. , (2019). The Cytotoxicity Of Biodentine Modified With Nanosized Bioactive Glass Particles . The 20th Scientific Congress Of Asian Pasific Endodontic Confederation

Gürkan Volkan, Sönmez Fatma Cavide, Atasoy Sezen (2018). Sinir Ve Damar Kökenli Yumuşak Doku Sarkomları. Türkiye Klinikleri Orthopaedics and Traumatology-Special Topics, 10(4), 325-330.

Atasoy Sezen, Erturan Serdar, Yılmaz Nail, Çırakoğlu Ayşe, Kuru Rahiye Dilhan, Deviren Ayhan (2018). Analysis Of Chromosome 3, 7 And 8 Centromeric Regions İn Bronchial Lavage Specimens By FISH. Turkish Thoracic Journal, 17(4), 141-147., DOI: 10.5152/Turkthoracj.2016.001

Göncü, B., Kandaş, N., Atasoy, S., Özdemir, B., Yücesan, E., Başoğlu, H., ... Akbaş, F.(2018). HLA class II protein and mRNA expression profiles in cultured parathyroid tissues . EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS (pp.907-908). Milan, Italy

Gökay, G., Göncü, B., Atasoy, S., Dağ, A., & Temel, B., (2018). Sülförafanın İnsan Böbrek Kanser Hücre Hattında Apoptotik Etkisi . Iı. Uluslararası Multidisipliner Akademik Çalışmalar Sempozyumu, İstanbul, Turkey

Atasoy, S., Göncü, B., & Gürkan, V., (2017). Diz Osteoartritlerinde Sitokinlerin Rollerinin Belirlenmesi Ve Aday Biyobelirteç Araştırılması . Xv. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi, Muğla, Turkey

Sertifika/Ödülleri :

Cancer Metastasis, Johns Hopkins University Faculty of Medicine, 2017

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 2016

Course for Cell Death Methods, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 2013

Classic And Modern Methods for Molecular Diagnostics in Human Pathology, Transilvania University of Brasov, Faculty of Medicine, 2013

3rd Best Oral Presentation Award, Atasoy S., Turkish Society Of Molecular Medicine, Eylül 2019