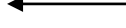


Adınızı soyadınızı giriniz



Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak.



DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

“ÇOCUKLUK ÇAĞI SARKOMLARINDA *WASF3*  
GENİNİN EKSPRESYON, METİLASYON VE MİRNA  
PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI”

FAZİLET ÖZDENOĞLU

DANIŞMAN  
PROF. DR. NECAT VAKUR OLGAÇ  
İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. HÜLYA YAZICI  
TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI  
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

**TEZ ONAYI**



**BEYAN**



## İTHAF

Sevgili kızım Yasber Işılay'a ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yön veren, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan, yardım ve tavsiyelerde bulunan, çalışma motivasyonuna hayran kaldığım tez danışmanım, çok değerli hocam Prof. Dr. Hülya Yazıcı'ya ve Prof. Dr. Necat Vakur Olgaç' a,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hatice Bilge Becerir' e,

Tez izleme aşamalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Rejin Kebudi' ye ve Prof. Dr. Merva Soluk Tekkeşin'e,

Hastalara ait klinik bilgilere ulaşımımı sağlayan Dr. Sema Büyükkapu Bay ve Doç. Dr. Ahmet Salduz' a,

İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Prof. Dr. Bülent Zülfiyar'a,

Kanser Genetiği Bilim Dalı Başkanımız Dr. Öğr. Üyesi Şeref Buğra Tunçer'e,

Akademik hayatım boyunca bana destek olan tüm hocalarıma, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda bulunan ve desteklerini esirgemeyen Demet Akdeniz Ödemiş, Arzu Burnuva, Özge Şükrüoğlu Erdoğan, Seda Kılıç Erciyas, Zübeyde Yalnız Kayım, Büşra Kurt Gültaşlar, Betül Çelik, Türkan Ferhadoğlu başta olmak üzere tüm meslektaşlarıma,

Çalıştığım süre içerisinde doktora eğitimimi her türlü destekleyen İstanbul Okan Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Müdürlerim Dr. Öğr. Üyesi Onur Yarar ve Dr. Öğr. Üyesi Yıldırım Gülhan' a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan sevgili eşim Gökay Özdenoğlu'na, kızım Yasber Işılay' a ve doktora sürecinde her türlü desteğini yanımda hissettiğim sevgili annem Müşerref Yıldız'a ve tüm aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-37272

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ewing Sarkomu.....	3
2.1.1. Ewing Sarkomun Epidemiyolojisi ve İlişkili Risk Faktörleri.....	4
2.1.2. Ewing Sarkomunda Tanı ve Klinik Bulgular.....	5
2.1.3. Ewing Sarkomun Tedavisi.....	6
2.1.4. Ewing Sarkomun Genetik Özellikleri.....	7
2.2. Osteosarkom.....	9
2.2.1. Osteosarkomun Epidemiyolojisi ve İlişkili Risk Faktörleri.....	10
2.2.2. Osteosarkomlarda Tanı ve Klinik Özellikler.....	10
2.2.3. Osteosarkom Tedavisi.....	11
2.2.4. Osteosarkomun Genetik Özellikler.....	11
2.3. <i>WASF3</i> yapısı.....	14
2.3.1. <i>WASF3</i> ile İlgili Sinyal İletim Yolakları.....	16
2.3.2. <i>WASF3</i> ve Metastaz.....	19
2.4. MikroRNA'lar.....	20
2.5. DNA Metilasyonu.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Gereç -Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	26

3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	27
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu.....	28
3.2.2. Lenfosit Hücrelerinden RNA İzolasyonu.....	29
3.2.3. Lenfosit Hücrelerinden DNA İzolasyonu.....	30
3.2.4. Dokudan RNA izolasyonu.....	30
3.2.5. Dokudan DNA izolasyonu.....	31
3.2.6. RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	32
3.2.7. DNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	32
3.2.8. <i>WASF3</i> Gen Ekspresyonu İçin cDNA Sentezi ve Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	33
3.2.9. miR-218-5p Gen Ekspresyonu için cDNA Sentezi ve Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	34
3.2.10. DNA'nın Bisülfid Modifikasyonu.....	37
3.2.11. Metilasyon Spesifik PCR.....	38
3.2.12. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	39
3.2.13. Agaroz Jelde Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....	39
3.2.14. $\Delta Ct$ , $\Delta\Delta Ct$ ve $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Değerlerinin Hesaplanması.....	39
3.2.15. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. <i>WASF3</i> Gen İfadesi İçin Bulgular.....	41
4.1.1. qPCR ile Çoğaltılan Örneklerin Çoğalma Eğrileri ve Erime Eğrisi Analizleri.....	41
4.1.2. <i>WASF3</i> Gen İfadesinin Değerlendirilmesi.....	43
4.1.3. <i>WASF3</i> için ROC Analizi.....	49
4.2. miR-218-5p İfadesi İçin Bulgular.....	50
4.2.1. qPCR ile Çoğaltılan miR218-5 Molekülünün Analizi.....	50
4.2.2. miR-218-5p ifadesinin Değerlendirilmesi.....	51
4.2.3. miR-218-5p için ROC Analizi.....	58
4.3. miR-218-5p ve <i>WASF3</i> için STRING analizi.....	59
4.4. Sağkalım Analizi.....	60
4.5. Metilasyon Spesifik PCR için bulgular.....	62

5. TARTIŞMA.....	64
KAYNAKLAR.....	71
HAM VERİLER.....	79
FORMLAR.....	80
ETİK KURUL KARARI .....	89
PATENT HAKKI İZİNİ .....	90
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	91
ÖZGEÇMİŞ .....	92



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1 :Kemik ve yumuşak dokuların indiferansiye küçük yuvarlak hücreli sarkomları .....	4
Tablo 2-2: WHO 2020 sınıflandırmasına göre osteosarkom tipleri .....	10
Tablo 2-3: Osteosarkomla ilişkili hastalıklar ve sendromlar .....	12
Tablo 2-4: Wiskott-Aldrich Sendromu Protein (WASP) ailesi.....	14
Tablo 2-5: <i>WASF3</i> 'ün regülasyonu .....	16
Tablo 2-6: Sarkomlarla ilişkili bazı miRNA'lar.....	21
Tablo 3-1: Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	26
Tablo 3-2: Kullanılan Cihazlar.....	27
Tablo 3-3: cDNA reaksiyon karışımı.....	33
Tablo 3-4: cDNA için sıcaklık koşulları.....	33
Tablo 3-5: Real Time PCR reaksiyon karışımı .....	34
Tablo 3-6: <i>WASF3</i> gen ekspresyonu için Real Time PCR koşulları .....	34
Tablo 3-7: qPCR da kullanılan Primer çiftleri .....	34
Tablo 3-8: miR-218-5p için cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri .....	35
Tablo 3-9: miR-218-5p için cDNA için sıcaklık koşulları .....	35
Tablo 3-10: miR-218-5p gen ekspresyonu için Real Time PCR reaksiyon karışımı .....	35
Tablo 3-11: miR-218-5p gen ekspresyonu için Real Time PCR koşulları .....	36
Tablo 3-12: Metilasyon spesifik PCR reaksiyon karışımı .....	38
Tablo 3-13: MSP-PCR koşulları .....	38
Tablo 3-14: Metilasyon Spesifik PCR için primerler .....	39
Tablo 4-1 : Bazı Örneklerle Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri.....	41
Tablo 4-2: Periferik kandaki <i>WASF3</i> gen ifade düzeyleri .....	43
Tablo 4-3: Tümör ve tümöre yakın normal dokulardaki <i>WASF3</i> ekspresyon düzeyleri .....	44
Tablo 4-4: Hasta ve kontrol grupları arasında tedavi öncesi <i>WASF3</i> gen ifade düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi .....	45
Tablo 4-5: Hastaların Klinik Özelliklerinin Tedavi Öncesi <i>WASF3</i> gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	46

Tablo 4-6: Sarkomlu hastalarda tümör lokasyonuna göre <i>WASF3</i> ekspresyon seviyesi .....	47
Tablo 4-7: Ailedeki kanser öyküsünün <i>WASF3</i> ifade düzeyine göre dağılımı ...	48
Tablo 4-8: <i>WASF3</i> için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı).....	50
Tablo 4-9: Periferik kan örneklerine ait miR218-5p gen ifade düzeyi.....	52
Tablo 4-10: Tümör ve tümöre yakın normal dokulardaki miR-218-5p ekspresyon düzeyleri .....	52
Tablo 4-11: Hasta ve kontrol grupları arasında tedavi öncesi miR-218-5p gen ifade düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi.....	54
Tablo 4-12: Hastaların klinik özelliklerinin tedavi öncesi miR-218-5p gen ifade düzeyleri ile karşılaştırılması .....	55
Tablo 4-13: Sarkomlu hastalarda tümör bölgesine göre miR-218-5p ekspresyon seviyesi .....	56
Tablo 4-14: Ailedeki kanser öyküsünün miR-218-5p ifade düzeyine göre dağılımı.....	57
Tablo 4-15: miR-218-5p için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları .....	59

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>EWS-FLI1</i> füzyonu .....	8
Şekil 2-2: İnaktif/ Kapalı <i>WASF3</i> .....	15
Şekil 2-3: Aktif/Açık <i>WASF3</i> .....	15
Şekil 2-4: Metastazda <i>WASF3</i> sinyal yolları .....	20
Şekil 3-1: MICqPCR cihazı .....	37
Şekil 3-2: MICqPCR tüpleri ve hazırlanması .....	36
Şekil 3-3: MICqPCR tüpleri yerleştirmesi.....	36
Şekil 4-1: Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde <i>B-Aktin</i> housekeeping gen eşliğinde incelenen <i>WASF3</i> geninin RT-PCR eğrileri .....	42
Şekil 4-2 : Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde <i>B-Aktin</i> housekeeping gen eşliğinde incelenen <i>WASF3</i> geninin erime eğrisi analizi .....	43
Şekil 4-3: Periferik kanda sarkomlu hastalara ve sağlıklı kontrollere ait <i>WASF3</i> ifade düzeyi.....	45
Şekil 4-4: Osteosarkomlu hastanın periferik kan ve tümör doku örneklerinde <i>WASF3</i> gen ekspresyon değerleri.....	49
Şekil 4-5: Sarkomlu hasta ve sağlıklı gruplar için <i>WASF3</i> dağılımının ROC-AUC değerleri .....	50
Şekil 4-6: Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde <i>RNU6-1</i> housekeeping gen eşliğinde incelenen miR-218-5p geninin RT-PCR eğrileri .....	51
Şekil 4-7: Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde <i>RNU6-1</i> housekeeping gen eşliğinde incelenen miR-218-5p'nin erime eğrisi analizi .....	51
Şekil 4-8: Periferik kanda sarkomlu hasta ve sağlıklı kontrol grubu için mir218-5p ifade düzeyi.....	53
Şekil 4-9: Osteosarkomlu hastanın periferik kan ve tümör doku örneklerinde miR-218-5p gen ekspresyon değerleri: .....	58
Şekil 4-10: Sarkomlu hastalarda ve sağlıklı kontrollerde miR-218-5p' nin ROC-AUC değer grafiği.....	59
Şekil 4-11: <i>WASF3</i> 'ün Gen/Protein Etkileşimini Gösteren String Analiz Sonuçları.....	60
Şekil 4-12: Hastalara ait sağkalım grafiği.....	61

Şekil 4-13 : Sarkomlu Hastaların tümör dokularının ve yakın dokularının Metilasyon Spesifik PCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	62
Şekil 4-14 : Sarkomlu ve sağlıklı kontrollere ait periferik lenfosit örneklerinin Metilasyon Spesifik PCR sonrası agaroz jel görüntüsü .....	63



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon  
cDNA: Komplementer DNA  
circRNA: Halkasal kodlanmayan RNA  
Ct: Eşik döngüsü  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
ES: Ewing Sarkomu  
EtBr: Etidyum Bromür  
FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi  
FISH: Floresan in situ hibridizasyon  
MSC: Mezenkimal Kök Hücre  
MSP: Metilasyon Spesifik PCR  
miRNA: mikroRNA  
mRNA: Mesajcı RNA  
ng: nanogram  
OS: Osteosarkom  
PBS: Fosfat tamponu  
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
PTEN: Fosfataz ve Tensin Homoloğu  
WHO : Dünya Sağlık Örgütü  
WASP: Wiskott–Aldrich Syndrome Protein  
RNA: Ribonükleik Asit  
RISC: RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi  
RNA: Ribonükleik Asit  
ROC: Receiver Operator Characteristic  
ROC-AUC: ROC Eğrisi Altında Kalan Alan  
RPM: Dakikada Devir Sayısı  
snRNAs: Küçük kodlama yapmayan RNA'lar  
TEMSC: Tümör hücre dışı vezikül eğitilmiş mezenkimal kök hücreler  
TEB: Tris EDTA Borik Asit Tamponu  
TP53: Tümör Protein 53  
µL: mikrolitre  
%95 CI: %95 Confidence Interval-Güven Aralığı

## ÖZET

Özdenoğlu, F. Çocukluk Çağı Sarkomlarında *WASF3* Geninin Ekspresyon, Metilasyon ve miRNA profilinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2022.

Sarkomlar çocuklarda ve genç erişkinlerde oldukça agresif seyreden, hızlı metastaz yapan malign bir tümördür. Sarkomlarda non-invaziv nitelikte diyagnostik, prognostik biyobelirteçlere gereksinim olmaktadır. *WASF3*' ün normal hücrelerde invazyonu desteklediği kanser hücre soylarında ise delete olduğu durumda invazyon ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir. Çalışma sarkom tanısı almış toplam 25 hasta ve hasta popülasyonu ile yaş, cinsiyet ve etnik köken olarak eşleştirilmiş 22 sağlıklı çocuktan oluşturulan çalışma popülasyonunda yapılmıştır. Ayrıca 4 hastanın tümör dokusu ve 2 hastanın tümöre yakın eşlenik dokusu da çalışmaya dahil edilmiştir. Tedavi öncesi kanı alınan bir hastanın da tümör doku ile birlikte operasyon esnasında, tedavi sırasında ve sonrası periferik kanları çalışmaya dahil edilmiştir. Periferik kan ve doku numunelerine ait RNA örneklerinde *WASF3* ekspresyon düzeyi ile miR-218-5p ifade seviyesi gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile analiz edilmiş, DNA ile de metilasyon spesifik PCR tekniği kullanılarak hastaların metile ve unmetile durumları araştırılmıştır.

Tedavi almamış sarkomlu pediyatrik hastalar ile sağlıklı kontrol grupları arasında yapılan incelemede, *WASF3* ifade düzeyinin hasta gruplarında 3,6 kat azaldığı saptandı. Tümörü ve tedavi sonrası değerleri incelenen hastada ise tümör ve operasyon esnasında alınan periferik kan değerlerinde *WASF3* ekspresyonunun yüksek ve birbirine yakın değerlerde olduğu, tedavi sonrasında ise *WASF3* gen ekspresyon düzeyinin ise düştüğü saptanmıştır. miR-218-5p ifade düzeyinin sağlıklı kontrollere göre 6,3 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Çalışmada incelenen dört farklı tümör dokusunda DNA metilasyon kaybı görülürken, hastalara ve sağlıklı kişilere ait periferik kan örneklerinde metilasyon saptandı. Sonuç olarak miR-218-5p'nin kan ve tümör dokusunda araştırılan ifade düzeyinin, yüksek diyagnostik değere sahip olduğu, sarkomlarda hem terapötik hem de prognostik belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ewing Sarkomu, Osteosarkom, *WASF3*, miR-218-5p, DNA metilasyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-37272

## ABSTRACT

Özdenoğlu, F. Investigation of *WASF3* Gene Expression, Methylation and miRNA Profile in Childhood Sarcomas. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Basic Oncology, Doctoral Thesis, İstanbul, 2022

Sarcomas are a very aggressive, rapidly metastatic malignant tumor in children and young adults. Non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers are needed in sarcomas. *WASF3* has been shown to support invasion in normal cells and suppress invasion and metastasis in cancer cell lines when deleted. The study was performed on a study population consisting of 25 sarcoma patients and 22 healthy children matched for age, sex, and ethnicity. In addition, tumor tissue from 4 patients and connective tissue near the tumor from 2 patients were included in the study. Peripheral blood and tumor tissue during surgery, during and after treatment were included in the study. *WASF3* expression and miR-218-5p expression level in the RNA samples of peripheral blood and tissue samples were analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The methylated and unmethylated status of the patients was analyzed with DNA using the methylation-specific PCR technique.

When investigated between untreated pediatric sarcoma patients and healthy control groups, it was found that the expression of *WASF3* decreased 3.6-fold in the patient groups. After treatment, the level of *WASF3* gene expression was found to decrease. The expression of miR-218-5p increased 6.3-fold compared to the healthy control groups, and this increase was found to be statistically significant. Loss of DNA methylation was detected in four different tumor tissues examined in the study, as well as in patients and healthy individuals. In conclusion, the expression level of miR-218-5p studied in blood and tumor tissues suggests that it has high diagnostic value and can be used as both a therapeutic and prognostic marker in sarcomas.

**Key Words:** Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, *WASF3*, miR-218-5p, DNA methylation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2020-37272

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu gelişen bir hastalıktır. Genetik değişiklikler, mutasyonları ve tek nükleotid değişikliklerini, delesyonları, duplikasyonları, kopya sayısındaki değişiklikleri ve translokasyonları içerir. Epigenetik değişiklikler; metilasyon, histon ve histon olmayan protein değişiklikleri, kodlamayan RNA değişiklikleri, imprinting ve kromatin yeniden şekillenmesi gibi geniş ölçüde bir hücre neslinden diğerine aktarılabilen değişiklikleri içerir. Epigenetik düzenleme, insanlarda dokuya özgü genlerin ekspresyonunun normal gelişiminde ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynar ve bu durumun bozulması, tümör oluşumunda yer alan değişikliklere yol açar [1].

Kanser hücrelerinin vücuttaki primer büyüme bölgelerinden sekonder büyüme bölgelerine dağılması, metastatik süreci ve bugün kanser hastalarında en başta gelen ölüm nedenini açıklar. İnsan genom projesinin açıklanması ve genetik alanında yapılan yeni çalışmalar kanser ile ilgili bilgileri de önemli ölçüde geliştirmiştir. Bunlar arasında: Genomik haritalar, tümör sınıflandırmasını histolojik seviyeden genetik temelli bir alana taşımaktadır. Tümörgenezi temel alan moleküler değişiklikler sayesinde tasarlanan kanser ilaçları terapi için olumlu sonuçlar vermektedir. Tümör genotipleme, klinisyenlerin hasta tümörlerini en iyi tedavi ile eşleştirerek tedavileri bireyselleştirmelerine yardımcı olmaktadır. Tümöre özgü DNA değişikliklerin saptanması, hastalığın prognozu için önemli biyobelirteçlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Kanser alanındaki genetik çalışmalar, farmakolojik alanda yeni terapötik yaklaşımlarla sonuçlanacak olan ilave hedefleri belirleyecektir [2].

Sarkomlar tüm kanserler arasında %1 oranında görülen nadir tümörlerdir. Bu tümörler değişken biyolojik davranışlar gösterdiği için klinik açıdan tanı, prognoz ve tedavi seçiminde kısıtlar bulunmaktadır. Bundan başka tümörlerin histolojik ve immunohistokimyasal özelliklerinde çakışma nedeniyle de teşhis zorlaşır. Bu nedenle günümüzde bu tür tümörlerin tanısında FISH, PCR ve yeni nesil sekanslama gibi genetik teknikler çok önemli rol oynamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2020 yılında yeni bir sınıflama yayınlarak kanser teşhisinin standardizasyonuna yönelik önemli bir adım atmıştır. Özellikle yumuşak doku tümörleri, kemik tümörleri gibi nadir hastalıklarda, tanı doğruluğunu artırmak oldukça önemli olmaktadır. Son 20 yılda bu hastalık grubunda yeni füzyon genlerini içeren genetik değişiklikler tanımlanmış ve bu sayede 2020 WHO sınıflandırmasında yumuşak doku ve kemiğin yuvarlak hücreli sarkomunu kapsayan ayrı bir bölüm sınıflamaya dahil edilmiştir.

Ewing sarkomu ve osteosarkom pedyatrik hastalarda oldukça agresif seyreden, hızlı metastaz yapan tümörlerdir. Sarkomların nadir insidansı ve tümör heterojenitesinden dolayı bu konuda çok fazla araştırmaya gereksinim olmakla birlikte, bu hastalıkta cerrahi işlem

gerektirmeyen diyagnostik ve prognostik biyobelirteçlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Kanserde invazyonun gelişmesinde bir hücre iskeleti molekülü olan Aktin'in rolünün son derece önemli olduğu bilinmektedir. *WASF3* geni ise Aktin molekülü sentezinden ve Aktin molekülünün yapılanmasında rol alan moleküllerden biridir. Bundan başka kanser hücre soylarında delete olarak fonksiyon kaybına uğrayan ve buna bağlı olarak invazyon ve metastazı baskılayan *WASF3*'ün normal hücrelerde invazyonu desteklediği gösterilmiştir. miR-218-5p' nin hedef genleri “mirTarBase”, “TargetScan” ve “miRDB” veri tabanları kullanılarak belirlendi. miR218-5p'nin hedef genlerinin en fazla ilişkili olduğu protein ağını göstermek için “STRING Analizi (Protein-protein etkileşim analizi)” yapıldı. Hedef genler arasında *WASF3* saptandı. miR-218-5p'nin ise *WASF3* geninin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir. Sunulan tez çalışmasında Ewing Sarkomu ve osteosarkom tanısı alan hastalarla birlikte sağlıklı kontrollerin periferik kan örnekleri ile hastalara ait tümör dokularında *WASF3* ve miR-218-5p gen ifade düzeyleri ile *WASF3* geninin metilasyon düzeyi araştırılmıştır. *WASF3* gen ekspresyonunun metilasyonla mı yoksa ilişkili olduğu miR-218-5p üzerinden mi kontrol edildiği çocukluk çağı sarkomlarında sağlıklı kontroller ile karşılaştırılarak araştırılmış ve aynı zamanda da ilgili moleküllerin diyagnostik ve prognostik bir biyobelirteç olma özelliği taşıyıp taşımadığı incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Çocukluk çağı sarkomları heterojen bir tümör grubudur ve pediyatrik solid tümörlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Sarkomlar tüm kanserler arasında %1 oranında görülür. Pediyatrik çağın tümörleri genellikle yuvarlak, daha küçük, nispeten farklılaşmamış primitif hücrelerden meydana gelen tümörlerdir. Esas olarak en sık görülen tipleri lenfoma, kondrosarkom, lösemi, nöroblastom, rabdomyosarkom, sinoviyal sarkom, Ewing sarkomu (ES) ve osteosarkomdur [3].

Pediyatrik kanserlerin sağkalım oranı son 10 yılda gelişmiş ülkelerde önemli ölçüde yükselmiştir. Ancak kanser tanısı alan çocukların %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde ikamet ettiği ve buna bağlı ölümlerin %90'ının bu ülkelerde gerçekleştiği bilinmektedir. Çocukluk çağı kanserlerinde hayatta kalma oranı 1970'lerden bu yana iyileşmiş ve gelişmiş ülkelerde yaklaşık %80'e ulaşmıştır [4], [5].

Ewing sarkom ve osteosarkom çocuklarda ve genç erişkinlerde oldukça agresif seyreden ve en sık görülen malign tümörlerdir [6], [7].

### 2.1. Ewing Sarkomu

Ewing sarkomu (ES), tüm kemik sarkomlarının %10 ila %15'ini oluşturan, adolesan ve genç erişkinlerde görülen agresif bir tümördür [8]. Ewing sarkomu, *TET / FET (TLS / FUS, EWSR1 ve TAF15)* familyası genleri ile E26 transformasyon spesifik (ETS) familyası genleri arasında kromozomal translokasyonların sıkça görüldüğü malign küçük yuvarlak hücreli bir tümördür [9].  $t(11;22)(q24;q12)$  translokasyonu bu tümörde fazla görülen translokasyonlar arasındadır. 22 numaralı kromozomdaki *EWS* geni, 11 numaralı kromozom üzerindeki *FLI-1* geni ile birleşerek Ewing Sarkom proteini olarak isimlendirilen bir füzyon proteininin oluşumuna yol açar [10]. Ewing sarkomu tarihsel süreçte 1866 tarihinde Lucke isimli bilim insanı tarafından yuvarlak, küçük hücreler şeklinde patolojisi keşfedildi. 1918 yılında Stou ve arkadaşları tarafından Ulnar sinirde rozet formasyonu yapısı gösterilerek “nöroepitelyoma” olarak adlandırıldı. Amerikalı patolog James Stephen EWING (1866-1943) 1921 yılında 14 yaşında bir kızın Radius kemiğinde yuvarlak hücreli sarkom olarak tümörü tespit etti ve “kemiğin diffüz endotelyoması” olarak isimlendirdi [11]. Uzun yıllar boyunca araştırmacılar Ewing sarkomunun; primitif nöroektodermal tümör yani PNET ve Askin tümörü (torakopulmoner) ile aynı tümör olduğunu düşünmüşlerdir. Fakat benzer yönleri olmasına rağmen mikroskopik açıdan farklılıkları ortaya çıkınca bu tümörler “Ewing Sarkom Tümör Ailesi” (ESTA) olarak adlandırılmıştır [9]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 yılında yeni bir sınıflandırma yayınlayarak kanser teşhisinin standardizasyonuna yönelik özellikle yumuşak doku tümörleri, kemik tümörleri gibi nadir hastalıklarda, tanı doğruluğunu artırmak için önemli

bir adım atarak bu tümörlerin sınıflandırılmasında füzyon oluşturan genetik değişikliklerden yararlanarak bir gruplama yapmışlardır. Bu sayede 2020 WHO sınıflamasında yumuşak doku ve kemiğin yuvarlak hücreli sarkomunu kapsayan ayrı bir bölüm sınıflamaya dahil edilmiştir. Bu yeni bölüm sadece Ewing sarkomu olarak adlandırılan prototipik yuvarlak hücreli sarkomu değil, aynı zamanda klinik, patolojik ve moleküler olarak Ewing sarkomundan farklı olan üç farklı alt grubu da içermektedir Tablo 2-1’ de Kemik ve yumuşak dokuların indifferansiye küçük yuvarlak hücreli sarkomları gösterilmiştir [12].

**Tablo 2-1 :**Kemik ve yumuşak dokuların indifferansiye küçük yuvarlak hücreli sarkomları

<b>Ewing Sarkomu</b>
➤ EWSR1 ile ilişkili füzyon yapan yuvarlak hücreli sarkom (ETS olmayan füzyonlar)
➤ CIC (Capicua Transcriptional Repressor) rearanjmanı (rearrangement) ilişkili sarkom
➤ BCOR (BCL-6 transcriptional corepressor) rearanjmanı (rearrangement) ilişkili sarkom

Bu tümörler genellikle kemikte ve daha az sıklıkla yumuşak dokularda görülen küçük yuvarlak hücreli tümörlerdir [13]. Ewing sarkomlu hastaların %85’inde t(11;22 (q24;q12) translokasyonu vardır ve *EWS-FLI-1* füzyon oluşumuna yol açar. Daha az yaygın olan t(21;12)(22;12) translokasyonlar *EWS-ERG* füzyonuna yol açarak vakaların %10 ila %15’ini oluşturur [9]. Ewing sarkom; küçük yuvarlak hücreli tümörden, lobüler bir yapıya sahip, ağırlıklı olarak yuvarlak bir hücreli neoplazmaya kadar değişen morfolojik spektruma sahiptir. Bu tümörün karakteristik immunohistokimyasal profili, Vimentin, CD99 (genellikle membranöz), FLI1 (nükleer) ve NKX2-2 için değişkenlik göstermektedir [14]. Bu tümörlerin değişken biyolojik davranışlar sergilemesi, histolojik ve immünohistokimyasal özelliklerinin birbirine çok benzer olması nedeniyle tanı, prognoz ve tedavilerinde zorluklar mevcuttur. Bu yüzden FISH, PCR ve yeni nesil sekanslama gibi genetik teknikler kesin tanıda şimdi çok önemli bir rol oynamaktadır [15].

### **2.1.1. Ewing Sarkomun Epidemiyolojisi ve İlişkili Risk Faktörleri**

Ewing sarkom en çok çocuklar, ergenler ve genç erişkinlerde görülen en yaygın ikinci kemik kanseridir ve yüksek dereceli bir malignite olarak kabul edilir[13]. Vakaların %90’ı 5 ile 25 yaş arasındadır. En fazla görüldüğü yaş aralığı 10 ila 20 yaş arasındadır. Vakaların yaklaşık %25’i, 10 yaşından önce görülürken, %65’i 10 ila 20 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır.

Hastaların yaklaşık %10'u tanı konduğunda 20 yaşından büyüktür. Ewing sarkomun 1 ile 6 yaş arası görülme sıklığı yılda milyonda 10; 10 ile 18 yaş arasında ise yılda milyonda 30 civarındadır [16] , [17].

Ewing sarkomunun etnik epidemiyolojisi, Wilms tümörüne benzer şekilde ırksal özelliklere sahiptir. Ewing Sarkomu beyaz ırkta, Asyalılardan ve Afrika kökenli soylardan çok daha fazla yaygındır. Zucman-Rossi ve arkadaşlarının Alu elementlerini (azalmış serpiştirilmiş tekrar dizileri) incelediği çalışmalarda intron 6' daki değişikliklerin, Afrika popülasyonunun yüzde 10'undan daha azında görüldüğünü bildirmişlerdir. Alu elementleri insan genomunda yaklaşık 1.000.000 kopya oranında ve yaklaşık 300 bp uzunluğunda olup genetik materyalin yaklaşık %10'unu oluşturan bir transpozon türüdür. Alu elementlerinin kanserde görülen genetik rekombinasyonlar için önemli ve etkili bölgeler olduğu düşünülmektedir [18]. Ewing sarkomundan genç erkekler, kızlardan daha sık etkilenir [13],[19]. Bazı kaynaklarda Ewing sarkomunun pestisitlere, kimyasal çözücülere ve tarımsal mesleğe maruziyeti ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [10]. Ayrıca fiziksel aktivitelerden ve spordan dolayı tanılar yumuşak doku travması olarak görüldüğü için hastalığın teşhisi gecikmekte ve buna bağlı olarak hastalığın prognozu kötü etkilenmektedir [11]. Bundan başka Retinoblastoma tanısı almış ve buna bağlı olarak tedavi görmüş olan hastalarda da, Retinoblastoma tedavisi sonrasında teşhis edilen Ewing sarkomu görülmektedir. Spunt ve arkadaşları lenfoma, lösemi, Wilms tümörü ve retinoblastom gibi farklı kanserlerin tedavilerinin ardından teşhis edilen Ewing sarkomu vakalarının olduğunu bildirmişlerdir [20].

### **2.1.2. Ewing Sarkomunda Tanı ve Klinik Bulgular**

Ewing Sarkomu malign kemik tümörleri arasında az görülür fakat genç yaşta ortaya çıkması ve prognozunun kötü olması sebebiyle önemli bir hastalıktır. Pelvis en yaygın yerleşim yeridir ve bunu femur, tibia, humerus ve skapula izlemektedir ancak hemen hemen her kemik veya yumuşak dokuda ortaya çıkabilir. Uzun kemiklerde sıklıkla diyafizi veya metadiyafizi tutar. Pelviste en sık gözlenir özellikle iliumu tutar, kafatası tutuluşu enderdir. Tipik olarak, hastalar tutulum bölgesinde ağrı ve şişlik ile başvururlar. Bazı olgularda yorgunluk, lökositoz, sedimentasyon artışı ve ateş görülebilir [10]. Hem inguinal hem de umbilikal herni de Ewing sarkoması ile ilişkilendirilmiştir [21] .

Ewing sarkomunun radyolojik bulguları bazı zamanlar bazen osteomyelite benzediğinden tanı koymayı zorlaştırabilir. Laktik dehidrogenaz (LDH) çoğunlukla bu hastalarda yüksektir [22]. Ewing Sarkomu hücreleri asetil kolin transferaz salgırlar ve IGF-1 ve gastrin üreten hücrelerdir [23]. Ewing sarkom hücreleri, genelde küçük, soluk sitoplazmalı ve hücre kenarları tam belli olmayan, poligonal hücrelerden meydana gelir. Hücrelerin çoğu tek bir nükleus içerebileceği gibi, bu nükleusların şekli oval yada yuvarlak olabilir. Kromatin yoğun

granüle şekildedir. Doku kesitlerinde hücreler tabakalar meydana getirecek şekilde yığılmıştır. Hücre sınırları ve sitoplazmik sınırlar keskin bir hat şeklinde değildir. Ewing sarkomu ile lenfomanın ayırımında en önemli kriterlerden biri retikulum liflerinin gösterilmesidir. Retikulum lifleri Ewing sarkomunda çoğunlukla damarlar etrafında, çok az bir kısmı ise hücre grubu etrafında bulunur. Lenfomada ise hücreleri çok iyi saran gelişmiş retikulum ağı bulunur [10], [20].

Pediyatrik solid tümörlerin immunohistokimyasal değerlendirmesinde birçok farklı antikor kullanılır. CD99 ve FLI-1 Ewing sarkomun tanısal açısı bakımından kullanılan en iyi antikorlardır. Ewing Sarkomların %85 ila %95'inde güçlü membranöz boyama gösterir. Vakaların %90'ında bulunan translokasyon t(11;22)(q24;q12)'nin EWS geninin 5' ucunu FLI-1 geninin 3' ucuna kaynaştırır ve EWS-FLI-1 füzyon proteinine yol açar, Bu EWS / FLI-1 füzyon onkoproteini, CD99 membran reseptörü gibi hedef genlerin transkripsiyonel dereglasyonundan sorumludur. CD99 ekspresyonu, tümör hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını modüle ederek Ewing'in tümör onkogeneze katkıda bulunur [14], [24]. Yapılan son çalışmalarda CD99 immünoaktivitesini bildiren lenfoid malign tümör örnekleri vardır. Akut lenfoblastik lösemi, lenfoma, akut miyelojenöz lösemi, granülositik sarkom, mezenkimal kondrosarkom, sinovyal sarkom, vasküler tümörler, DSRCT (Desmoplastic Small Round Cell Tumor), glial tümörler, nöroendokrin tümörler, Wilms tümörü gibi diğer neoplazilerde CD99'un pozitif olduğu sonuçlar vardır [25]. *FLII* proteini, translokasyon t(11;22)(q24;q12)'nin bir sonucu olarak *EWSR1-FLII* füzyon genini içeren Ewing sarkomunda aşırı eksprese edilir. Nükleer *FLII* immünoaktivitesi, Ewing sarkomların yaklaşık %70'inde bulunur, ancak aynı zamanda lenfoblastik lenfomaların yaklaşık %90'ında ve vasküler tümörlerde de görülür. Bu antikor, potansiyel olarak Ewing sarkomun değerlendirilmesinde faydalı olabilir ama lenfomalar ve vasküler neoplazmalar için de pozitivite gösterdiği unutulmamalıdır [10].

### 2.1.3. Ewing Sarkomun Tedavisi

Son 40 yılda hem lokal terapi hem de çok ajanlı adjuvan kemoterapi, lokalize hastalığın tedavisinde 5 yıllık sağkalım oranını %20'den %70'in üzerine çıkararak önemli ilerleme kaydedilmesini sağlamıştır, ancak nüks oranı hala yüksek düzeydedir. Ewing sarkomlu olguların dörte birinde başlangıç aşamasında metastaz görülür. Çoğunlukla akciğerde, kemiklerde ve kemik iliğinde metastaz tespit edilmektedir. Birçoğu lokal olmasına rağmen, hemen hemen hepsinde subklinik metastatik hastalık mevcuttur. Başlangıçta lokalize hastalığı olan hastaların yaklaşık %25'i sonunda nüks eder. Nükseden ve dirençli Ewing sarkom için standart bir tedavi yoktur; hayatta kalma oranları akciğer metastazı olanlarda %30'dan az; kemik ve kemik iliği tutulumu olanlarda %20'den azdır [26]. İstanbul Üniversitesi Onkoloji

Enstitüsü'nde Kebudi ve arkadaşları tarafından 1990-2012 yılları arasında 180 Ewing sarkomlu hastada yapılan çalışmada toplam 5 yıllık sağ kalımın %55 olduğu, non-metastatik olgularda %67, metastatik olgularda da %33 olduğu bildirilmiştir [27]. Yine aynı çalışmada 367 Osteosarkomlu hastada yapılan çalışmada toplam 5 yıllık sağkalımın %60 olduğu, non-metastatik olgularda %70, metastatik olgularda da %24 olduğu bulunmuştur. Nüks durumu ve metastatik hastalık göz önüne alındığında, Ewing sarkom için yeni tedavilere , tanıyı daha erken koymaya yarayan biyobelirteçlere ve konuyla ilgili daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır [27].

Ewing sarkomun tedavisi, multidisipliner bir yaklaşıma uygun olarak neoadjuvanın ve adjuvan kemoterapilerin, primer alan ve olası metastatik hastalığın kontrolü için cerrahi ya da radyoterapiyle birleştirilmesine dayanır. Doksorubisin, Vinkristin, Siklofosamid, İfosamid, Etoposid ve Daktinomisin içeren çeşitli ilaçlar tedavide kullanılmaktadır. Yüksek doz kemoterapinin rolü ise hala tartışılmaktadır [28].

*PARP1* (Poli ADP-riboz polimeraz 1), özellikle DNA'nın tek zincir kırıklarının onarımında rol oynayan anahtar bir proteindir. 2012 yılında Garnett ve arkadaşları Ewing sarkom hücrelerinin *PARP* inhibitörlerine yüksek hassasiyet gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu ilginç gözleme dayanarak, Ewing sarkomunda ilk faz II denemesi yapılmış, ve maalesef, sonuçlar bu hastalıkta Olaparib'in tek bir ajan olarak etkinliğinin olmadığını göstermiştir [29]. 2015 yılında, Kovac ve ark. ekzom sekanslaması ile 31 osteosarkom örneğini incelemiş ve ilk kez bu hastalıkta BRCA mutasyonlarının varlığını göstermiştir. Bu gözlem, osteosarkomdaki *PARP* inhibitörlerinin terapötik etkinliğini değerlendirmesi açısından çok önemlidir [30], [31].

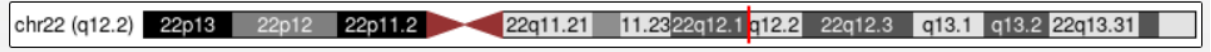
İmmünoterapi kanserde kilit bir rol oynar. Programlanmış hücre ölümü ligand 1 (PDL-1), sitotoksik CD8<sup>+</sup> T hücreli immün yanıtı baskılayan bir hücre yüzeyi proteindir. PDL-1, kanser hücreleri tarafından sıklıkla yüksek oranda ekspre edilir ve onkolojide önemli bir hedef haline gelmiştir. Paoluzzi ve ark. Nivolumab (anti-PD1) ile nüks etmiş metastatik yumuşak doku ve kemik sarkoması olan 28 hasta grubunu çalışmış ve bu hastaların % 50'sinin klinik fayda sağladığını göstermiştir [32]. Bu gözlemlere dayanarak, iki anti-PD1 antikoru, Pembrolizumab ve Nivolumab değerlendirmesi hala osteosarkomada devam etmektedir. Ewing sarkomunda şu anda PD-1 inhibitörü (Nivolumab) bir anti CTLA-4 antikoru (Ipilimumab) ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır [32].

#### **2.1.4. Ewing Sarkomun Genetik Özellikleri**

Hastaların %90-95'inde t(11;22)(q24;q12) anomalisi görülmektedir (Şekil 2.1). %5-10'unda ise t(21;22)(q2;q12) anomalisine rastlanılmaktadır. Ewing sarkomu, 22 numaralı kromozomdaki *EWS* geni, 11 numaralı kromozom üzerindeki *FLI-1* geni ile birleşerek Ewing sarkom proteini olarak isimlendirilen bir füzyon proteinine yol açar. Bu füzyon proteini EWSR1

proteini olarak ifade edilir. Bununla birlikte, *EWS* geninin *ETV1*, *ERG* ve *EIAF* geni ile de füzyon yaptığı durumlar mevcuttur. Yeni nesil sekanslama ve moleküler genetik testlerin artmasıyla Ewing sarkomuna benzeyen tümörlerde yeni genetik değişiklikler arasında *CIC-DUX4* gen füzyonları ve *BCOR-CCNB3* inversiyonları saptanmıştır [33], [34].

(A)



*EWS* geni kromozom22(q12.2)

(B)



*FLI1* geni kromozom11(q24.3)

**Şekil 2-1:** *EWS-FLI1* füzyonu (<https://genome.ucsc.edu> den alınmıştır)

Ewing sarkomu hastalığına özgü t(11;22) *EWS-FLI1* füzyonu ile karakterize edilse de büyüyen bir ETS gen ailesi listesi, bu translokasyonda, tümör fenotipini değiştirmeden *FLI1* yerine geçebilmektedir. Son zamanlarda *TET* ailesini (*EWS* homologları) içeren varyant translokasyonlar açıklanmıştır. Ewing ailesi tümörleri, en yaygın olarak *EWS* geninin ETS ailesinin transkripsiyon faktörlerinden *FLI1*, *ERG*, *ETV1*, *EIAF* ve *FEV* füzyonunu içeren spesifik kromozomal translokasyonlar ile karakterize edilmektedir. Bildirilen Ewing sarkomu vakalarının yaklaşık% 85'i bir *EWS-FLI1* füzyonu taşır. Nadir durumlarda, *FUS*, *EWS*' nin yerini alabilir, translokasyon t(16; 21) (p11; q24) ile *FUS-ERG* füzyonu oluşturulmaktadır [35].

Ng ve arkadaşlarının 2007'de yaptıkları bir çalışmada, Ewing sarkomunda yeni bir t(2;16) translokasyonun *FUS* ve *FEV* genlerinin çerçeve mutasyonu sonucu füzyon protein oluşturduklarını bildirmişlerdir [36]. Bu yüzden sarkomların moleküler tanısı için füzyon paternlerinin alternatif durumları mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Başka bir çalışmada *FUS-NFATC2* füzyonu, genom düzeyinde yapılan bir RNA sekanslama çalışması ile tespit edilmiştir [37]. En yaygın *FUS* gen ortağı *ERG*'dir ve *FEV* gen tutulumunu gösteren vakalar son derece nadirdir. *FUS-ERG* ayrıca güçlü CD99 membranöz immünoreaktivitesi gösterir. *EWS-FLI1* füzyonları, *IGFBP3*, *p57kip*, *p21* ve *TGFB2* de dahil olmak üzere apoptoz ve hücre döngüsünün durmasında yer alan genleri baskılama eğilimindedir [34], [13].

Son yıllarda, programlanmış ölüm-1 (*PD-1*) ve programlanmış ölüm-ligand 1 (*PD-L1*), kanser immünoterapisinde yeni hedefler haline gelmiştir [14]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *PD-L1* ekspresyonunun Ewing sarkomu dokularının %39'un da görüldüğü tespit edilmiş, tedavi yanıtının klinik veriler ile uyumlu olduğu görülmüştür. 370 Ewing sarkom dokusu analizinde, numunelerin %19,2'sinde *PD-L1* eksprese edilirken, *PD-1* ekspresyonunun

%25,7'sinde olduğu gösterilmiştir. Metastatik tümörlerin, primer tümörlerden daha yüksek PD-L1 ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır. Ewing sarkom doku örneklerinin %33'ünün *PD-L1*'i eksprese ettiği ve klinik verilerin daha kısa hayatta kalma süresi ile doğru orantılı olduğu belirlenmiştir [38].

*EWS-FLI1*, Ewing sarkomunda *BRCA1* onarımını bloke ederek transkripsiyonu artırmaktadır. *EWSR1*, *RNAPII* (RNA polimeraz II)'nin ve splicing mekanizmaları düzenlenme yolunda RNA metabolizmasını etkileyen bir RNA bağlayıcı proteindir. *EWSR1*'in genom stabilitesinde rol oynadığına dair kanıtlar da vardır [39].

Bazı çalışmalarda, *TP53* mutasyonlarının ve *CDKN2A* delesyonlarının Ewing sarkomunda prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Ewing sarkomda hücre bölünmesi sırasında kardeş kromatid değişimini düzenleyen koezin kompleksinin bir alt birimini kodlayan *STAG2*, hastaların yaklaşık %15'inde görülen ve en sık tekrarlayan somatik mutasyonlardan biridir. Diğer genetik değişiklikler *CDKN2A* delesyonu ve *TP53*'teki mutasyonları içermektedir. *STAG2* ve *TP53*'te mutasyonları olan hastaların daha ileri evre hastalığı ve kötü klinik sonuçlar için risk altında olduğu gösterilmiştir. Kopya numarası değişiklikleri, 1q, 2 ve 8 kromozomlarındaki duplikasyonları ve 16q'deki delesyon işlemlerini içerir. 1q ve 16q değişikliklerinin birlikte varlığı, sağkalımın azalmasıyla ilişkilidir. Ewing sarkomu olan hastaların %10 ila %13'ünde *TP53*, *BRCA*, *PTPN11* ve *PMS2* gibi çeşitli kanser yatkınlık genlerinde germline mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir [40].

Ewing sarkomda her ne kadar immünohistokimyasal boyamalar kesin tanı için yardımcı olsa da FISH yöntemi ile *EWSR1* translokasyonunun gösterilmesi çok önemlidir. Çalışmalarda kullanılan yumuşak doku sarkomları ile ilgili problemler *EWSR1*, *MDM2*, *FOXO1* ve X: 18'dir [15].

## 2.2. Osteosarkom

Osteosarkomlarda agresif klinik seyir ile karakterize edilen en yaygın kemik kanseridir; tipik olarak adolesan büyüme hasarı sırasında ortaya çıkar [41],[42]. Çocuklarda ve genç erişkinlerde en sık görülen primer kemik kanseri olmasına rağmen, osteosarkom çok nadir görülen bir kanserdir [43]. Tümörlerin çoğunluğu yüksek dereceli ve agresiftir. Agresif nitelik taşıyan bu tümörlerin etiolojisi tam olarak bilinmediği için, sarkom tedavisinde çok fazla ilerleme kaydedilememiştir. Sarkomlarla ilgili yapılan çalışmalarda en önemli kısıtlayıcı ve zorlayıcı faktörlerin moleküler çalışmalar için uygun tümörlerin nadir olması, materyalin bulunamaması kemoterapiden sonra tümörün tamamen kaybolması ve örneklerin dekalsifikasyonu gibi teknik zorluklar sayılabilir [44].

Osteosarkom en yaygın olarak büyüme plakalarının yakınındaki uzun kemiklerin metafizinde ortaya çıkar, tümörlerin üçte ikisi distal femurda diz eklemi çevresinde ortaya çıkar ve bunu ikinci en sık bölge olarak proksimal tibia takip eder; proksimal humerus, tümörlerin %10'unu oluşturan üçüncü en yaygın bölgedir [45], [46].

### 2.2.1. Osteosarkomun Epidemiyolojisi ve İlişkili Risk Faktörleri

Yıllık osteosarkom insidansı her yaş için 3,1/1.000.000'dir. Uzun boylu insanlarda kısa insanlara göre daha sık görülmektedir. Erkeklerde biraz daha yaygın olmakla birlikte her iki cinsiyette görülmektedir. Osteosarkom da hastalığın gelişimi genellikle ergenlik döneminin başlangıcında kadınlarda 10-14 yaş, erkeklerde 15-19 yaş arasında görülmektedir. Doğum kilosu yüksek olanlarda ve hızlı büyüme olan kemiklerde osteosarkom riski yüksektir [41].

### 2.2.2. Osteosarkomlarda Tanı ve Klinik Özellikler

Hastaların %90'dan fazlası ağrı, lokalize şişlik, etkilenen ekstremitede azalmış hareket gibi semptomlara sahiptir [41]. Çok azında tanı anında patolojik kırıklar tespit edilmektedir. Kesin bir tanı koymak ve osteosarkomun histolojik alt tipini tanımlamak için biyopsi gereklidir [46].

**Tablo 2-2:** WHO 2020 sınıflandırmasına göre osteosarkom tipleri [47].

<b>1- Merkezi Osteosarkom</b>	
a) Konvansiyonel	1. Osteoblastik 2. Kondroblastik 3. Fibroblastik
b) Epiteloid	
c) Dev hücreli Osteosarkom	
d) Osteoblastom	
e) Küçük Hücreli Osteosarkom	
f) Telenjektatik	
g) Low-grade merkezi osteosarkom	
<b>2- Multifokal</b>	
<b>3- Gnathic</b>	
<b>4- Yüzeysel Osteosarkom</b>	a) Periosteal
	b) Parosteal
	c) High-grade osteosarkom
	d) İntrakortikal
<b>5- Sekonder Osteosarkom</b>	

### 2.2.3. Osteosarkom Tedavisi

Osteosarkomun tedavisine multidisipliner olarak neoadjuvan, cerrahi daha sonra adjuvan ile devam edilmektedir. Doksorubisin, İfosfamid, Methotrexate, Cisplatin, Epirubisin içeren çeşitli ilaçlar tedavide kullanılmaktadır [48].

İlk tanı sırasındaki olguların yaklaşık %11-16'sında, özellikle akciğer başta olmak üzere diğer organları da içeren bir metastaz saptanmaktadır. Bununla birlikte, hastalığın seyri boyunca, hastaların %95' inde akciğer, %33' ünde kemik, %10' unda kemik iliği, %5'inde beyin metastazı gelişmektedir. Agresif biyolojik davranışı nedeniyle OS, bazı kemoterapilere karşı orta ila yüksek düzeyde direnç göstermektedir. Tüm yaş gruplarında, hastaların %25'inde metastatik hastalık bulunmakta ya da gelişmektedir [42].

### 2.2.4. Osteosarkomun Genetik Özellikler

Osteosarkomlardaki ilk DNA çalışmaları bu tümörlerin anöploidik özellik taşıdığı yönündedir. Bu durum yüksek dereceli lezyonlarda görülen bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. 1988 yılında yapılan çalışmada 96 yüksek dereceli tümörün 92'sinde (%96) anöploidi görülmüş, çalışılan düşük dereceli paraosteal osteosarkomların 4'ünün de diploid olduğu gösterilmiştir [49]. Araştırmacılar, kötü yanıt gösteren tümörler arasında anöploidi sıklığının daha yüksek olduğunu ve sağ kalım süresinin daha kötü olduğunu bildirmişlerdir [49], [50]. Diploid tümörler tümör dokusu içinde var olan kanser hücrelerinin bir bölümünde normal yani sağlıklı hücreler ile aynı kromozom sayısına sahip hücreleri her birinde 23 çift kromozom bulunduran tümörleri vurgulamaktadır. Bu hücreleri yüksek oranda bulunduran tümörler daha yavaş büyümekte ve daha az agresif özellik gösterme eğilimindedirler. Anöploidik tümörler, tümör dokusu içinde belli miktardaki kanser hücrelerinin çok fazla veya çok az kromozom sayısına sahip kanser hücreleri bulunduran tümör dokusunu ifade etmektedir. Bu kanser hücreleri hızla bölünürken, kromozomların dağılımında hatalar meydana gelebilmektedir, bu da bazı hücrelerin çok fazla kromozom ve diğerlerinin çok az kromozom taşımasına ve genomik instabiliteye neden olmaktadır. Bir anöploidik tümör, bir diploidik tümöre göre daha agresiftir. Osteosarkomların geleneksel sitogenetik analizi ile incelenmesi sırasında tümör hücrelerinin muazzam sayıda ve çeşitlilikte karyotipik değişikliklere sahip olduğu görülmüştür. Boehm ve arkadaşları 36 vakanın sitogenetik profilini incelemiş ve daha önce yayınlanmış olanları gözden geçirmişlerdir 36 olgunun 25'inde (%69) diploitten tetraploid tümörlere kadar değişen kromozomal anormalliklerin olduğunu göstermişlerdir. En sık rastlanan sayısal kromozomal anormallikleri olarak kromozom 1 duplikasyonu ile kromozom 9, 10, 13 ve 17'de delesyonlarını bildirmişlerdir [51]. En yaygın kromozomal yapısal yeniden düzenlenmelerin (rearrangementler) 1p11, 11p14, 14p11, 15p11, 17p, 1q11, 1q21 ve 19q13 kromozom bölgelerinde geliştiği gösterilmiştir [50]. Ancak osteosarkomda bulunan çeşitli anormallikleri

değerlendirmek için konvansiyonel sitogenetik sınırlı kalmaktadır. Son yıllarda, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) ve FISH osteosarkomda kromozom anomalilerinin incelenmesinde konvansiyonel sitogenetik tekniklere ilave olarak kullanılmış ve ek bilgiler sağlamıştır.

Osteosarkomlarda DNA dizi kopya sayısı artışlarının 1q21, 3q26, 6p, 8q, 12q12-13, 14q24qter, 17p11-12, Xp11.2-21 ve Xq12 kromozom bölgeleri ile ilişkili olduğu, 2q, 6q, 8p ve 10p bölgelerinde ise DNA dizi kaybının yaygın olduğu gösterilmiştir. 8q'da kopya artışı gösteren (özellikle 8q21.3-22 ve 8cen-q13) hastaların daha kötü ve daha kısa genel sağkalım gösterdikleri, 1q21'deki kopya sayısı artışı taşıyanların ise kısa genel sağkalım yönünde bir eğilim gösterdikleri gözlemlenmiştir [52]. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon yöntemi ile paraosteal osteosarkomda oluşan ring kromozomlarda DNA'nın amplifikasyonu ile ilişkili kromozom bölgesinin 12q13-15 de bulunduğu ve burada da *CDK4*, *MDM2*, *SAS* gibi onkogenlerin bulunduğu bildirilmiştir [50]. Agresif osteosarkomlarda *CDK4*'ün tek başına veya *MDM2* ile birlikte amplifiye edildiği gösterilmiştir. FISH ile *CCND2*, *ETV6*, *KRAS* ve *MDM2* genlerinin düşük dereceli osteosarkomlarda farklı oranlarda amplifiye edildiği gösterilmiştir [46].

**Tablo 2-3:** Osteosarkomla ilişkili hastalıklar ve sendromlar [53].

<b>8p12 (WRN)</b>	<b>Werner sendromu</b>
<b>8q24.3 (RECQL4)</b>	<b>Rothmund Thomson sendromu ve Rapadilino sendromu</b>
<b>13q14.2 (RB1)</b>	<b>Retinoblastoma</b>
<b>15q26.1 (BLM)</b>	<b>Bloom sendromu</b>
<b>17p13.1 (TP53)</b>	<b>Li-Fraumeni sendromu</b>
<b>Çoklu Lokuslar(RPS19, RPL5, RPL11, RPL35A, RPS24, RPS17, RPS7, RPS10, RPS26)</b>	<b>Diamond-Blackfan sendromu</b>

Osteosarkomlarla ilişkili sendromlar bulunmaktadır. Bu sendromlar arasında Rothmund-Thomson, Rapadilino, Werner ve Bloom sendromu sayılabilir. Bu sendromlar, DNA helikaz enzimlerini kodlayan *RECQL4*, *WRN* ve *BLM* genlerindeki germline mutasyonlarının neden olduğu otozomal resesif bozukluklar olarak ortaya çıkmaktadır. Her bir sendrom için osteosarkom gelişme riski farklıdır. Rothmund-Thompson sendromlu hastaların yaklaşık %30'unda, Werner veya Bloom sendromlu hastaların %10' unda osteosarkom geliştiği

bildirilmektedir [53]. Tümör baskılayıcı genleri etkileyen moleküler bozukluklar, sarkomların oluşumunda en önemli adımlardan biridir. Moleküler analizler, *TP53* ve *RBI* gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun ve *MDM2* gibi onkogenlerin aşırı ekspresyonunun kanser gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir. *RBI* geninde germline mutasyonlar, retinada malign bir kanser olan kalıtsal retinoblastoma hastalığına neden olur. Osteosarkomlar ise, herediter retinoblastomalı hastalarda en sık görülen sekonder tümörlerdir. Bu hastalarda osteosarkom insidansı normal popülasyonla kıyaslandığı zaman yaklaşık 500 kat daha fazladır [54]. Osteosarkomlar, çok sayıda ve çeşitli kanserlerle ilişkili olan Li-Fraumeni sendromunda da ikinci sıklıkla görülen malignitedir. Bu tür ailelerin yaklaşık %70'inde tümör baskılayıcı gen olan *TP53* geninde patojenik varyantlar görülmektedir [55]

2016 yılında yapılan bir çalışmada, germline düzeyde *TP53* geninde patojenik varyantları olan bireylerde kümülatif osteosarkoma insidansı %5–11 olarak bildirilmiştir [56]. Osteosarkomlu 39 hastanın tüm ekzom dizilemesi yapılmış ve 39 hastadan 7'sinde (%17,9) germline düzeyinde patojenik gen mutasyonuna sahip olduğu ve bu mutasyonla ilişkili bir kanser geliştirdiği gösterilmiştir. Bu hastaların üçünde *TP53* geninde mutasyon diğer dört ayrı vakada ise ya *RBI*, *APC*, *MSH2* ya da *PALB2* geninde mutasyon olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde %11'i osteosarkom olan hasta grubunda germline gen mutasyonu incelemesi yapılmış, bu hastaların %50'sinden fazlasında *TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *ATR* veya *ERCC2* genlerinden birinde mutasyon varlığı bildirilmiştir. Çok sayıda çalışmada, osteosarkom etiyojisinde etkisi olabilecek SNP'leri değerlendirilmiş ve farklı lokuslarda önemli olabilecek SNP'ler belirlenmiştir [57].

*GRM4* geni 6p21.3'de yer alan, hücre içi sinyal iletiminde ve siklik AMP (cAMP) sinyal kaskadının inhibisyonunda rol oynayan ve osteosarkomda saptanan bir gendir. Glutamat sinyal yolu merkezi sinir sisteminde çok iyi tanımlanmasına rağmen, bu yolak gonadotropin salgılayan nöronların uyarılmasında da etkilidir. Aynı zamanda bu yolağın kemikte de etkin olduğu bildirilmektedir [58]. *GRM4* insan osteosarkom tümör hücrelerinde eksprese edilmekle beraber, kolorektal kanser, pediatrik MSS tümörleri, rabdomiyosarkom ve multipl miyelomda kötü prognoz ile ilişkilidir. Söz konusu bu lokusların daha detaylı araştırılması, osteosarkom ile ilişkisinin belirlenmesi ve biyolojik mekanizmanın ortaya çıkarılması oldukça önemlidir [59].

2018 yılında osteosarkomda yapılan başka bir çalışmada ise *GRM4*'ün moleküler mekanizması araştırılmıştır. Bu çalışmada insan osteosarkom hFOB1.19 hücre hattında *GRM4* gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) ile incelenmiştir. RT-qPCR ile *GRM4*'ün ekspresyonunun, insan osteoblast hFOB1.19 hücre soylarından başka MG-63, U2OS, HOS ve Saos-2 Osteosarkom hücre soylarında da arttığı gösterilmiştir. Bu hücre soylarından U2OS'de *GRM4* ekspresyon düzeyinin en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir.

U2OS hücre soylarında *GRM4* geninin lentivirüs aracılı siRNA ile susturulması ile *GRM4* mRNA seviyesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [58]. Transkripsiyon faktörleri olan, *EGR1* ve *CTCF* sıklıkla hücre farklılaşması, embriyonik gelişim, proliferasyon ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynarlar. *EGR1* ekspresyonunun bazı tümör hücresinde downregüle edildiği gösterilmiştir ve *EGR1* geninin ekspresyonunun migrasyon ve invazyonu inhibe ettiği ancak osteosarkom hücrelerinde büyümeyi baskıladığı bildirilmiştir. Bir tümör baskılayıcı aday gen olarak, *CTCF* doğrudan veya dolaylı olarak karsinogeneze katkıda bulunabilmektedir. *EGR1* ve *CTCF*'nin kemokinlerle ve bunların reseptörleriyle etkileşerek osteosarkomun ilerlemesine katılan *GRM4* geninin transkripsiyonel regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir [58], [59].

Kovac ve arkadaşları 31 osteosarkom tümörünün tam ekzom dizilimini incelemişler ve tümörlerin %80'inden fazlasının *BRCA1/2* eksikliği fenotipi ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir [30].

2017 yılında yapılan bir çalışmada *ATRX* genindeki bazı değişiklikler hem osteosarkomda hem de beyin tümörlerinde tekrarlayan değişiklikler olarak gözlemlenmiştir. Alfa-Talasemi X'e bağlı entelektüel yetersizlik (X'e bağlı mental retardasyon) sendromunun olan ATR-X sendromu, ağır zihinsel yetersizlik, hafif Hemoglobin H hastalığı, genital anomaliler ve iskelet anormallikleri ile karakterizedir. Bu kişilerde *ATRX* genindeki germline mutasyonlara rastlanılmaktadır [60].

### 2.3. WASF3 yapısı

Wiskott-Aldrich sendromu protein (*WASP*) ailesi, hücre invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynar. Wiskott-Aldrich sendromu protein ailesi, yapısal benzerliklerine göre iki alt aileye ayrılan beş üyeden oluşur.

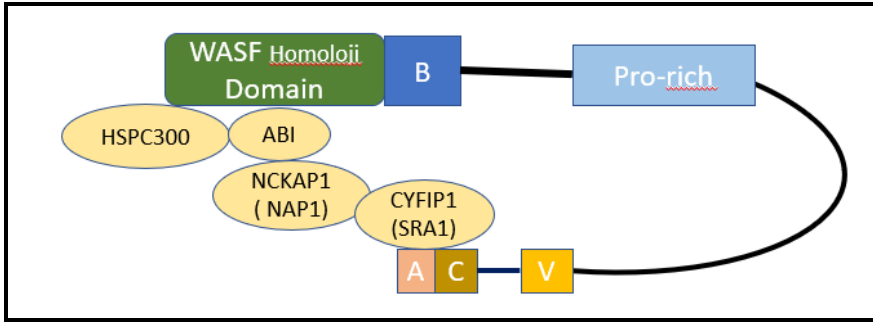
**Tablo 2-4:** Wiskott-Aldrich Sendromu Protein (*WASP*) ailesi

<b>Wiskott-Aldrich Sendromu Protein (<i>WASP</i>) ailesi</b>	
<b>WASP AİLESİ</b>	<b>WASF AİLESİ</b>
<i>WASP</i>	<i>WASF1</i>
<i>N-WASP</i>	<i>WASF2</i>
	<i>WASF3</i>

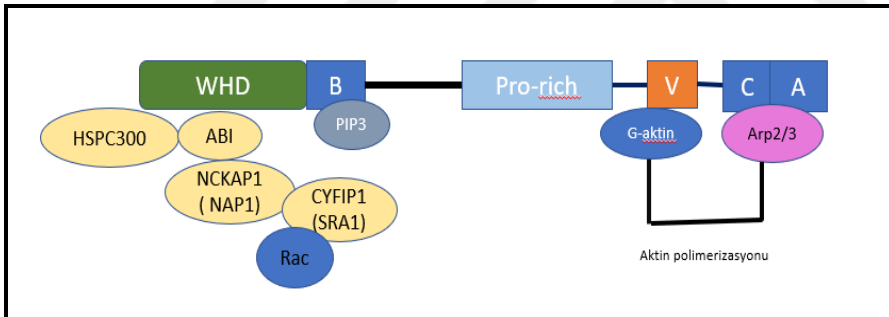
WASP alt ailesi, *WASP* ve *N-WASP*'den oluşur; ve *WASF* (*WAVE* olarak da isimlendirilir) alt ailesi *WASF1*, *WASF2* ve *WASF3*'ten oluşur [61]

WASP ailesinin tüm üyeleri sitokinler veya büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyarıyı aldıktan sonra fosfo-aktivasyon gerçekleşir, daha sonra Aktin ile ilgili Protein Arp2/3 kompleksi gibi birçok faktörle etkileşime giren C terminal motiflerinin açığa çıkmasına neden olur.

Özellikle, *WASF* üyeleri, GTPase Rho ailesi üyesi Rac'ın downstream inde hareket eden beş alt birimli bir *WASF* düzenleyici kompleksi (WRC) aracılığıyla Arp2/3'ün aktivasyonuna aracılık eder [62].



Şekil 2-2: İnaktif/ Kapalı *WASF3* [61]



Şekil 2-3: Aktif/Açık *WASF3* [61]

WASF homoloji domeninin (WHD) protein kompleksinin üyeleri arasında *HSPC300*, *ABI*, *NCKAP1 (NAP1)*, *CYFIP1 (SRA1)* ve *WASF1/2/3* bulunur. Dinlenme durumunda, *WASF*'ler, N-terminalde bulunan *WASF* homoloji domeninin (WHD) üyeleri ve C-terminali arasındaki etkileşimler nedeniyle kapalı konformasyonel durumda bulunur (Şekil 2-2).

Rac tarafından aktivasyon gerçekleşince WHD etkileşimleri bozulur ve *WASF*'ler, verprolin-kofilin-asidik (VCA) bölgelerinin aktin ile ilişkili protein (Arp) 2/3 kompleksi ve monomerik aktin (G-aktin) ile etkileşime girebildiği açık bir konformasyona dönüşür (Şekil 2-3). Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3); *WASF*'lerin temel alanına (B) bağlanarak *WASF* kompleksini zara alır.

Rac tarafından sitoplazmik *FMRI* etkileşimli protein 1 (*CYFIP1*, ayrıca *SRA1* olarak da anılır) gibi bileşenler aracılığıyla aktivasyonun ardından, konformasyonel bir değişiklik,

*WASF*'lerin VCA bölgesini ortaya çıkararak CA alanının Arp2/3 kompleksi ve monomerik aktin içeren alan V domain ile birleşmesine izin verir [63]. Arp2/3 kompleksi daha sonra yeni bir nükleasyon oluşturarak ve önceden var olan filamentlere bağlanarak aktin polimerizasyonunu ve dallı filament ağı oluşumunu başlatır. Bu dallı çekirdeklenme sürecinden, hücrenin ön kenarındaki aktin projeksiyonları (lamellipodia) ve aktin matrisini bozan yapılar (invadopodia) daha sonra oluşturulur ve hücre hareketliliğini ayrıca matrisin yeniden şekillenmesini kolaylaştırmak için kullanılır [64].

Normal şartlar altında, bu yapıların oluşumu, dokuları hasara karşı korumak için sıkı bir şekilde yönetilir. Patolojik koşullar altında ise kanser hücreleri bu süreci bölgesel olarak invazyonu gerçekleştirmek ve vücudun her yerine metastaz yapmak için kullanır. *WASF3* ekspresyonunun mide kanseri [65], küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [66] ve hepatoselüler karsinom [67] hastalarında daha kötü prognoz ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. *WASP* proteinin yumurtalık kanseri hücrelerinin invazyonunu desteklediği ve onların *Oct4* ve *SOX2* pluripotent transkripsiyon faktörlerinin salgılanmasında önemli bir rol oynadığı bulunmuştur [68]. *WASF3*, invazyon için hücre dışı matrisi yeniden şekillendirerek, matris metalloproteinaz (MMP) sentezinin düzenlenmesiyle de bağlantılıdır [69]. *WASF3*'ün fosfoaktivasyonunun MMP1, MMP3 ve MMP9 seviyelerinin yanı sıra hipoksik koşullar altında da arttığı çalışmalar mevcuttur [70].

### 2.3.1. *WASF3* ile İlgili Sinyal İletim Yolları

**Tablo 2-5:** *WASF3*'ün regülasyonu

<b>1- Transkripsiyonun Regülasyonu</b>	<i>STAT3</i>
	<i>HIF1A</i>
<b>2- Protein Stabilizasyonunun Regülasyonu</b>	<i>HSP70</i>
	<i>ATAD3A</i> bağımlı <i>GRP78</i>
<b>3- Protein Fosforilasyonunun Regülasyonu</b>	<i>HER2/3</i>
	<i>JAK2</i>
	<i>HSP90</i>
	<i>PI3K</i>
	<i>ABL</i>

**WASF3'ün transkripsiyon regülasyonu** ile ilgili *WASF3* transkripsiyon başlatma bölgesinin 1100 baz çifti içinde *STAT3* için üç potansiyel bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler -894 ila -886, -915 ila -906 ve -926 ila -919 konumlarında bulunur. İnterlökin 6 (IL-6), tümör hücreleri tarafından invazyon ve metastazı kolaylaştırmak için kullanılan sitokinlerden biridir. Yapılan çalışmalarda IL-6'nın *WASF3*'ü sitoplazmadaki aktif olmayan formundan sitoplazmik membrana yerleşen *JAK2* ile bağlanan aktif, fosforlu formuna dönüştürebildiğini gösterdi. Spesifik olarak, *STAT3*, *JAK2* kinaz tarafından fosfoaktive edilir ve *WASF3*'ün transkripsiyonunu arttırmak için daha önce bahsedilen bağlanma bölgelerine bağlanmak üzere çekirdeğe yer değiştirir [71].

Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1-Alpha (*HIF1A*) ile düzenleme; hipoksinin, moleküler yollardaki değişiklikler yoluyla kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yapma yeteneğini etkilediği iyi bilinmektedir. Bu yolların bileşenleri, bu nedenle, metastazın önlenmesi için potansiyel terapötik hedeflerler olarak düşünülmektedir. *WASF3* ekspresyon seviyeleri, hipoksik koşullar altında inkübe edilen MDA-MB-231 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarında önemli ölçüde artmaktadır. *WASF3* geninin promotör bölgesinde, dört HRE tanımlandı. HRE1, 2 ve 3, *WASF3* geninin birinci ekzonunun -27 ve -79 baz çiftleri arasında yer almaktadır ve HRE4, aynı referans noktasına -721 ve -725 baz çiftleri etrafında distal olarak yer alır. HIF1'ler bu HRE'ye bağlanmakta ve hipoksik bir ortamda *WASF3*'ün transkripsiyonunu arttırmaktadır. HIF1A'nın yıkılması hipoksi geçiren hücrelerde *WASF3* seviyelerini azalttığı bulunmuştur. VEGF'nin inhibisyonunun kanser hücrelerinin anjiyogenik yeteneğini hedefleyebilmesi ve hipoksik bir ortam yaratabilmesi ve bunun sonucunda *WASF3* seviyelerini arttırabilmesidir. Bu nedenle, yalnızca bu tür ilaçlara dayanan anti-anjiyogenik kanser tedavileri önemlidir [70].

**WASF3'ün protein stabilizasyonunun regülasyonu** şaperon proteinleri adı verilen ısı şok proteinleri *WASF3* proteininin aktivasyonunu kolaylaştırmada ve stabilitesinin korunmasında önemlidir. Şaperon proteinlerinin örnekleri arasında HSP90 ve HSP70 bulunur. HSP90, *ABL* kinaz yoluyla *WASF3* aktivasyonuna bağlanırken, HSP70'in sitoplazmada *WASF3* protein stabilitesini koruduğu ve onu proteazom bozulmasından koruduğu görülmüştür. Farklı kanser hücre hatlarında ısı şoku deneyleri ayrıca, *WASF3* mRNA'sında bir artış olmaksızın HSP70 ve *WASF3* protein seviyelerinin artabildiğini gösterildi [72].

ATAD3A bağımlı GRP78 ile düzenleme; AAA domain içeren 3A (ATAD3A), mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesine katkıda bulunan her yerde eksprese edilen bir mitokondriyal membran ATPaz'dır. ATAD3A, kanser prognozunda önemlidir. Yapılan fare deneylerinde ATAD3A'nın yıkılması, tümör büyümesini, neovaskülarizasyonu ve metastatik kolonilerin insidansını belirgin şekilde baskılamıştır. İn vitro olarak, ATAD3A'yı susturmanın, *WASF3* mRNA seviyelerini değiştirmeden bırakırken *WASF3* protein seviyelerini önemli ölçüde

azalttığı da saptanmıştır. Endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondriyal membranlar arasında ATAD3A-GRP78 bağlanması da gözlemlenmiştir ve ER stresi altında, artan WASF3-GRP78 etkileşimi yoluyla WASF3 stabilizasyonunun arttığı görülmüştür [73], [74].

**WASF3 Protein Fosforilasyonu regülasyonundan** biri insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2/3 (*HER2/HER3*) ile yapılan düzenlemedir. Bunlar kanser invazyonu ve metastazında rol oynayan reseptör tirozin kinazlardır. *WASF3* geni, yüksek dereceli meme kanserinde aşırı eksprese edilmekte, bu aşırı ekspresyon invazyon ve metastazı teşvik etmektedir ancak proliferasyonu etkilememektedir. *HER2 / ERBB2 / NEU* geni de sıklıkla meme kanserinde aşırı eksprese edilmektedir ve bu tümörlerde invazyon ve metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir. *WASF3*'ün *HER2/HER3* kompleksi ile bağlanması, *JAK/ STAT* sinyalleşiminin *HER2/HER3* aktivasyonu ile fosfoaktivasyonunu ve transkripsiyonel upregülasyonunu kolaylaştırır. *HER2*'yi aşırı eksprese eden meme kanseri hücrelerinde, bu nedenle, invazyonu kolaylaştırmak için *WASF3* özellikle gereklidir. Bu nedenle *WASF3*'ün hedeflenmesi, *HER2*'yi aşırı ifade eden meme tümörlerinin metastazını bastırmak için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabilir [75].

*JAK2* tarafından düzenlemede yapılan çalışmalarda *WASF3*'ün hücre zarına taşınmasını ve hücre içi aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini kolaylaştıran, hücre göçüne ve metastaza yol açan *JAK2* yoluyla *WASF3* fosfoaktivasyonunu indüklediği görülmüştür [71].

HSP90 gibi şaperon proteinleri, proteinlerin hücre içindeki stabilitelelerini ve seviyelerini etkileyerek uygun şekilde katlanması ve bozulması için gereklidir. *ABL*'nin HSP90 hedeflemesi yoluyla, *WASF3* fosfoaktivasyonunun, *ABL* kinaz destabilizasyonunun bir sonucu olarak inhibe ettiğini, invazyon ve metastaz potansiyelinde bir azalmaya yol açtığını göstermektedir [72].

Fosfoinositid 3-Kinaz (PI3K) ile düzenleme de PI3K proteini bir p110 katalitik alt birim ve Aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ve hücre göçü için önemli bir efektör olan p85 düzenleyici alt birimi olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. PDGF, PI3K aktive edilmiş PDGFR'ye bağlanır ve bu bağlanma p85C-terminali SRC homoloji 2 (SH2) alanı yoluyla olur ve oluşan kompleks sitoplazma içine aktarılır. *WASF3*-p85 etkileşiminin Aktin polimerizasyonunda ve hücre invazyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [76], [77].

Abelson Tirozin Kinaz (*ABL*) ile düzenleme, yapılan hücre çalışmalarında *ABL* kinaz inhibitörü Gleevec ile tedavide, *WASF3* fosforilasyon seviyelerinde çarpıcı bir düşüşe yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, *WASF3*'ün amino asit dizisindeki dört tirozinin dahil olduğu Tyr-151, Tyr-248, Tyr-337 ve Tyr-486 *ABL* aracılı fosforilasyonda bunların dördü de mutasyona

uğradığında *ABL* kinaz bu fosforilasyon sürecindeki rolünü yerine getiremez ve lamellipodia oluşumu ve hücre invazyonunu azaltmaktadır [78].

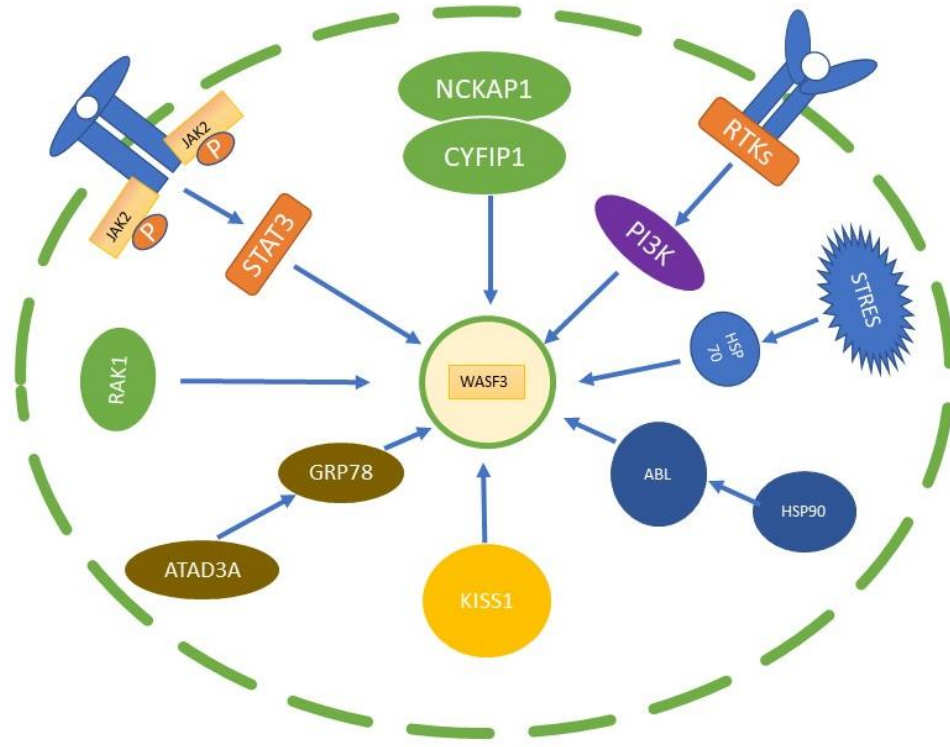
### 2.3.2. *WASF3* ve Metastaz

Kemik mikro çevresi hem birincil hem de ikincil tümörlerin gelişimi için ideal bir alandır. Primer bir kemik tümörü olarak osteosarkomun oluşumu ve gelişimi, kemik mikroçevresi ile yakından ilişkilidir. Başka bölgelerden kaynaklanan bazı ikincil tümörler, meme kanseri, prostat kanseri vb. dahil olmak üzere kemiğe yayılma eğilimindedir

Kemik mikroçevresi, birçok farklı kanserin gelişmesi için ideal bir yapıdadır. Kemik mikroçevresinde mezenkimal kök hücreler (MSC); asitler, hipoksi ve kemokinler gibi çeşitli sinyal yollarıyla osteosarkomun ilerlemesini ve malignitesini etkilemektedir. Çok sayıda araştırmacı, kemik mikroçevresinde bulunan MSC'lerin OS'nin invazyonunu ve metastazını desteklediğini söylemektedir. Sıçan OS modellerinde COS1NR hücrelerinin deri altı enjeksiyonundan 3 hafta ve 5 hafta sonra, MSC'lerin intravenöz enjeksiyonunun tümör büyümesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı, oysa pulmoner metastazı önemli ölçüde teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca MSC'ler, upregüle edilmiş laktat monokarboksilat taşıyıcıları tarafından daha fazla laktik asit salgılayabilir. Bu süreç, OS'nin mitokondriyal aktivitesini iyileştirmek için OS tarafından indüklenen oksidatif stres tarafından yönlendirilir ve daha sonra OS metastazına yol açmaktadır. Membranla ilişkili bir TGF- $\beta$  formunu taşıyan ekstraselüler veziküller, MSC'lerde, tümör hücre dışı vezikül eğitimli mezenkimal kök hücreler (tumor extracellular vesicle educated mesenchymal stem cells) (TEMSC'ler) olarak adlandırılan IL-6 ekspresyonunu uyarmaktadır [75].

Hipoksi ve asidik koşullar tarafından indüklenen bir dizi genin anormal ifadeleri sarkom metastazını desteklemektedir. Hipoksi, osteosarkom metastazındaki araştırmaların ana odağı olan Hipoksi ile indüklenebilir faktörün ekspresyonunu tetiklemektedir. Kemik mikroçevresindeki pH dengesi, normal kemik oluşumunu ve kemik erimesini sürdürmek için önemlidir. Asidoz mikro ortamı, mezenkimal kök hücrelerin aktivasyonu ile sarkomun ilerlemesini desteklemektedir.

*WASF3* metastazı kontrol eden çeşitli sinyal yollarında önemli bir bağlantıdır ve terapötik hedefleme potansiyeli yüksektir. *CYFIP1-NCKAP1* dimeri, WASF Homoloji Domainine bağlanan ve proteini inaktif formda tutan Verprolin-Kofilin-Asidik (VCA) bölgesinin bir parçasıdır. *CYFIP1-NCKAP1* dimeri, aktin polimerizasyonunu önlemektedir. Meme ve prostat kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda *WASF3* ve *CYFIP1* arasındaki etkileşimi bozmak *WASF3* aktivasyonunu bastırmak yoluyla invazyonunun engellenmesi şeklinde gerçekleşmektedir [79], [80], [81].



**Şekil 2-4:** Metastazda *WASF3* sinyal yolları ([61] numaralı kaynakçadan değiştirilerek alınmıştır)

## 2.4. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar normal ve patolojik dokularda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rollere sahip, kodlanmayan RNA grubuna ait 19-25 nükleotitlik moleküllerdir. MikroRNA'lar (miRNA'lar) birçok kanserin başlamasında ve gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. miRNA'lar, hücre döngüsü ilerlemesi, proliferasyon, tümörgenezde önemli işlev gösterir. Ewing sarkomların ve osteosarkomların tümörgenezi sırasında birçok miRNA'nın işlev gördüğü bilinmektedir. Araştırmalar, miRNA'ların onkojenler veya tümör baskılayıcı genler olarak hareket edebileceğini ve miRNA ekspresyonlarındaki değişikliklerin çeşitli insan kanserleri ile yüksek oranda ilişkili olduğunu göstermektedir [82], [83].

miRNA'lar, kodlayıcı olmayan küçük RNA'lardır ve pre-miRNA'lar olarak bilinen primer transkriptlerden RNA'ya özgü bir ribonükleaz enzim kompleksi olan DROSHA ile işlenmektedir[84]. Pre-miRNA'lar sitoplazmada fonksiyonel olgun miRNA'ya dönüştürülmektedir. Bu pre-miRNA'lar ayrıca RNA girişimine katılan RNA kaynaklı susturma kompleksine benzer bir hücrel kompleks ile bağlantılı olan olgun miRNA'ları oluşturan

endonükleaz Dicer tarafından ayrılmaktadır. Olgun miRNA'lar, RNA kaynaklı susturma kompleksi(RISC) için tamamlayıcı hedef mRNA'lara bağlanarak hücrede protein prodüksiyonunu düzenlemektedir. RISC, mRNA'nın ayrılması ve parçalanmasıyla protein ekspresyonunu inhibe etmek için hedef mRNA'lar ile mükemmel bir şekilde eşleşmektedir.

miRNA'ların üretimi, nükleer sentez ve sitoplazmik sentez içeren ve çeşitli enzimlerin katılımını gerektiren çok karmaşık bir biyolojik süreçtir. İlk olarak, miRNA'yı kodlayan gen, çekirdek içindeki RNA polimeraz II tarafından özel firkete yapılarına (AAAAA ve 7MGpppG) sahip bir pri-miRNA'ya kopyalanır. Daha sonra, pri-miRNA'lar nükleaz Drosha (ribonükleaz III) tarafından parçalanır. Ribonükleaz III tarafından kesilen miRNA'lar 70 ila 100 nükleotit uzunluğunda olup pre-miRNA'ya değişirler. Sitoplazmik bir taşıyıcı olan Exportin-5, Ran-GTP yardımıyla pre-miRNA'ları çekirdekte sitoplazmaya taşır ve daha sonra pre-miRNA, ribonükleaz III (Dicer) tarafından yaklaşık 19-23 nükleotitlik kısa çift iplikli olgun miRNA'lara dönüşürler İplik ayrılmasından sonra, bir sarmal miRNA genellikle bozulur ve diğer sarmal miRNA, olgun bir miRNA oluşturmak için AGO (argonaute) proteinine bağlanır. miRNA'ların bir zinciri Argonaute proteinine bağlı RNA kaynaklı susturma kompleksi olan RISC enzim kompleksine bağlanarak hedef mRNA'nın ORF, 3'UTR, 5'UTR bölgelerine veya promotör bölgelerine bağlanarak translasyonu ya mRNA'yı yok ederek ya da mRNA'yı baskılayarak engellemektedir [85].

**Tablo 2-6:** Sarkomlarla ilişkili bazı miRNA'lar

<p><b>miR-34 ailesi</b>, tümör baskılanması ile ilişkili olan ve insan tümörlerinde downregüle olan evrimsel olarak korunmuş miRNA'ların bir grubudur. Ayrıca yapılan çalışmalarda miR-34b'nin ekspresyon seviyeleri immunohistokimyasal olarak <i>EWS-FLII</i> pozitif örneklerde <i>EWS-FLII</i> negatif örneklere kıyasla daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir [84].</p>
<p>Vasküler endotel hücre büyüme faktörü A (<i>VEGFA</i>), <b>miR-638</b>'in hedef bir geni olduğu bildirilen <i>VEGF</i> ailesinin önemli bir üyesidir. MicroRNA-638, insan Ewing sarkom hücrelerinde <i>VEGFA</i> ekspresyonunu baskılayarak hücre büyümesini ve tübül oluşumunu inhibe etmektedir [86].</p>
<p><b>miR-708-5p</b>, <i>EWS/FLII</i> Ewing sarkomu ile ters ilişkilidir. Bu miRNA, tümör büyümesini etkilememektedir [87].</p>
<p>Hipoksi ile indüklenebilen faktör-1<math>\beta</math> (HIF-1) <b>miR -107</b>'nin bir hedef geni olarak kabul edilmektedir. Ewing sarkom hücrelerinde miR-107, kısmen HIF-1<math>\beta</math> hedefleyerek Ewing sarkom hücrelerinin hücre çoğalmasını ve tüp oluşumunu baskılamaktadır [88].</p>

<p><b>miR-20b</b>, transforming growth faktörü reseptörü II (<i>TGFBR2</i>)'nin hedeflenmesi yoluyla hücre çoğalmasını destekler ve Ewing sarkom hücrelerinde MYC ekspresyonunu artırmaktadır [89].</p>
<p>2017 yılında yapılan bir araştırmada Ewing sarkomun metastatik mekanizmalarını anlamak için <b>miR-130b</b> ile çalışılmıştır. Bunun sonucunda CDC42-PAK1-AP1 kaskadlarındaki yolu etkileyerek ARHGAP1'i doğrudan hedef aldığı gösterilmiştir [90].</p>
<p><b>miR-145-3p</b> proliferasyonu baskılar ve HDAC4'ü hedefleyerek osteosarkom hücresinin apoptozis ve otofajisini destekler. Çalışmalar, miR-145-3p'nin bir tümör baskılayıcısı olarak işlev gördüğünü ve tümör büyümesi ve metastaz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. miR-145-3p'nin, osteosarkomda normal kemik dokusuyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. miR-145-3p'nin aşırı ekspresyonu, proliferasyonu önemli ölçüde azaltarak, osteosarkom hücrelerinin apoptoz ve otofajisini indüklediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar miR-145-3p'nin osteosarkomda tümör baskılayıcı olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir [91].</p>
<p>2021 yılında yapılan çalışmada <b>miR-146b-5p</b>'nin <i>BTG2</i>'yi baskılayarak Ewing sarkomun ilerlemesini sağladığını ortaya koydu, bu da gelecekte antikanser ilaç gelişimine ve Ewing sarkom tedavisine ışık tutabilir [92].</p>
<p>2021 yılında yapılan farklı bir çalışmada literatürde ilk kez <b>miR-145'</b> in deregülasyonunun kök hücre özelliklerini hedefleyerek TC71 ve TC106 hücrelerinde tümör büyümesi ve metastazının inhibisyonuna yol açarak EMT sürecini inhibe ettiği gösterilmiş ve <i>SOX2</i>, <i>KLF4</i> ve <i>OCT4</i>'ün önemli bir düzenleyicisi olarak miR-145'in Ewing sarkomunda önemli bir miRNA olduğu ortaya koyulmuştur [93].</p>
<p><b>miR-301a</b>, Ewing sarkom hücrelerinde <i>PTEN</i>'i hedeflemek yoluyla hücre çoğalmasını desteklemektedir [94].</p>

miRNA'lar karsinogenezde önemli bir rol oynarlar. miR-218 ekspresyonunun mesane kanseri [95], glioblastom[96], serviks kanseri [97] gibi çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı olduğu bildirilmiştir. miR-218, en bilinen miRNA'lardan biridir ve mide kanserinde ilerlemeyi engellediği gösterilmiştir [98]. miR-218'in, periodontitiste MMP-9 aracılığıyla osteoklast farklılaşmasını ve inflamasyon yanıtını modüle ettiği bildirilmiştir [99]. Yakın zamanda miR-218-5p'nin hepatoselüler karsinom, retinoblastoma, mide, ağız ve mesane

kanserleri gibi birçok insan kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı bildirilmiştir [100], [101], [102], [103], [104].

2021 yılında yapılan bir çalışmada miyokard enfarktüsü (MI) sonrası miyokard fibrozu, kalp fonksiyonunun bozulmasında temel bir faktör olarak kabul edilmiştir. miRNA'ların kalbin çeşitli patofizyolojik süreçlerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, MI sonrası miyokardiyal fibroblastlarda miR-218-5p'nin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [105].

miRNA'ların genellikle birden fazla hedefi vardır. Bu nedenle, miRNA'lar potansiyel olarak binlerce geni düzenler ve bunların çoğu transkripsiyonel düzenleme veya hücre döngüsünün kontrolü gibi diğer temel hücrel işlevler düzeyindedir. miRNA'ların bu potansiyeli göz önüne alındığında, miRNA'ların çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynaması şaşırtıcı değildir [106].

## 2.5. DNA Metilasyonu

Genetik mekanizmalarla düzen içinde çalışan epigenetik modifikasyonlar transkripsiyonel aktiviteyi regüle etmek için, kanserinde içinde bulunduğu birçok hastalıkta düzensizdir. Kanser epigenetiği, DNA dizilimindeki herhangi bir mutasyondan kaynaklanmayan, gen ekspresyonunda gözlenen çeşitli kalıtsal farklılıklardır. DNA metilasyonu, miRNA'lar, histon modifikasyonları, circRNA'lar, uzun kodlayıcı olmayan RNA'ların ekspresyonu, tümör oluşumu, kanser ilerlemesi ve metastaz ile bağlantılı epigenetik mekanizmalardır [107].

DNA metilasyonu, hücrel biyolojide ve genom ekspresyonunun fizyolojik kontrolünde güçlü bir şekilde yer alan önemli bir epigenetik modifikasyondur. [108]. DNA metilasyonu, 1980'lerin başında insanlarda bulunan ilk epigenetik modifikasyondur [109]. DNA metilasyonu, metil donörü olarak S-Adenil Metionin (SAM) kullanılarak DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) ile bir CpG dinükleotitinin sitozin halkasına bir metil grubunun kovalent olarak eklenmesidir [110]. CpG dinükleotitleri ökaryotik organizmaların genomları boyunca yaygın olarak dağılmış olmasına rağmen, CpG açısından zengin bölgeler (CpG adaları olarak da adlandırılır) özellikle genlerin promotör bölgelerinde yoğunlaşmıştır. CpG adalarının hipermetilasyonu, heterokromatin bölgelerinde meydana gelirken, hipometilasyon genellikle aktif olarak eksprese edilen genlerde meydana gelir. Genom çapında hipometilasyon ve promotöre özgü hipermetilasyon, kanserin ortak özellikleridir. CpG adalarında genom çapında DNA metilasyonu kaybı, kanserlerde tanımlanan ilk epigenetik değişikliktir. "DNA hipometilasyonu" olarak adlandırılan genom çapında bölgelerde DNA metilasyonu kaybı, genomik kararsızlık ve kanser ilerlemesi ile ilişkilidir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde en çok tanınan epigenetik değişiklik, tümör baskılayıcı genleri etkileyen promotör

hipermetilasyonudur. Bu susturma mekanizmasının ilk örneklerinden biri, retinoblastoma ile ilişkili bazı RB1 alellerinde keşfedilmiştir [111]. Promoter bölgelerdeki anormal CpG metilasyonu, tümör baskılayıcı genleri inaktive edebilir veya protoonkogenleri aktive edebilir [112]. Protoonkogenlerin DNA hipometilasyonu ve transpoze olabilen elementlerin aktivasyonu, karsinogenez ve metastaz ile ilişkilidir [113]. *BRCA1*, *Rb* ve *p53* gibi tümör supresör genlerin promotörlerindeki CpG adalarının hipermetilasyonu, her bir proteinin inaktivasyonuna yol açarak kanser gelişimini indüklemektedir [107]. DNA metilasyonu, sabit örneklerde bile zaman içinde stabildir, iyi bilinen tekniklerle kolayca saptanır, çeşitli vücut sıvılarında bulunur ve hücre tipine özgüdür [114].

*MGMT* (0-6 metilguanin DNA metiltransferaz) enzimi, kimyasal modifikasyonun tersine çevrilmesini katalize etme yeteneğine sahiptir. Bu enzim, gliomalar ve kolorektal gibi bazı solid tümörlerde *MGMT* gen promotörü metilasyonu ile inaktive edilir. Bu tür tümörlerin Temozolamid gibi bazı monofonksiyonel alkilleyici ajanlara karşı aşırı duyarlılığı bildirilmiştir [115]. Örneğin, promotör hipermetilasyonu, delesyon yoluyla zaten bir aleli kaybetmiş olan kolorektal kanser hücrelerinde *CDKN2A* alelinin inaktivasyonuna katkıda bulunur [116]. Kolon kanseri hücrelerinde *DNMT1*'in inhibisyonu, *INK4a/p16'* yı yeniden aktive etmek ve hücre döngüsü durmasını indüklemek için yeterli hale gelmektedir [111].

Epigenetik kontrol, normal gelişim için ve çevreye tepki olarak hangi genlerin açılması veya kapatılması gerektiğini gösterir. Çoğunlukla "epigenetik writers", "epigenetik readers" ve "epigenetik erasers" adı verilen protein grupları tarafından düzenlenirler. Epigenetik writers (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) genom etrafında değişiklikler oluşturan enzimlerdir. Bu değişiklik readers (*MBD* ailesi-metil-CpG-bağlanma domaini) tarafından fark edilir. Son olarak, epigenetik değişikliğe artık ihtiyaç duyulmadığında erasers (*TET1*, *TET2*, *TET3*) bunu kaldırabilir. *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* tanımlanmış önemli DNAmetiltransferazlardır. *DNMT3A* ve *DNMT3B*, embriyogenez sırasında ilk CpG metilasyonundan sorumlu olan de novo metiltransferazlardır. *DNMT1*, hemimetillenmiş CpG'lerde tercihli metilasyon yoluyla kromozom replikasyonu sırasında metilasyon modelini korur [107]. Yapılan çalışmalarda *DNMT* proteinlerinin ve *MBD* proteininin mutasyon veya aşırı ekspresyonunun tümörjenez ile korele olduğu gösterilmiştir [117]. Ayrıca çok sayıda hematolojik malignitede *TET* ailesi genlerinde mutasyonların bulunduğu bildirilmiştir [118].

Prostat, meme, mide, karaciğer, akciğer, glioblastoma ve lösemi dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünde hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon olan anormal DNA metilasyon kalıpları bildirilmiştir [119], [120], [121], [122], [123].

Anormal DNA metilasyon modellerinde iki sitidin analogu, 5-azasitidin/vidaza (AZA) ve 5-aza-20-deoksisitidin/dakojen (DAC), FDA tarafından miyelodisplastik sendromların

(MDS) tedavisi için onaylanmıştır. Bu iki bileşik, *DNMT1* ile geri dönüşü olmayan bir kovalent kompleks oluşturmakta ve proteazom aracılı *DNMT1* bozulmasını tetiklemektedir. Desitabinin aktif bir metaboliti olan ikinci nesil analog Guadesitabin (SGI-110), MDS ve akut miyeloid lösemi (AML) için klinik deneyde test edilmektedir [124]. *TET* ailesinin birkaç kanserdeki rolü son çalışmalarda önerilmiş olsa da, bir TET protein inhibitörü henüz kanser tedavisi için test edilmemiştir [107].



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç -Materyal

Deney grubu İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Çocuk Onkoloji Polikliniğine başvuran 25 sarkomlu hasta (Ewing sarkomu, Osteosarkom, Sinoviyal sarkom, İğsi hücreli sarkom) ve hasta popülasyonu yaş, cinsiyet ve etnik köken olarak eşleştirilmiş 22 sağlıklı çocuktan oluşturuldu. Ayrıca 4 tümör dokusu, bu hastalardan 2 hastanın tümöre yakın eşlenik dokusu çalışmaya dahil edildi. Tedavi öncesi, operasyon esnası ve tedavi sonrası olmak üzere bir takipli hastanın da tümör ve periferik kanları çalışıldı.

Tez çalışması için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi etik kurul komisyonu tarafından 26/06/2020 tarihinde yapılan toplantıda, 16 sayılı belge ile etik kurul onayı alındı (Etik Kurul onay: 02/07/2020, dosya no: 74742).

Çalışmada hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait kalite kontrolü geçen uygun konsantrasyondaki RNA'lar ve DNA' lar kullanıldı. Çalışmaya alınan hastalar EW harfleri ile kontrol grubu ise ÇK harfleri ile kodlandı. Çalışmada yer alan deney gruplarının ortalama yaşları; sarkomlu hasta grubu için  $13,5 \pm 6,3$  (5-38); kontrol grubu için  $10,5 \pm 3,6$  (4-18) arasında idi.

Çalışmaya katılan tüm çocukların vasileri örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirildi ve gönüllü onam formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya alındı.

#### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler Tablo 3-1' de verilmiştir.

**Tablo 3-1:** Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

➤ Etilen-Diamin-Tetraasetikasit (EDTA)
➤ Etanol [RIEDEL DE HAEN]
➤ Etidyum Bromid (EtBr) [SIGMA]
➤ Biocoll Separating Solution (Ficoll) [BIOCHROM]
➤ Bromfenol Mavisı (BFB) [SIGMA]
➤ Quick DNA MiniPrep Kit [ZYMO RESEARCH]
➤ Quick RNA MiniPrep Kit [ZYMO RESEARCH]
➤ SensiFAST cDNA Sentez Kiti [BIOLİNE]
➤ SensiFAST SYBR No-ROX Kit
➤ EZ DNA Methylation-Gold Kit [ZYMO RESEARCH]
➤ Human Methylated & Non-methylated DNA Set [ZYMO RESEARCH]

➤ ZymoTaq PreMix [ZYMO RESEARCH]
➤ Primerler 100 nmol HPLC (IO-HPLC)
➤ ID3EAL Individual miRNA RT Primer 1-plex [MIRXES]
➤ ID3EAL miRNA qPCR Master Mix [MIRXES]
➤ ID3EAL cDNA Sentez Kiti [MIRXES]
➤ ID3EAL Individual miRNA qPCR Assay [MIRXES]
➤ Marker
➤ Agaroz [SIGMA]
➤ RNAlater

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3-2' de verilmiştir.

**Tablo 3-2:** Kullanılan Cihazlar

➤ -30 ve -80 Derin Dondurucu [SANYO]
➤ Mikropipetler [GILSON, İSOLAB]
➤ Santrifüjler [HERAUS, NÜVE, HETTICH, JOUAN]
➤ Termal Döngü Cihazı [TECHNE]
➤ Gel Dökümantasyon Sistemi [BRL]
➤ Spektrofotometre NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC]
➤ MIC Real Time PCR Cihazı
➤ Distile Su Cihazı [MILLIPORE]
➤ Mikrodalga Fırın [ARÇELİK]
➤ Etüvler (37°C ve 56°C) [NÜVE]
➤ Vorteks [FINEPZR]
➤ Manyetik Karıştırıcı [NÜVE]
➤ Azot Tankları [MVY]

### 3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

Tez çalışmasında kullanılan tampon çözeltiler: 1 litre 10X PBS tampon çözeltisi hazırlamak için 80 gram sodyum klorür (NaCl) , 2 gram potasyum klorür (KCl) , 11,5 gram disodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ve 2 gram potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözüldü. 1 litre 10X TBE ( Tris- Borik Asit- EDTA) tampon çözeltisi hazırlamak için 55 gram borik asit, 40 mL 0,5 M EDTA( pH: 8.00) ve 108 gram Tris kullanıldı.

### 3.2. Yöntem

Çalışmada sırasıyla aşağıdaki deneyler gerçekleştirildi.

- 1- Periferik kandan lenfosit izolasyonu
- 2- Lenfosit hücrelerinden RNA ve DNA izolasyonları
- 3- Dokudan DNA ve RNA İzolasyonları
- 4- *WASF3* geninin ekspresyonu için total RNA'dan cDNA sentezi ve SYBR Green ile Real time PCR (RT-qPCR)
- 5- miR-218-5p'nin ekspresyonu için total RNA kullanarak cDNA sentezi ve ekspresyon analizi
- 6- DNA kullanılarak Bisüfit Modifikasyonu ve Metilasyon Spesifik PCR, Agaroz Jel Elektroforezi

*WASF3* geninin ve miR-218-5p'nin ekspresyon düzeyi, *WASF3* geninin metilasyonu hasta ve sağlıklı kişilerin periferik kan lenfositlerinde ve 4 hastanın dokularında incelendi. Sarkomlu çocuklardan ve sağlıklı kontrol grubu çocuklardan alınan 10 mL periferik kan örneklerinden ilk önce lenfositler izole edildi. İzole edilen lenfosit hücrelerinden ve dokulardan total RNA ticari kit ile (ZYMO Research Quick-RNA™ Miniprep Plus Kit) izole edildi. Bu RNA örneklerinden hem *WASF3* gen ekspresyonu için cDNA (BIOLİNE SensiFAST cDNA Sentez Kiti ile) hem de Revers Transkriptaz yöntemiyle hedef miRNA'lara özgü cDNA (MIRXES ID3EAL cDNA Sentez Kiti ile) sentezlendi. Araştırılan miRNA'nın ekspresyon düzeyi *RNU6-1* referans gen varlığında kantitatif Real Time-PCR (Gerçek Zamanlı-PCR) yöntemi ile incelendi.

Metilasyon deneyleri için DNA'lar periferik kandan izole edilmiş olan lenfosit pelletinden ve dokulardan ticari kit ile (ZYMO Research Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit) izole edildi. Örnekler Zymo Research EZ-DNA Gold Metilasyon kiti ile Bisüfit modifikasyonuna tabi tutulduktan sonra Metilasyon spesifik PCR ile metile reaksiyon ve unmetile reaksiyonlara ait PCR amplikonuna ait bantlar değerlendirilerek örneklerin metile ve unmetile olup olmadıkları belirlendi.

#### 3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

- 10 mL periferik kan örneği Na- EDTA'lı tüpe alındı. Periferik kan %0,9'luk NaCl ile 1/1 oranında seyreltildi.
- Seyreltilen kan örneği falkon tüpte bulunan 2 mL Ficoll üzerine pipet yardımıyla yüklendi. 30 dk. 1910 RPM'de santrifüj edildi.

<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Alt fazında eritrositler, orta fazında lenfositler, üst fazında plazma bulunan falkon tüpten lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir falkon tüpe aktarıldı.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 10 dk. 1910 RPM'de santrifüj edildi.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Süpernatant boşaltılarak 2 mL PBS pellet üzerine eklendi ve pipetleme yapılarak pellet çözüldü. Elde edilen pellet 2 kriyo tüpe 1'er mL olacak şekilde dağıtıldı. Bir hasta örneği için 4 tane kriyo tüp olacak şekilde çalışma devam ettirildi.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Kriyo tüpler 4 dk. 1910 RPM'de santrifüj edildi. Üst faz döküldü. Elde edilen hücreler -80°C'de bir gün süreyle bekletildi.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Son olarak kriyo tüplerdeki hücreler uzun süreli saklanmak üzere azot tanklarına kaldırıldı.</li> </ul>

### 3.2.2. Lenfosit Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Saf RNA izole etmek amacıyla ticari bir kit olan QuickRNA Mini Prep Plus Kit [ZYMO RESEARCH] protokolü kullanılarak lenfosit hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu işlem aşamaları kit protokolüne göre şu şekildedir:

<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Azot tankından çıkarılan kriyo tüplerinde bulunan lenfosit hücrelerinin üzerine RNA Lysis Buffer (300µL) eklendi ve çözülene kadar pipetaj yapıldı ve sarı filtrelili toplama tüplerine (Spin Away Filter) aktarıldı.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1 dakika 12,000 g'de santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra sarı kolon genomik DNA eldesi için ayrıldı.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Santrifüjü takiben altta toplanan fazın üzerine 300 µL %95-100'lük etanol eklendi ve Zymo-Spin IIICG Column adı verilen yeşil kolonlu toplama tüplerine aktarıldı. 1 dakika 12,000 rcf'de santrifüj edildi.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Yeşil kolon temiz boş tüpe alındıktan sonra üzerine RNA Wash Buffer (400µL) eklendi. 2 dakika 12,000 g'de santrifüj yapıldı.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Bir hasta için 75 µL DNA Digestion Buffer ; 5 µL DNase I ile karıştırılarak yeşil kolon üzerine 80 µL mix eklenerek oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Kolonun üzerine RNA Prep Buffer (400 µL) eklendi ve 60 saniye 12,000 g'de santrifüj edildi. Tüpün altında kalan faz uzaklaştırıldı.</li> </ul>

➤ Kolonun üzerine yıkama tamponu RNA Wash Buffer (700 µL) eklendi ve 2 dk. 12,000 g'de santrifüj edildi. Tüpün altında kalan faz uzaklaştırıldı.
➤ Kolonun üzerine yıkama işlemini tekrar etmek için RNA Wash Buffer (400 µL) eklendi ve 2 dakika 12,000 g'de santrifüj edildi. Tüpün altında kalan faz uzaklaştırıldı.
➤ Kolon RNaz içermeyen 1,5 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 40 µL DNaz/RNaz içermeyen steril distile su eklendi. 12,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
➤ İzole edilen RNA'ların kalite kontrolleri yapıldıktan sonra birkaç eppendorf tüpe bölünerek -80°C'de saklandı.

### 3.2.3. Lenfosit Hücrelerinden DNA İzolasyonu

Elde edilen lenfosit örneklerinden DNA izole etmek için ticari bir kit olan Quick-DNA MiniPrep Plus Kit [ZYMO RESEARCH] protokolü kullanıldı. Protokole göre;

➤ Örnek kaybını aza indirmek için RNA izolasyonu yapılırken genomik DNA için ayrılan sarı kolonlarla çalışmaya devam edildi.
➤ Sarı filtreli kolon üzerine 400 µL DNA Pre- Wash Buffer eklendi ve 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
➤ Kolon temiz boş tüpe alındıktan sonra üzerine 700 µL g-DNA Wash Buffer eklendi ve 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
➤ Alt faz atıldıktan sonra kolon üzerine 200 µL g-DNA Wash Buffer eklendi ve 12,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
➤ Kolon DNaz içermeyen 1,5 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 50 µL DNA Elution Buffer eklendi. 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi
➤ Elde edilen DNA'ların kontrolleri yapıldıktan sonra birkaç tüpe bölünerek -80°C'de saklandı.

### 3.2.4. Dokudan RNA izolasyonu

Etkili RNA stabilizasyonu sağlamak için laboratuvara gelen doku örnekleri RNAlater ile muamele edildi. Tüplere konulan RNA örnekleri 0,5 cm kalınlıktan daha ince olacak şekilde parçalanarak RNAlater solüsyonunun dokuya etki oranı artırılması sağlandı. 1mg doku için 10 µL RNAlater solüsyonu kullanıldı. -80°C'de saklama için doku alındıktan sonra gece boyunca 2-8 °C aralığında stabilizasyon için bekletildi. RNA ve DNA izolasyonu yapılmadan önce RNAlater dokulardan uzaklaştırıldı.

1- Doku bistürü yardımıyla cam petri içinde küçük parçalara ayrıldı. Bu dokular ependorf tüpe alınarak üzerine 30 µL PK Digestion Buffer ve 15 µL Proteinaz K eklendi.
2- Vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 3 saat inkübasyon yapıldı.
3- İnkübasyondan sonraki mevcut hacim kadar RNA Lysis Buffer eklendi ve çözülene kadar pipetaj yapıldı ve sarı filtreli toplama tüplerine (Spin Away Filter) aktarıldı. 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4- Santrifüjden sonra altta toplanan fazın üzerine 300 µL %95-100'lük etanol eklendi ve yeşil kolonlu toplama tüplerine (Zymo-Spin IICG Column) aktarıldı. 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5- Yeşil kolon yeni boş tüpe alındıktan sonra üzerine 400 µL RNA Wash Buffer eklendi. 12,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
6- Bir hasta için 5 µL DNase I ve 75 µL DNA Digestion Buffer karıştırılarak yeşil kolon üzerine 80 µL mix eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
7- Kolonun üzerine 400 µL RNA Prep Buffer eklendi ve 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki faz uzaklaştırıldı.
8- Kolonun üzerine yıkama tamponu 700 µL RNA Wash Buffer eklendi ve 12,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Alttaki faz uzaklaştırıldı.
9- Kolonun üzerine yıkama işlemini tekrar etmek için 400 µL RNA Wash Buffer eklendi ve 12,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Alttaki faz uzaklaştırıldı.
10-Kolon RNaz içermeyen 1,5 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 40 µL DNaz/RNaz içermeyen steril distile su eklendi. 12,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
11-Elde edilen RNA'ların kontrolleri yapıldıktan sonra birkaç tüpe bölünerek -80°C'de saklandı.

### 3.2.5. Dokudan DNA izolasyonu

Dokudan DNA izole etmek için ticari bir kit olan Quick-DNA MiniPrep Plus Kit [ZYMO RESEARCH] protokolü kullanıldı. Protokol aşamalarına göre;

1- Doku bistürü yardımıyla cam petri kutusu içinde küçük parçalara ayrıldı. Bu dokular ependorf tüpe alınarak üzerine 95 µL su, 95 µL Solid Tissue Buffer ve 10 µL Proteinaz K eklendi.
2- Vortekslendikten sonra inkübatörde 55 °C 'de 3 saat bekletildi.
3- İnkübasyondan sonra örnek miktarının iki katı kadar Genomic Binding Buffer eklendi. 10 sn vortekslendi ve sarı kolona aktarıldı.

4- 12,000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
5- 400 µL DNA pre- Wash Buffer eklendi. 12,000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
6- 700 µL g-DNA Wash Buffer eklendi. 12,000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
7- 200 µL g-DNA Wash Buffer eklendi. 12,000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
8- Kolon temiz saklama tüpüne alındı. 50 µL DNA Elution Buffer eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi
9- Elde edilen DNA'ların kontrolleri yapıldıktan sonra birkaç tüpe bölünerek -80°C'de saklandı.

### 3.2.6. RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

RNA ve DNA' da ki nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda en yüksek absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri ( $A_{260}$ ) oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram seviyesinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. İzolasyonu yapılan RNA'ların ölçümleri NanoDrop 2000 Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC] cihazında sulandırılmamış stok örneklerden 1 µL alınıp, cihaza yüklenerek yapıldı. RNA'nın saflığı  $A_{260}$  nm dalga boyundaki ölçümün  $A_{280}$  ölçümüne bölünmesi sonucu ( $A_{260}/A_{280nm}$ ) belirlendi. Absorbansı 1.6 ile 2.0 arasında olan OD (Optik Density- optik yoğunluk) RNA'lar uygun saf RNA örneği olarak kabul edildi ve çalışmaya dahil edildi. RNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 optik densitesilik absorbans 40 µg RNA molekülüne eşittir. RNA konsantrasyonu NanoDrop cihazı ile ölçülürken 1 µL hacim yeterli geldiğinden RNA konsantrasyonu doğrudan ölçülebilmekte ve RNA'nın seyreltilmesine gerek kalmamaktadır. Bundan dolayı NanoDrop cihazı ile ölçülen RNA'nın konsantrasyonu aşağıda verilen denklem şeklinde hesaplanır:

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı (1)} \times 40 \mu\text{g/ mL}$$

RNA örneklerinin sonraki deneylerde konsantrasyonlarının eşit olması gerektiği için hasta ve kontrol grubuna ait örnekler uygun şekilde sulandırıldı.

### 3.2.7. DNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

İzole edilen DNA'ların Thermo Scientific Nanodrop2000 cihazında miktar tayini ve saflık kontrolü yapıldı. Elde edilen DNA örneklerinden 1 µL cihaza yüklenerek absorbans ölçümü yapıldı. Örneğin saflığı için 260/280 nm oranının yaklaşık olarak 1,8 ve 260/230 nm oranının ise 2-2.2 arasında olmasına dikkat edildi. Kimyasal madde ve protein kontaminasyonu olmadığı saptanan DNA örnekleri Metilasyon Spesifik PCR'ın ilk aşaması olan bisülfid modifikasyonu için hazırlandı.

### 3.2.8. *WASF3* Gen Ekspresyonu İçin cDNA (komplementer DNA) Sentezi ve Real Time PCR Yöntemi (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Çalışmamızda araştırdığımız *WASF3* geninin ekspresyon düzeyi MIC Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (MIC qPCR Cycler) kullanılarak analiz edildi. Reaksiyon sırasında çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı. Real Time PCR gerçekleştirirken primerlerin düzgün bağlandığından ayrıca hedef gen ile referans gen dışında başka bir ürünün çoğalmadığından emin olabilmek için PCR döngüsü sonuna “Erime Eğrisi Analizi (Melting Curve Analysis)” eklendi. Hastaların lenfosit hücrelerinden ve dokularından elde edilen RNA örneklerine önce ters transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA) yapıldı. Daha sonra örnekler hedef ve referans genlere ait primerler ile yapılan Real Time PCR işlemine tabi tutuldu. Hasta örnekleri ile sağlıklı kontrol grubu arasında var olan gen ifade değişiklikleri değerlendirildi. Ekspresyon için cDNA ve Real Time PCR reaksiyon karışımı, koşulları ve primer çiftleri Tablo 3-3, 3-4, 3-5, 3-6 ve 3-7’ de verilmiştir.

**Tablo 3-3:** cDNA reaksiyon karışımı

Ürün Adı	Hacmi
5xTransfer Buffer	4 µL
Reverse Transkriptaz enzimi	1 µL
DNase-RNase ( nükleaz) free water	X µL
RNA örneği	X µL
<b>TOPLAM</b>	20 µL

**Tablo 3-4:** cDNA için sıcaklık koşulları

➤ 25 °C’ de 10 dk.
➤ 42 °C’ de 15 dk.
➤ 85 °C’ de 5 dk.
➤ +4 °C’ de ∞

**Tablo 3-5:** Real Time PCR reaksiyon karışımı

Ürün Adı	Hacmi
2x SYBR Green	10 µL
Forward primer (10µM)	0,8 µL
Reverse primer (10µM)	0,8 µL
cDNA	3 µL
DNaz- RNaz free water	5,4 µL
Toplam	20 µL

**Tablo 3-6:** WASF3 gen ekspresyonu için Real Time PCR koşulları

Döngü	Sıcaklık	Süre	Reaksiyon
1x	95°C	2 dakika	Polimerizasyon
40x	95°C	5 saniye	Denatürasyon
	60°C	20 saniye	Bağlanma/ Uzama

**Tablo 3-7:** qPCR da kullanılan Primer çiftleri

<b><i>β-AKTİN-Forward</i></b>	5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'
<b><i>β-AKTİN-Reverse</i></b>	5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'
<b>WASF3-Forward</b>	5'-TCTCACTACAGGATATCAACATGAAA-3'
<b>WASF3-Reverse</b>	5'-ATGGTGTCAGGATGTTTCAGAG-3'

### 3.2.9. miR-218-5p gen ekspresyonu için cDNA Sentezi ve Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real Time PCR ekspresyon reaksiyonu için ID3EAL cDNA Synthesis System [MIRXES] kiti kullanılarak miRNA spesifik Ters Transkriptaz enzimi ile RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm reaksiyon işlemi buz içerisinde gerçekleştirildi. cDNA reaksiyon bileşenleri Tablo 3-8' de belirtilen miktarlarda karıştırıldı. cDNA için BioRad PCR cihazı kullanıldı. Tablo 3-9'da sıcaklık koşulları belirtildi.

**Tablo 3-8:** miR-218-5p için cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Ürün Adı	Hacmi
RNA	X µL
ID3EAL RT Buffer 4X	5 µL
ID3EAL RT Primer I Plex miRNA-218-5p	1 µL
ID3EAL RT Primer I Plex RNU6-1	1 µL
ID3EAL Reverse Transcriptase	1 µL
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	20 µL'ye tamamlanır

**Tablo 3-9:** miR-218-5p için cDNA için sıcaklık koşulları

➤ 42°C'de 30 dakika
➤ 95°C'de 5 dakika
➤ +4 °C' de ∞

cDNA'lar -20°C'den çıkarılarak çözdürüldü ve sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Çözdürülen cDNA'lar, 1:10 oranında nükleaz free water ile sulandırıldı ve Tablo 3-10 da verilen miktarlarda karışım, son hacim 20 µL olacak şekilde MIC qPCR tüplerine aktarıldı. Her bir hasta için hem miR-218-5p hem de RNU6-1 primerleri için reaksiyon karışımı ayrı ayrı hazırlandı. miR-218-5p gen ekspresyonu için Real Time PCR koşulları Tablo 3-11' de verildi.

**Tablo 3-10:** miR-218-5p gen ekspresyonu için Real Time PCR reaksiyon karışımı

Ürün Adı	Hacmi
ID3EAL qPCR Master Mix SYBR Green (2x)	10 µL
ID3EAL qPCR assay primer (10x)	2 µL
cDNA (1:10 oranında sulandırılmış)	5 µL
DNase RNase free water	3 µL
TOPLAM	20 µL

**Tablo 3-11:** miR-218-5p gen ekspresyonu için Real Time PCR koşulları

Döngü	Sıcaklık	Süre	Reaksiyon
1x	95°C	10 dakika	Polimerizasyon
	40°C	5 dakika	
40x	95°C	10 saniye	Denatürasyon
	60°C	30 saniye	Bağlanma/ Uzama

Real-Time qPCR işlemi, MIC qPCR Cyclus cihazı kullanılarak yapıldı ve sonuçlar analiz edildi.

**Şekil 3-1 :** MICqPCR cihazı**Şekil 3-2:** MICqPCR tüpleri ve hazırlanması**Şekil 3-3:** MICqPCR tüpleri yerleştirilmesi

### 3.2.10. DNA'nın Bisülfıt Modifikasyonu

EZ DNA Gold Metilasyon [Zymo Research] kiti kullanılarak DNA örnekleri Bisülfıt işleme tabi tutuldu. Modifikasyondan sonra metile Sitozin'ler Urasil bazına dönüşürken, metile olmayan Sitozin'ler değişmeden aynı şekilde kaldı. Nanodrop ile saflığı ve absorbansı ölçülen DNA örneklerinin 500 nanogramına protokole göre bisülfıt modifikasyonu uygulandı.

*20 µL'den büyük DNA hacimleri için, CT Dönüştürme Reaktifı hazırlanırken bir ayarlama yapılması gerekir.
DNA numune hacmindeki her 10 µL artış için su miktarı 100 µL azaltılır. Örneğin, 40 µL DNA örneği için, CT Dönüştürme Reaktifini yapmak için 700 µL su eklenir.
<b>Not:</b> Numuneye eklenen CT Dönüştürme Reaktifı hacmi de numune arttıkça aynı hacim kadar azaltılmalıdır, toplam reaksiyon hacmi 150 µL kalır. Her dönüşüm reaksiyonu için kullanılacak maksimum DNA numunesi hacmi 50 µL'dir. M-Çözünürlük Tamponu veya M-Dilution Buffer'ın hacimlerini ayarlamayın.
1. Her bir 500 nanogram DNA örneğine (20 µL); 130 µL CT Değişirme bufferı konuldu. DNA hacminin 20 µL'den az olduğu anlarda aradaki fark distile su ile tamamlandı.
2. Hazırlanan tüpler Termal Cyclus Döngü cihazında aşağıdaki mevcut koşullarda inkübe edildi.
➤ 98°C'de 10 dk.
➤ 64°C'de 2 saat 30 dk.
➤ 4°C'de 20 saate kadar saklama
3. İnkübasyondan sonra, karışıma bağlanma solüsyonu (600 µL) ilave edildi ve kolona yüklendi.
4. Maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapıldı. Alt faz atıldı.
5. Kolona yıkama solüsyonu (100 µL) eklendi ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapıldı.
6. Kolon üzerine desulfonasyon solüsyonu (200 µL) eklendi ve 25-30 °C arasındaki oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra örnekler eppendorf santrifüjde maksimum hızda 30 saniye santrifüj yapıldı.
7. Kolona yıkama solüsyonu (200 µL) eklendi ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi. Tekrar yıkama solüsyonu (200 µL) eklendi ve 30 saniye santrifüj edildi.

8. Kolon temiz 1.5 mL'lik ependorf tüpe yerleştirildi. 10 µL elüsyon buffer direkt olarak kolona konuldu. 30 saniye, maksimum hızda santrifüjlendi ve modifiye olmuş DNA - 20°C'de PCR yapılana kadar saklandı.

### 3.2.11. Metilasyon Spesifik PCR

CpG adacıklarındaki metilasyonun saptanması için Herman ve arkadaşları tarafından geliştirilen, hızlı ve hassas bir yöntemdir [125]. Bu metotta bisülfidit reaksiyonunun ardından DNA'nın metile ve unmetile bölgeleri metilasyon spesifik olan ve olmayan primerler ile amplifiye edildi. MSP'de her bir örnek için metile (M) ve unmetile (U) spesifik iki primer çifti kullanıldı. Metile ve unmetile pozitif ve negatif örneklerde PCR da kullanıldı. Reaksiyon karışımı ve PCR koşulları Tablo 3-12, 3-13 ve 3-14'te verilmiştir.

**Tablo 3-12:** Metilasyon spesifik PCR reaksiyon karışımı

Ürün Adı	Hacmi
Zymo Taq Premix	25 µL
Forward Primer (10µM)	3 µL
Reverse Primer (10µM)	3 µL
DNA	2 µL
DNase RNase free water	17 µL

**Tablo 3-13:** MSP-PCR koşulları

Döngü	Sıcaklık	Süre
1x	95°C	10 dakika
41x	95°C	30 saniye
	55°C	40 saniye
	72°C	45 saniye
1x	72°C	7 dakika
	+4 °C	∞

**Tablo 3-14:** Metilasyon Spesifik PCR için primerler

WASF3-Forward- Metile	5'-GGAGGATTAAGGGTGAGAGTTATC-3'
WASF3- Revers- Metile	5'-CGCTTCACCAAATAACGA-3'
WASF3- Forward- Unmetile	5'-GAGGATTAAGGGTGAGAGTTATTGT -3'
WASF3- Revers- Unmetile	5'-AACCACTTCACCAAATAACAAA -3'

### 3.2.12. Agaroz Jelin Hazırlanması

Çoğaltılan Metile ve Unmetile PCR çiftleri %2'lik agaroz jel de 1XTBE tamponda 45 dakika elektroforez edilmek suretiyle incelendi. Metile reaksiyon ve unmetile reaksiyonlara ait PCR amplikonuna ait bantlar değerlendirilerek örneklerin metile ve unmetile olup olmadıkları belirlendi. %2'lik agaroz jel aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

- 2 gram agaroz 100 mL 1X TBE tampon solüsyonu içine eklendi.
- Hazırlanan karışım mikrodalga fırında sıcaklık ve zaman ayarı yapılarak uygun aralıklarla karıştırılarak kaynatıldı.
- Homojen görünüme gelen karışım, sıcaklık biraz soğuyunca, yaklaşık 60°C sıcaklığa geldiğinde konsantrasyonu 10 mg/mL olan EtBr (Etidyum bromür) çözeltisinden 5 µL ilave edilerek jel yapıldı.
- Jel, yirmi dişli tarak yerleştirilmiş jel tabağına döküldü.
- Jel soğuyarak polimerize oldu.
- Jel kullanılacağı zamana kadar ya TBE solüsyonu içinde ya da stretch filme sarılarak +4°C de saklandı.

### 3.2.13. Agaroz Jelde Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

PCR'ı yapılan 4 µL DNA, 1 µL 5X Loading dye boyası ile karıştırıldı. Agaroz jel üzerinde bulunan kuyucuklara yüklendi. 100 volt akımda 45 dakika yürütüldü ve UV (ultraviyole) ışık altında incelendi. Bisülfid işlemi yapılan Human Methylated & Non-methylated DNA Set [ZYMO RESEARCH] içerisindeki bildiğimiz metil ve unmetil kontrol gruplarına göre karşılaştırma yapıldı.

### 3.2.14. $\Delta Ct$ , $\Delta\Delta Ct$ ve $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Değerlerinin Hesaplanması

Real Time PCR' da, bir floresan sinyalinin birikmesiyle pozitif bir reaksiyon tespit edilir. Ct (cycle threshold) ismi verilen döngü eşiği, sistemin floresan miktarındaki çoğalmayı farketmeye başladığı, PCR ürününün logaritmik ve lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır. Ct seviyeleri numunedeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır.

Ct miktarı ne kadar düşükse numunedeki hedef nükleik asit miktarı o kadar fazladır. Real time PCR da deneyler, 40 döngü amplifikasyonuna tabi tutulur.

Ct <29: numunede bol miktarda hedef nükleik asidin göstergesi olan güçlü pozitif reaksiyonlar vardır.

30-37'lik Ct'ler: orta miktarda hedef nükleik asidin göstergesi olan pozitif reaksiyonlardır.

38-40'lık Ct'ler: kontaminasyonu temsil edebilen minimum miktarda hedef nükleik asidin göstergesi olan zayıf reaksiyonlardır.

Real Time PCR da bir primer seti için tüm PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir. Kontaminasyon, özgün olmayan ürünler ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler. Real Time PCR ile ürünleri agaroz jele ihtiyaç duymadan erime sıcaklığı (melting curve) grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür. Primerlerin bağlanıp bağlanmadığını anlamak için gen dışında başka ürünün çoğalmadığından emin olmak için melting curve analizi kullanılır.

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  gen ifadelerini hesaplamak için kullanılır.

$$\Delta Ct = Ct(\text{Hedef gen}) - Ct(\text{Referans gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Hasta}) - \Delta Ct(\text{Sağlıklı Kontrol})_{\text{Ortalama}}$$

$$2^{-(\Delta\Delta Ct)} = 2^{-[\Delta Ct(\text{Hasta}) - \Delta Ct(\text{Sağlıklı Kontrol})_{\text{Ortalama}}]}$$

### 3.2.15. İstatistiksel Analiz

SPSS v21.0 programında sarkomlu hasta ve sağlıklı gruba ait gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldı. Gruplar arasındaki dağılımın normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirildi. Test Sonuçları  $p < 0,05$  olduğu için gruplar arasında normal dağılım olmadığı belirlendi. Ayrıca örneklem sayısı 30'un altında olduğundan verilerin incelenmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca aday biyobelirteç olarak belirlenen miRNA'nın tanısal gücünü ortaya çıkarmak amacı ile ROC (Receiver Operator Characteristics Curve) analizi yapıldı.

Mann-Whitney U testi, hasta ve kontrol gruplarının  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri baz alınarak yapıldı. Yapılan Mann-Whitney U testine göre miR-218-5p'nin ifade düzeyinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). Yapılan Mann-Whitney U testine göre WASF3'ün ifade düzeyinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ).

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada 2019-2021 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Çocuk Onkoloji Polikliniğine başvuran 25 sarkomlu hasta (Ewing sarkom, Osteosarkom, İğsi hücreli sarkom, Sinoviyal sarkom) grubu ile yaş, etnik köken ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 22 sağlıklı çocuğun periferik kan örneklerinden elde edilen lenfositler kullanıldı. Ayrıca 4 hastanın tümör dokusu çalışıldı. Bu hastalardan da 2 hastanın yakın dokusu çalışıldı. Bir hastanın da tedavi öncesi, operasyon esnasındaki periferik kan ve tümör dokusu ve tedavi sonrası 3 ay aralıklarla iki periferik kan örnekleri tez ile ilgili gelecek çalışmalara yol göstermesi adına çalışmaya dahil edildi.

Hastaların yaş ortalaması  $13,5 \pm 6,3$  (5-38); sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ise  $10,5 \pm 3,6$  (4-18) olarak hesaplanmıştır. Gerek sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda gerekse sarkomlu hasta grubunda yaş ortalamaları arasında istatistiksel bir fark bulunmamakta, gruplar yaş açısından benzer dağılmaktadır.

### 4.1. WASF3 Gen İfadesi İçin Bulgular

NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC] cihazı ile yapılan spektrofotometre ölçüm sonuçlarına ait örneklerin ölçüm değerleri Tablo 4-1’de verilmiştir.

**Tablo 4-1** : Bazı Örneklere Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri

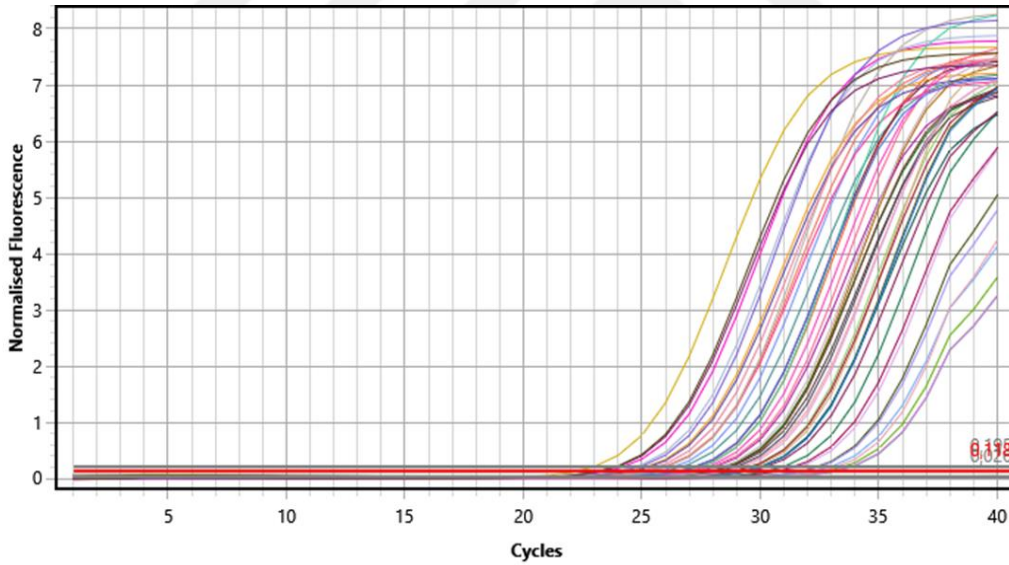
Örnekler	Nükleik asit Konsantrasyonu	Birim	A260/A280	A260/A230	Numune
EW002	110,9	ng/μL	2,00	2,15	RNA
EW024	93,0	ng/μL	1,97	2,17	DNA
EW017-TÜMÖR	152,2	ng/μL	1,85	2,05	RNA
EW044	46,5	ng/μL	1,83	1,80	RNA
EW044	87,9	ng/μL	1,94	1,88	DNA
ÇK009	74,6	ng/μL	2,15	1,87	RNA

#### 4.1.1. qPCR ile Çoğaltılan Örneklerin Çoğalma Eğrileri ve Erime Eğrisi Analizleri

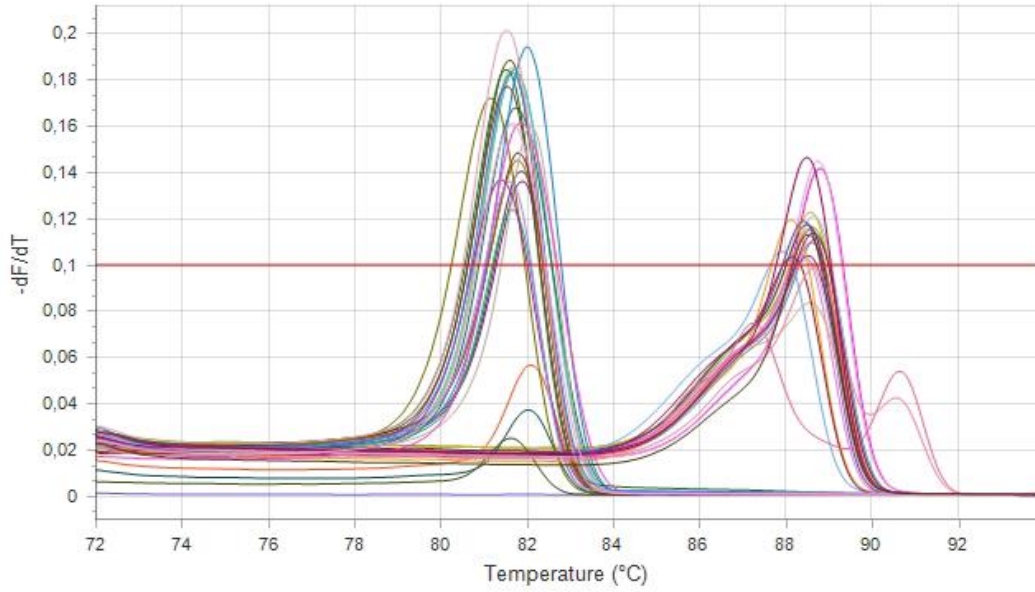
Real-Time PCR’da çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı. SYBR Green yapısı gereği çoğaltılan dizinin istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için, hedef gen ile referans gen haricinde başka bir ürünün çoğalıp çoğalmadığını görmek ve primer dimerlerini belirleyebilmek için PCR döngüsü sonuna “erime

eğrisi analizi” (melting curve analysis) eklendi. Real Time PCR işlemi ile her bir gen ekspresyonunu belirlemek için çoğaltılan örneklerin erime eğrisi analizleri verilmekte ve buna göre ilgili gen bölgelerinin doğru bir şekilde çoğaltıldığı gösterilmektedir. Erime eğrisi analizinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. DNA iplikleri birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature=  $T_m$ ) floresan boya serbest kalır ve bunun sonunda da okunan floresan boya miktarı azalmaya başlar. Her bir DNA'nın kendine özgü belirli bir erime sıcaklığı ( $T_m$ ) vardır. Bu  $T_m$  değeri DNA fragmentinin uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Primer dimeri oluşmuşsa bunların DNA parçasının  $T_m$  derecesi farklı olacaktır.  $T_m$  derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü gen dizisi içermesindedir. Bundan dolayı  $T_m$  sıcaklığı her ürün için spesifiktir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

*WASF3* gen ifadesi için MIC-qPCR'a yüklenen hasta ve kontrol örneklerinin oluşturduğu Real Time PCR eğrileri ve erime eğrileri Şekil 4-1 ve Şekil 4-2' de verildi. Her bir örneğin ekspresyon seviyeleri CT (Threshold Cycle = Eşik döngüsü) değerindeki farklılıklara göre değerlendirildi.



**Şekil 4-1:** Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde *B-Aktin* housekeeping gen eşliğinde incelenen *WASF3* geninin RT-PCR eğrileri



**Şekil 4-2 :** Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde *B-Aktin* housekeeping gen eşliğinde incelenen *WASF3* geninin erime eğrisi analizi

#### 4.1.2. *WASF3* Gen İfadesinin Değerlendirilmesi

Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu kullanıldı. Bu metoda göre sonuçlar PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış olan CT değerlerine göre belirlendi. Ct (cycle threshold) ismi verilen döngü eşiği, sistemin floresan miktarındaki artışı fark etmeye başladığı ve PCR ürününün logaritmik ve lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır. Ct seviyeleri numunedeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır. *WASF3*' e ait periferik kandaki ekspresyon hesaplamaları Tablo 4-2' de verilmiştir.

**Tablo 4-2:** Periferik kandaki *WASF3* gen ifade düzeyleri

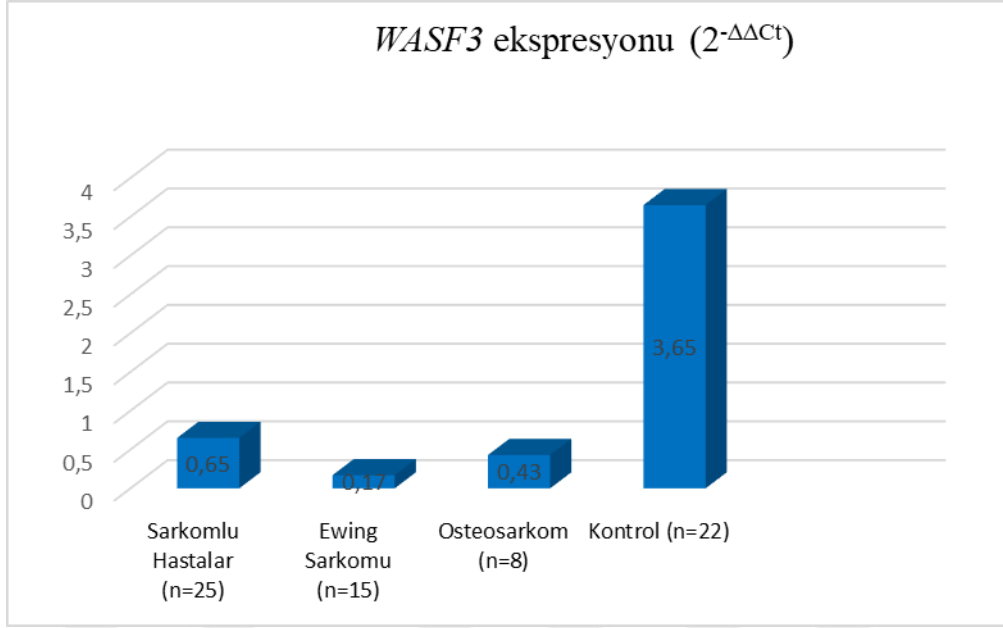
Sıra No	Örnekler	<i>WASF3</i> $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	EW001	0,0752
2	EW002 A	1,1823
3	EW004	0,1074
4	EW006	0,4735
5	EW007	0,4097
6	EW008	0,1504
7	EW009	10,7062
8	EW011	0,0788
9	EW013	0,0934
10	EW014	0,0017
11	EW015	0,8673
12	EW018	0,0164
13	EW021	0,0004
14	EW024	0,0595

15	EW025	0,0839
16	EW027	0,0982
17	EW029	0,0054
18	R1900/FN218	0,0744
19	EW030	0,0048
20	EW032	0,0027
21	EW035	0,2439
22	EW036	0,1751
23	EW037	1,7146
24	EW039	0,0070
25	EW041	0,2657

**Tablo 4-3:** Tümör ve tümöre yakın normal dokulardaki *WASF3* ekspresyon düzeyleri

Hasta Kodu	Primer Tümör Tanısı (Kemik metastazı)	Doku Tipi	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri- Kat olarak
EW002	Osteosarkom	Tümör doku	146,96
EW010	Osteosarkom	Tümör doku	11,42
EW016	Sinoviyal sarkom	Tümör doku	397,06
EW016-y	Sinoviyal sarkom	Tümör çevresine yakın normal doku	1,25
EW017	Retinoblastoma (Kemik metastazlı)	Kemiğe metastaz yapmış tümör doku	914,92
EW017-y	Retinoblastoma (Kemik metastazı)	Kemiğe metastaz yapmış tümör çevresine yakın normal doku	0,93

Microsoft excel programı kullanılarak yapılan hesaplamalar doğrultusunda sarkomlu hastaların periferik kanlarında, sağlıklı gruba göre ifade düzeylerindeki ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) artış veya azalışı belirten grafikler Şekil 4-3'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre hastalar, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *WASF3*'ün  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,6$  kat azaldığı saptanmıştır. Ewing sarkomlu 15 çocukta *WASF3*  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,17$  bulunurken, osteosarkomlu 8 çocukta *WASF3*  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,43$  olarak bulundu. Ewing sarkomlu ve osteosarkomlu toplam 23 çocuk varken; toplam sarkomlu hastaya iğsi hücreli sarkom ve 38 yaş osteosarkomlu baba da eklenmiştir.



**Şekil 4-3:** Periferik kanda sarkomlu hastalara ve sağlıklı kontrollere ait *WASF3* ifade düzeyi (Sarkom (n=25) olanın içinde 1 iğsi hücreli sarkom ve 1 de 38 yaş osteosarkom baba hasta var Ewing sarkom (n=15) ve Osteosarkom (n=8) sadece çocuk)

Gruplar arasındaki dağılımın normallik varsayımı SPSS v21.0 programında Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile belirlendi. Test sonuçları  $p < 0,05$  olduğu için gruplar arasında normal dağılım olmadığı belirlendi. Ayrıca örneklem sayısı 30'un altında olduğundan verilerin incelenmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Mann-Whitney U testi, sarkomlu hasta ve kontrol gruplarının  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri baz alınarak yapıldı. Yapılan Mann-Whitney U testine göre *WASF3*'ün ifade düzeyinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). *WASF3* için elde edilen p değeri  $p = 0,004$  (Tablo 4-4) olarak hesaplandı.

**Tablo 4-4:** Hasta ve kontrol grupları arasında tedavi öncesi *WASF3* gen ifade düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi

	Tedavi öncesi <i>WASF3</i> gen ifade düzeyi
Mann-Whitney U	176,000
Wilcoxon W	527,000
Z	-2,890
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,004

Hastaların klinik özellikleri ile *WASF3* gen ifade düzeyinin karşılaştırılması Tablo 4-5'te verilmiştir.

**Tablo 4-5:** Hastaların Klinik Özelliklerinin Tedavi Öncesi *WASF3* gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Özellikler	WASF3 Ekspresyonu			p değeri
	Azalma n (%)	Artma n (%)	Toplam n(%)	
<b>Yaş Ortalama 13,5 ± 6,3 (5-38)</b>				<b>0,718</b>
<20	21	3	24 (%96)	
≥ 20	1	0	1 (%4)	
<b>Toplam n(%)</b>	22 (%88)	3(%12)	25(%100)	
<b>Cinsiyet</b>				<b>0,106</b>
<b>Kadın</b>	5	2	7 (%28)	
<b>Erkek</b>	17	1	18 (%72)	
<b>Toplam n (%)</b>	22 (%88)	3(%12)	25 (%100)	
<b>Tümör çapı</b>				<b>0,642</b>
<8cm	11	1	12 (%48)	
≥8cm	11	2	13 (%52)	
<b>Toplam n (%)</b>	22 (%88)	3(%12)	25(%100)	
<b>Metastaz</b>				<b>0,514</b>
<b>Yok</b>	19	3	22 (%88)	
<b>Var</b>	3	0	3 (%12)	
<b>Toplam n (%)</b>	22 (%88 )	3(%12)	25(%100)	
<b>Tümör tutulum bölgesi</b>				<b>0,965</b>
<b>Cranium</b>	2	1	3 (%12)	
<b>Trunk</b>	7	0	7 (%28)	
<b>Üst ekstremité</b>	1	0	1 (%4)	
<b>Alt ekstremité</b>	12	2	14 (%56)	
<b>Toplam n(%)</b>	22 (%88 )	3(%12)	25(%100)	

Yapılan çalışmada hastaların medyan yaşı  $13,5 \pm 6,3$  (5-38) şeklindedir. Hastaların 24'ü 20 yaş altında tanı almışken sadece 1 tanesi 20 yaş üzerinde tanı almıştır. Hastaların tanı yaşı ile *WASF3*'ün ifade düzeyi arasında istatistiksel açıdan bir fark saptanmamıştır (p:0,718).

Hastaların 17'i erkek 7'si ise kadın hastalardan oluşmaktadır. Hastaların cinsiyet dağılımı ile *WASF3*'ün ifade düzeyi arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktur (p:0,106).

Hastaların tümör çapı ortalaması 8,2 cm olarak hesaplandı. En küçük tümör 0,3 en büyüğü ise 19 cm boyutundaydı. Tümör çaplarına göre *WASF3*'ün ifade düzeyini karşılaştırdığımızda istatistiksel bir fark saptanmadı (p:0,642).

Hastaların 3'ünde metastaz bulunurken 22'ünde metastatik bir tutulum saptanmamıştır. *WASF3* ekspresyon durumunu hastaların metastaz durumuna göre değerlendirdiğimizde istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p:0,514).

Hastaların tümör tutulum bölgelerini incelediğimizde; 3'ünün cranium, 7'sinin trunk, 1'inin upper ekstremité, 14'ünün ise lower ekstremité bölgelerinde olduğu görülmüştür. *WASF3* ekspresyon durumunu hastaların tümör tutulum bölgelerine göre değerlendirdiğimizde istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p:0,965). Hastaların tümör tutulum bölgesinin *WASF3* ifade düzeyine göre dağılımı Tablo 4-6'da gösterilmiştir.

**Tablo 4-6:** Sarkomlu hastalarda tümör lokasyonuna göre *WASF3* ekspresyon seviyesi

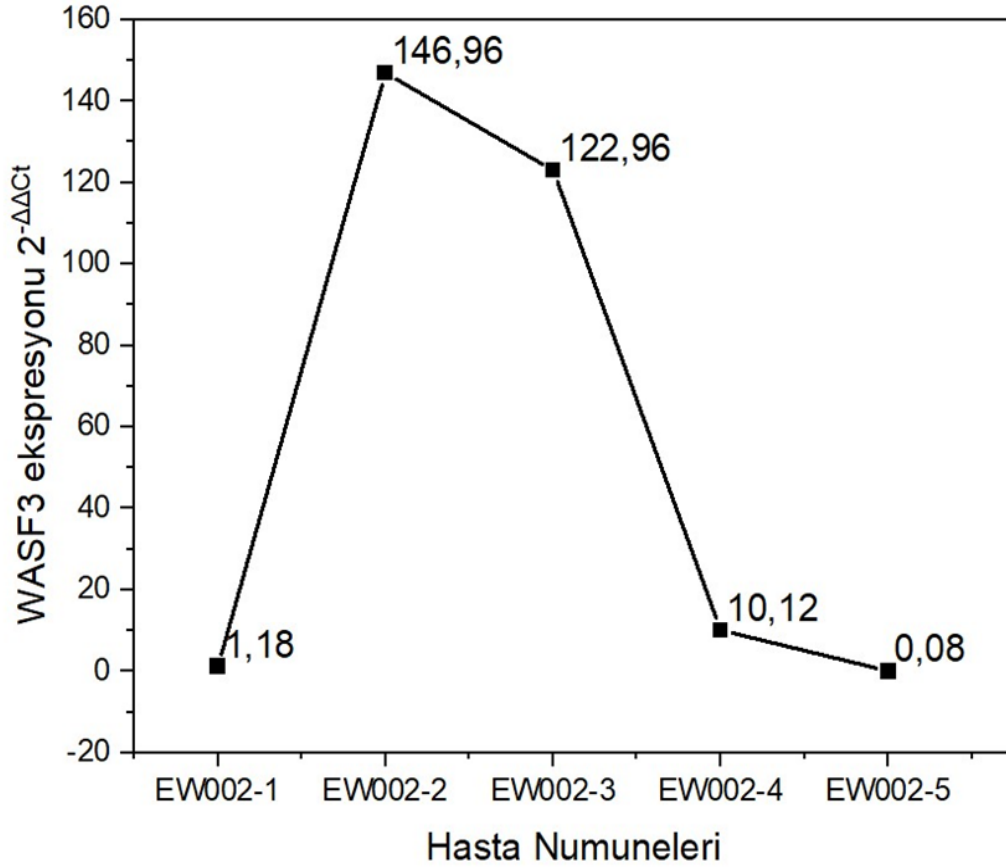
Tümör Lokasyonu	WASF3 Ekspresyonu		Toplam	p değeri
	Azalmış n(%)	Artmış n(%)	Total n (%)	
Cranium	2	1	3(%12)	0,965
Trunk	7	0	7(%28)	
Üst ekstremité	1	0	1(%4)	
Alt ekstremité	12	2	14(%56)	
<b>Toplam n (%)</b>	22(%88)	3(%12)	25(%100)	

Aile bireylerindeki kanser öykülerini değerlendirdiğimizde 25 hastanın 12'sinin ailesinde 1. veya 2. derece aile bireylerinde kanser hikayesi olduğu görülmüştür. WASF3 ekspresyon durumunu hastaların ailelerine ait kanser öykülerine göre değerlendirdiğimizde istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p:0,051). Ailedeki kanser öyküsünün WASF3 ifade düzeyine göre dağılımı Tablo 4-7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-7:** Ailedeki kanser öyküsünün WASF3 ifade düzeyine göre dağılımı

Aile öyküsü	WASF3 Ekspresyonu		Toplam	P değeri
	Azalmış n(%)	Artmış n(%)	Toplam n (%)	
<b>1. veya 2. derece aile bireyinde kanser öyküsü</b>				<b>0,051</b>
<b>var</b>	9	3	12(%48)	
<b>yok</b>	13	0	13(%52)	
<b>Toplam n (%)</b>	22(%88)	3(%12)	25(%100)	

Osteosarkomlu 16 yaşındaki hastanın tedavi öncesi WASF3 gen ifade düzeyi 1,18 iken, operasyon esnasında alınan tümör dokusu ve kan değerleri de oldukça yüksek çıkmıştır. Aynı hastanın tedavi sonrası sonuçlarında ise gen ifade düzeyinin 0,08'lere kadar düştüğü görülmektedir. Osteosarkomlu hastanın tedavi öncesi, operasyon anı ve tedavi sonrası kan örneklerinin ve operasyon esnasındaki tümör dokusundaki WASF3 ekspresyon değerleri Şekil 4.4' de gösterilmiştir.



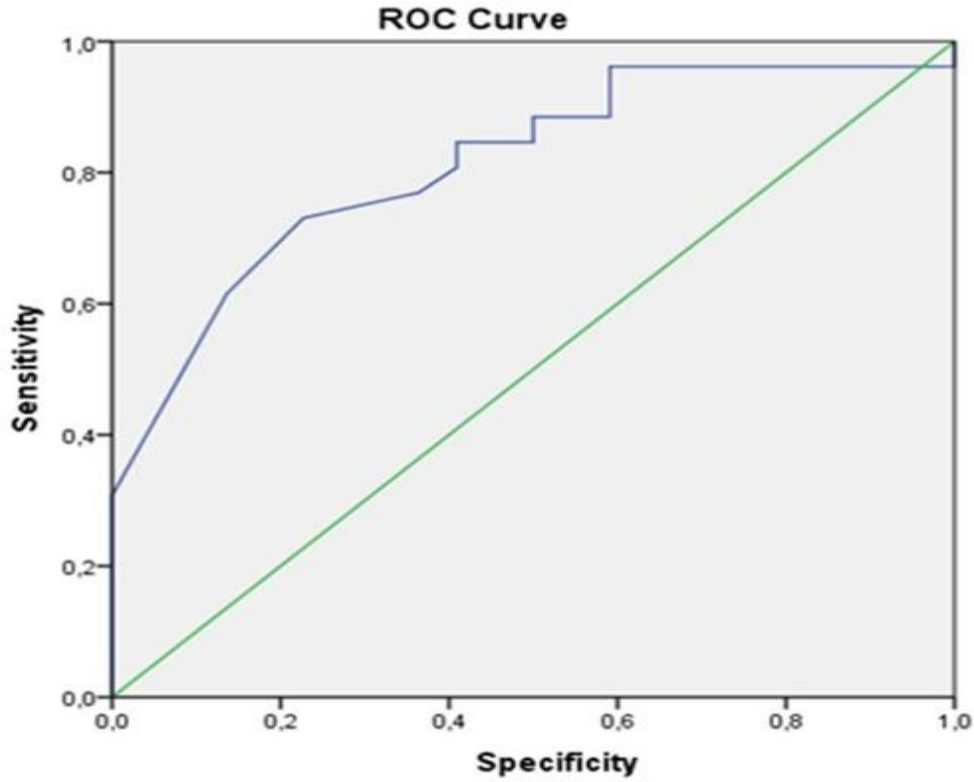
**Şekil 4-4:** Osteosarkomlu hastanın periferik kan ve tümör doku örneklerinde *WASF3* gen ekspresyon değerleri: **EW002\_1:** Tanı sırasında alınan periferik kan; **EW002\_2:** Operasyon sırasında alınan tümör doku; **EW002\_3:** Operasyon sırasında alınan periferik kan; **EW002\_4:** 1.kür kemoterapi sonrasında alınan periferik kan; **EW002\_5:** 4.kür kemoterapi sonrasında alınan periferik kan (1.Seçim kemoterapi sonrası)

#### 4.1.3. *WASF3* için ROC Analizi

Sarkom tanıli hasta ve sağlıklı kontrol grubunu ayırt edebilme gücünü gösterebilmek amacı ile diğer bir deyişle incelediğimiz *WASF3* moleküllerinin aday biyobelirteç olarak tanısal performansını göstermek için Receiver Operator Characteristics (ROC) analizi yapıldı (Şekil 4-5). ROC eğrisi altında kalan alan (ROC-AUC) 0,5 ile karşılaştırıldığında 1'e ne kadar yakınsa tanısal gücünün o kadar kuvvetli olduğu bilinmektedir. Tablo 4.8'de verilen *WASF3* için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları yer almaktadır ve bu sonuçlara göre sarkom hastalarının tanısında *WASF3* moleküllerinin tanısal gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p=0,000$ ).

**Tablo 4-8:** WASF3 için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı)

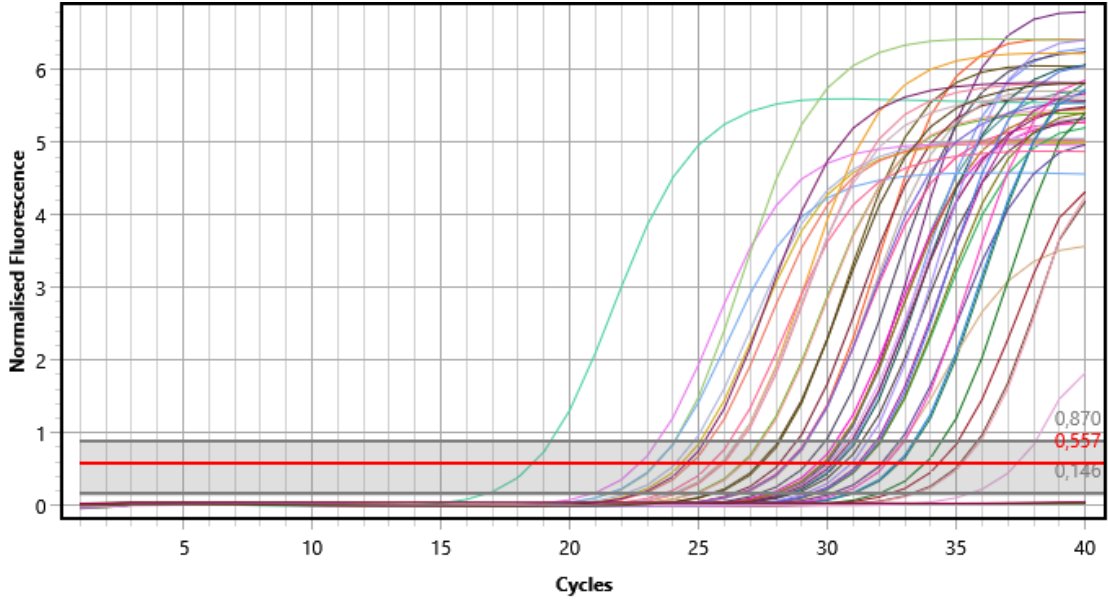
Gen	ROC-AUC	95% CI	p değeri
WASF3	0,813	0,692 - 0,934	0,000

**Şekil 4-5:** Sarkomlu hasta ve sağlıklı gruplar için WASF3 dağılımının ROC-AUC değerleri

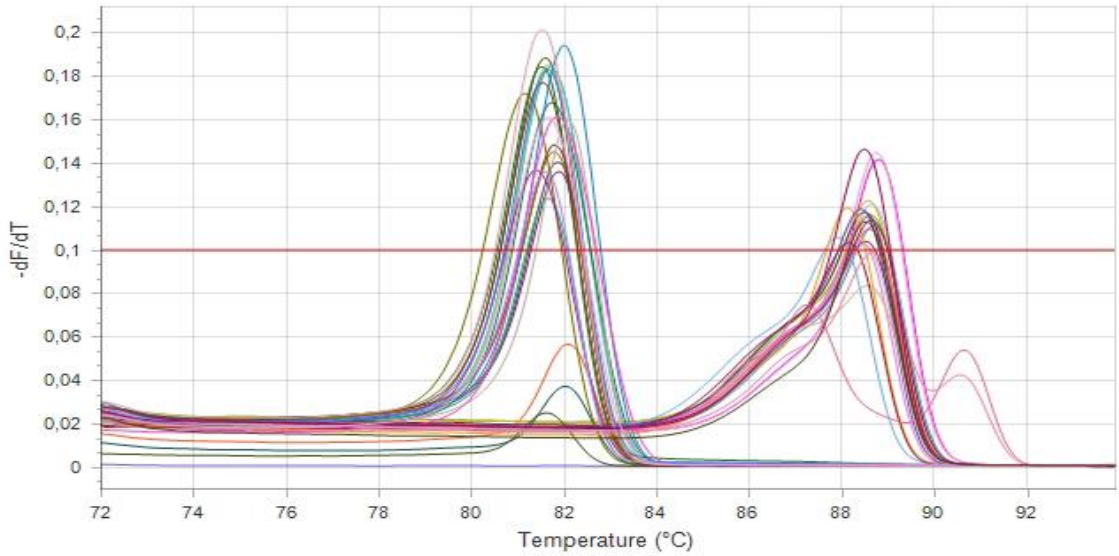
## 4.2. miR-218-5p İfadesi İçin Bulgular

### 4.2.1. qPCR ile Çoğaltılan miR218-5 Molekülünün Analizi

miR-218-5p ifadesi için Mic qPCR'a yüklenen hasta ve kontrol örneklerinin oluşturduğu Real Time PCR eğrileri (Şekil 4-6), (Şekil 4-7) verildi. Her bir örneğin ekspresyon seviyeleri CT (Threshold Cycle = Eşik döngüsü) değerindeki farklılıklara göre hesaplandı.



**Şekil 4-6:** Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde *RNU6-1* housekeeping gen eşliğinde incelenen miR-218-5p geninin RT-PCR eğrileri



**Şekil 4-7:** Kontrol grubuna ve sarkomlu hastalara ait periferik kan örneklerinde *RNU6-1* housekeeping gen eşliğinde incelenen miR-218-5p'nin erime eğrisi analizi

#### 4.2.2. miR-218-5p ifadesinin Değerlendirilmesi

Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde *WASF3* gen ifadesinin hesaplamasındaki gibi  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodundan faydalanıldı. Bu yöntemle göre sonuçlar PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış olan CT değerlerine göre belirlendi. Periferik kandaki ve tümör dokusundaki miR-218-5p ye ait gen ifade düzeyleri Tablo 4-9' da verilmiştir.

**Tablo 4-9:** Periferik kan örneklerine ait miR218-5p gen ifade düzeyi

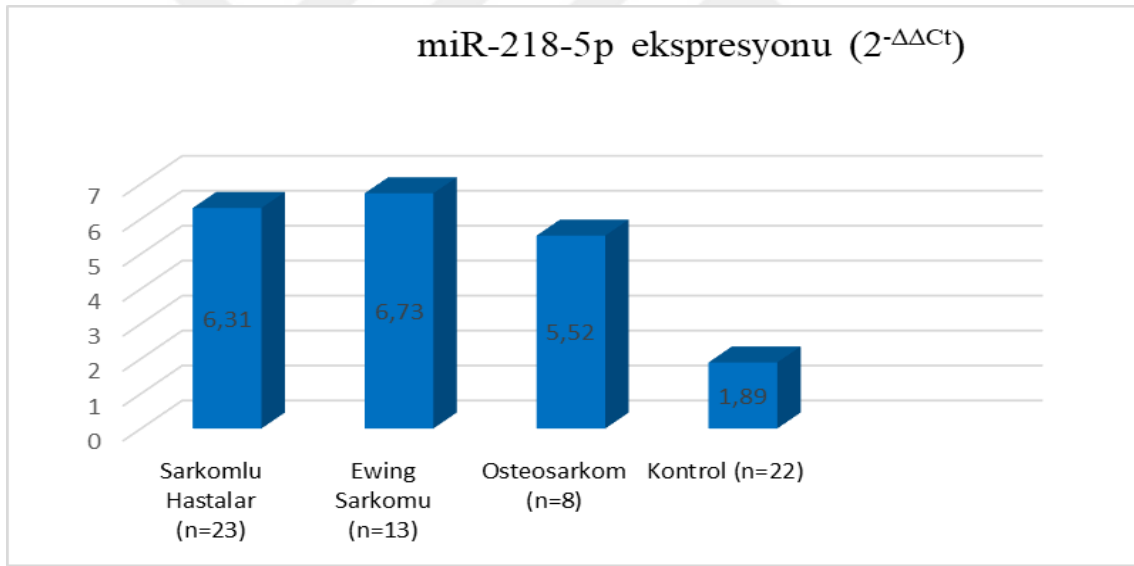
Sıra No	Örnekler	miR-218-5p $2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	EW001	-
2	EW002 A	8,4432
3	EW004	7,2476
4	EW006	3,2442
5	EW007	0,7651
6	EW008	1,7903
7	EW009	2,2409
8	EW011	1,0571
9	EW013	22,6187
10	EW014	6,7150
11	EW015	2,3512
12	EW018	13,5448
13	EW021	16,2944
14	EW024	16,3582
15	EW025	-
16	EW027	1,9685
17	EW029	2,0097
18	R1900/FN218	8,9624
19	EW030	1,4146
20	EW032	3,3581
21	EW035	3,3174
22	EW036	0,8170
23	EW037	0,3722
24	EW039	1,5207
25	EW041	9,1017

**Tablo 4-10:** Tümör ve tümöre yakın normal dokulardaki miR-218-5p ekspresyon düzeyleri

Hasta Kodu	Primer Tümör Tanısı (Kemik metastazı)	Doku Tipi	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri- Kat olarak
EW002	Osteosarkom	Tümör doku	8,2
EW016	Sinoviyal sarkom	Tümör doku	5982,1
EW016-y	Sinoviyal sarkom	Tümör çevresine yakın normal doku	660
EW017	Retinoblastoma (Kemik metastazlı)	Kemiğe metastaz yapmış tümör doku	13,2
EW017-y	Retinoblastoma (Kemik metastazı)	Kemiğe metastaz yapmış tümör çevresine yakın normal doku	0,9

Periferik kandaki miRNA ekspresyon farklılıkları  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü ile değerlendirildi. Bu formülde hedef gen ile referans genin  $\Delta Ct$  değerleri hasta ve kontrol grubu için ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra her bir hastaya ait  $\Delta Ct$  değerinden sağlıklı gruba ait ortalama  $\Delta Ct$  değeri belirlendi ve her bir hasta örneğine ait  $\Delta\Delta Ct$  değeri bulundu. Bu değer  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formüle göre *RNU6-1* gen ifadesi referans alınarak hasta grubuna ait miR-218-5p'nin ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre artış ve azalışları saptandı.

Sarkomlu hastaların, kontrol grubuna göre ifade düzeyindeki  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  artış veya azalışı gösteren grafikler Şekil 4-8'de verildi. Hasta verilerinin Fold & Change ( $|FC| \geq 2$ ) değeri göz önüne alındığında, gen ifade düzeylerinin 2 kattan fazla arttığı saptandı. Bu değerlere göre hastalardaki miR-218-5p gen ifade düzeyi sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 6,31$  kat arttığı saptandı. Ewing sarkomlu 13 çocukta miR-218-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 6,73$  bulunurken, osteosarkomlu 8 çocukta miR-218-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 5,52$  olarak bulundu. Ewing sarkomlu ve osteosarkomlu toplam 21 çocuk varken ; toplam sarkomlu hastaya işçi hücreli sarkom ve 38 yaş osteosarkomlu baba da eklenmiştir.



**Şekil 4-8: Periferik kanda sarkomlu hasta ve sağlıklı kontrol grubu için mir218-5p ifade düzeyi** (Sarkom (n=23) olanın içinde 1 işçi hücreli sarkom ve 1 de 38 yaş osteosarkom baba hasta var. Ewing sarkom (n=13) ve Osteosarkom (n=8) sadece çocuk)

Gruplar arasındaki dağılımın normallik varsayımı SPSS v21.0 programında Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile belirlendi. Test Sonuçları  $p < 0,05$  olduğu için gruplar arasında normal dağılım olmadığı belirlendi. Ayrıca örneklem sayısı 30'un altında olduğundan verilerin incelenmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Mann-Whitney U testi, hasta ve kontrol gruplarının  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri baz alınarak yapıldı. Yapılan Mann-Whitney U testine göre miR-218-5p'nın ifade düzeyinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). miR-218-5p için elde edilen p değeri  $p=0,006$  yani istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu (Tablo 4.11).

**Tablo 4-11:** Hasta ve kontrol grupları arasında tedavi öncesi miR-218-5p gen ifade düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi

	Tedavi ncesi miR-218-5p_ekspresyonu
Mann-Whitney U	165,000
Wilcoxon W	418,000
Z	-2,731
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,006

Sarkom tanılı hastalarda miR-218-5p ifade düzeyi ile hastaların tanı yaşları, cinsiyeti, tümör boyutu, metastaz durumu gibi değişkenler arasındaki ilişki ayrıca Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir ve sonuçlar Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-12:** Hastaların klinik özelliklerinin tedavi öncesi miR-218-5p gen ifade düzeyleri ile karşılaştırılması

Özellikler	miR-218-5p Ekspresyonu			p değeri
	Azalma n (%)	Artma n (%)	Toplam n(%)	
<b>Yaş Ortalama 12,5 ± 6,6 (5-38)</b>				<b>0,705</b>
<20	3	19	22 (%95,7)	
≥ 20	0	1	1 (%4,3)	
<b>Toplam n(%)</b>	3 (%13)	20 (%87)	23(%100)	
<b>Cinsiyet</b>				<b>0,245</b>
<b>Kadın</b>	0	7	7 (%30,5)	
<b>Erkek</b>	3	13	16 (%69,5)	
<b>Toplam n (%)</b>	3 (%13)	20 (%87)	23 (%100)	
<b>Tümör çapı</b>				<b>0,649</b>
<8cm	1	9	10 (%43,4)	
≥8cm	2	11	13 (%47,6)	
<b>Toplam n (%)</b>	3 (%13)	20 (%87)	23(%100)	
<b>Metastaz</b>				<b>0,493</b>
<b>Yok</b>	3	17	20 (%86,8)	
<b>Var</b>	0	3	3 (%13,2)	
<b>Toplam n (%)</b>	3 (%13)	20(%87)	23(%100)	
<b>Tümör Tutulum Bölgesi</b>				<b>0,694</b>
<b>Cranium</b>	0	3	3( %13,2)	
<b>Trunk</b>	1	4	5(%21,7)	
<b>Üst ekstremité</b>	0	1	1(%4,34)	
<b>Alt ekstremité</b>	2	12	14(%60,76)	
<b>Toplam n (%)</b>	3 (%13)	20(%87)	23(%100)	

Yapılan çalışmada hastaların medyan yaşı  $12,5 \pm 6,6$  (5-38) şeklindeydi. Hastaların 22'si 20 yaş altında tanı almışken sadece 1 tanesi 20 yaş üzerinde tanı almıştı. Hastaların 16'sı erkek 7'si ise kadın hastalardan oluşmaktaydı. Çalışmaya alınan hastaların tümör çapları 0,3cm-19cm arasında olup hastaların tümör çapı ortalaması 8,3 cm idi. Hastaların 3'ünde metastaz bulunurken 20'inde metastatik bir tutulum saptanmamıştı. Hastaların tümör tutulum bölgeleri değerlendirildiğinde; 3'ünün cranium, 5'inin trunk, 1'inin üst ekstremitte, 14'ünün ise alt ekstremitte bölgelerinde konumlandığı belirlendi. Hastaların klinik özellikleri ile tedavi öncesi miR-218-5p gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar Tablo 4-12'de verildi. Hastalara ait miR-218-5p'nin ifade düzeyi ile tanı yaşı (p:0,705), cinsiyet farkı (p:0,245), tümör çapı (p:0,649), metastatik durumları (p:0,493), tümör tutulum bölgeleri (p: 0,694) arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Hastaların tümör tutulum bölgesinin miR-218-5p ifade düzeyine göre dağılımı Tablo 4-13'de gösterilmiştir. Trunk ve alt ekstremitte bölgelerinde tümör bulunan hastaların çoğunda sırasıyla %80 ve %85,72 olmak üzere miR-218-5p ifade düzeyinde artış görülürken sırasıyla %20 ve %14,28'inde azalış olduğu saptandı. Diğer gruplarda hasta sayısı az olmakla beraber var olan tüm hastalarda miR-218-5p'nin ekspresyonunda artış olduğu görüldü.

**Tablo 4-13:** Sarkomlu hastalarda tümör bölgesine göre miR-218-5p ekspresyon seviyesi

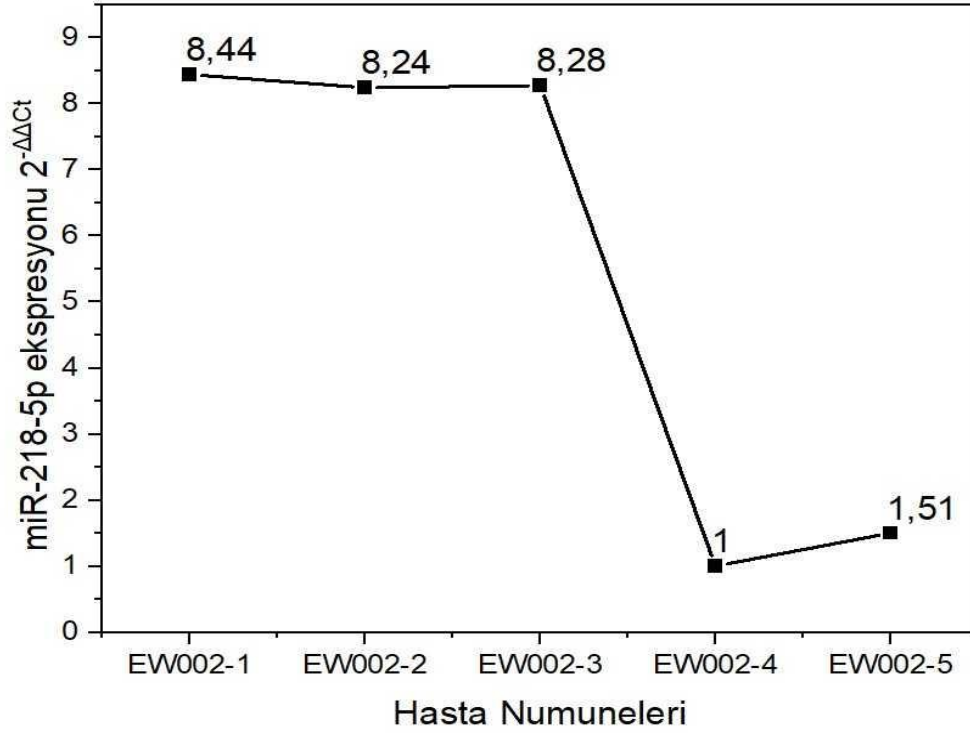
Tümör Lokasyonu	miR-218-5p Ekspresyonu		Toplam	p değeri
	Azalma n (%)	Artış n (%)	Toplam n (%)	
Cranium	0(%0)	3(%100)	3 (%13,2)	0,694
Trunk	1(%20)	4(%80)	5 (%21,7)	
Üst ekstremitte	0(%0)	1(%100)	1 (%4,34)	
Alt ekstremitte	2(%14,28)	12(%85,72)	14 (%60,76)	
Toplam n (%)	3(%12,5)	20(%87,5)	23(%100)	

Aile bireylerindeki kanser öykülerini değerlendirdiğimizde 23 hastanın 11'inin ailesinde 1. veya 2. derece aile bireylerinde kanser geçmişi olduğu görülmüştür. miR-218-5p ekspresyon durumunu hastaların ailelerine ait kanser öykülerine göre değerlendirdiğimizde istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p:0,449). Ailedeki kanser öyküsünün miR-218-5p ifade düzeyine göre dağılımı Tablo 4.14'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-14:** Ailedeki kanser öyküsünün miR-218-5p ifade düzeyine göre dağılımı

Aile öyküsü	miR-218-5p Ekspresyonu		Toplam	P değeri
	Azalmış n(%)	Artmış n(%)	Toplam n (%)	
<b>1. veya 2. derece aile bireyinde kanser öyküsü</b>				<b>0,449</b>
<b>Var</b>	2	9	11(%47,8)	
<b>Yok</b>	1	11	12(%52,08)	
<b>Toplam n (%)</b>	3(%13)	20(%87)	23(%100)	

Osteosarkomlu 16 yaşındaki bir hastanın tanı esnasında alınan ve hiç tedavi almamış durumdaki periferik kanındaki miR-218-5p gen ifade düzeyi 8,44 iken, cerrahi operasyon esnasında alınan tümör dokusu ve periferik kan örneklerinde incelenilen miR-218-5p düzeylerinin de sırasıyla 8,24 ve 8,28 olmak üzere tanı anındaki değere oldukça yakın olduğu saptandı. Aynı hastanın cerrahi operasyonun ardından aldığı ilk kür kemoterapi sonrasında miR-218-5p ekspresyon düzeyinin 8 kat azalarak 1'e kadar düştüğü görüldü. Osteosarkomlu bu hastanın 4 kür kemoterapi tedavisi aldıktan sonra ilk kontrole geldiği andaki miR-218-5p ekspresyon düzeyi ise 1,5 olarak ölçüldü. Osteosarkomlu hastanın tedavi öncesi, cerrahi operasyon anı ile 1. ve 4. kür kemoterapi sonrası kan örneklerine ait miR-218-5p ekspresyon düzeyine ilişkin değişimler Şekil 4-9'teki grafikte verildi.



**Şekil 4-9: Osteosarkomlu hastanın periferik kan ve tümör doku örneklerinde miR-218-5p gen ekspresyon değerleri:**

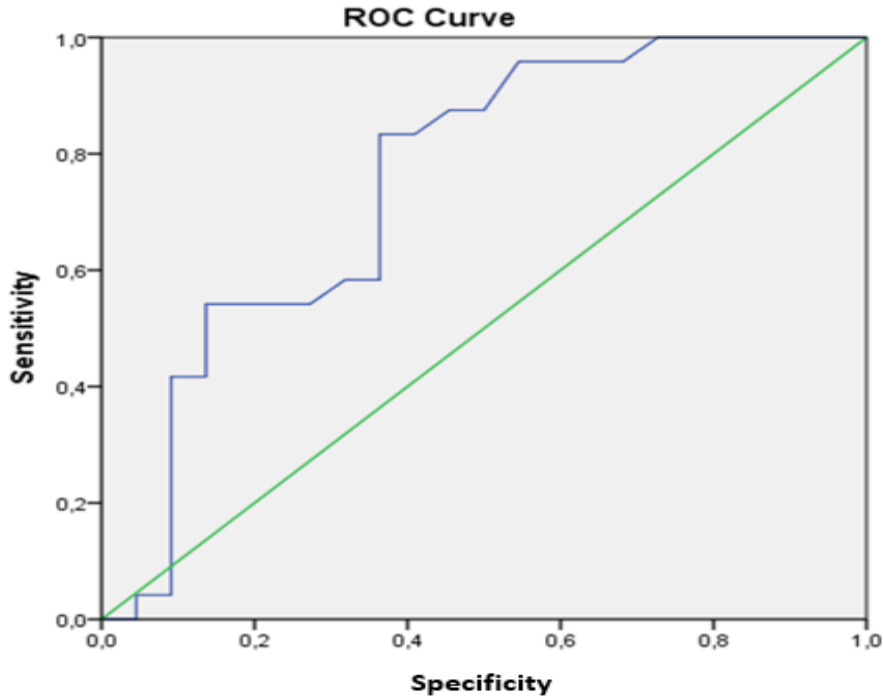
**EW002\_1:** Tanı sırasında alınan periferik kan; **EW002\_2:** Operasyon sırasında alınan tümör doku; **EW002\_3:** Operasyon sırasında alınan periferik kan; **EW002\_4:** 1.kür kemoterapi sonrasında alınan periferik kan; **EW002\_5:** 4.kür kemoterapi sonrasında alınan periferik kan (1.Seçim kemoterapi sonrası)

#### 4.2.3. miR-218-5p için ROC Analizi

miR-218-5p moleküllerinin aday biyobelirteç olarak tanısal performansını yani sarkomlu hastaları sağlıklı hastalardan ayırma gücünü belirlemek üzere Receiver Operator Characteristics (ROC) analizi yapıldı. Tablo 4.15'te verilen miR-218-5p için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları bulunmaktadır ve bu analize göre yüksek miR-218-5p ekspresyon düzeyinin sarkom hastalarını sağlıklı kişilerden ayırma gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu [ $p=0,003$ (ROC-AUC: 0,753; 95% CI: 0,606- 0,899)] gösterildi.

**Tablo 4-15:** miR-218-5p için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları

miRNA	ROC-AUC	95% CI	p değeri
miR-218-5p	0,753	0,606 - 0,899	0,003

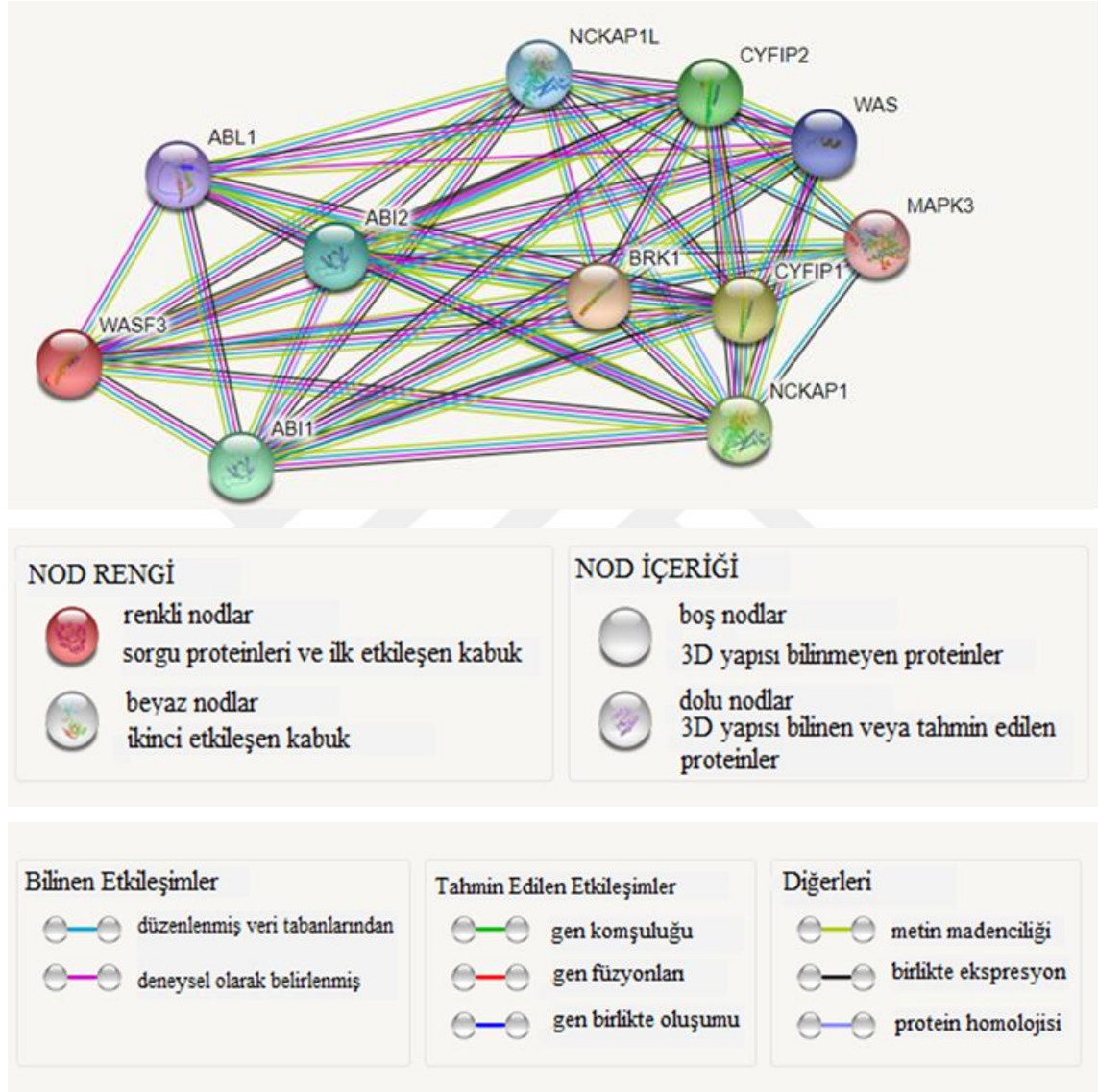


**Şekil 4-10:** Sarkomlu hastalarda ve sağlıklı kontrollerde miR-218-5p' nin ROC-AUC değer grafiği

### 4.3. miR-218-5p ve WASF3 için STRING analizi

miR-218-5p' nin hedef genleri “mirTarBase”, “TargetScan” ve “miRDB” veri tabanları kullanılarak belirlendi. miR218-5p'nin hedef genlerinin en fazla ilişkili olduğu protein ağını göstermek için “STRING Analizi (Protein-protein etkileşim analizi)” yapıldı. Hedef genler arasında *WASF3*, *AB11*, *AB12*, *WIPF2*, *WASL*, *ACTR3* başta olmak üzere 1084 adet gen bulunduğu saptandı. *WASF3* için saptanan ortak gen hedeflerinin, STRING veri tabanı kullanılarak yapılan protein düzeyinde etkileşim sonuçları anlamlı bulunmuştur ( $p=1 \times 10^{-6}$ ). Bu analiz sonuçları Şekil 4-11'de gösterilmiştir. *WASF3*'ün hedef genleri arasında en yakın ve etkili olanların *ABL1*, *AB11*, *AB12*, *CYFIP1*, *CYFIP2*, *NCKAP1*, *NCKAP1L*, *WAS*, *MAPK* ve *BRK1* genleri olduğu görüldü. String analizi sonrasında elde edilen ağdaki protein etkileşimlerinin anlamlı olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ). String analizi sonuçlarına göre

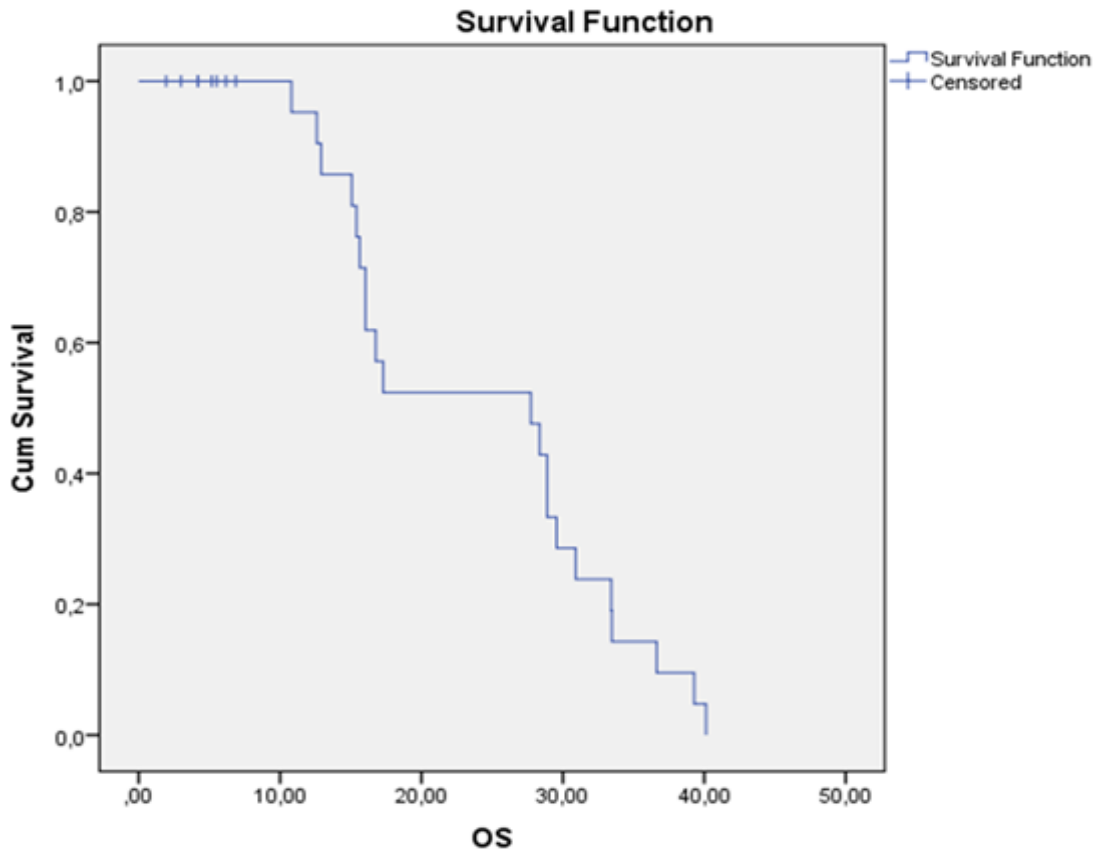
miR-218-5p'nin hedeflediği genler ve buna bağlı proteinler arasında *WASF3* ve *ABI1* protein etkileşiminin güçlü olduğu tespit edildi ( $p=0,0059$ ). Ayrıca *WASF3* ve *ABI2* protein etkileşimi de istatistik olarak anlamlı bulundu. String analizinde saptanan genlerin hücre morfolojisi ve hücre iskeleti organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı görüldü.



**Şekil 4-11:** *WASF3*'ün Gen/Protein Etkileşimini Gösteren String Analiz Sonuçları

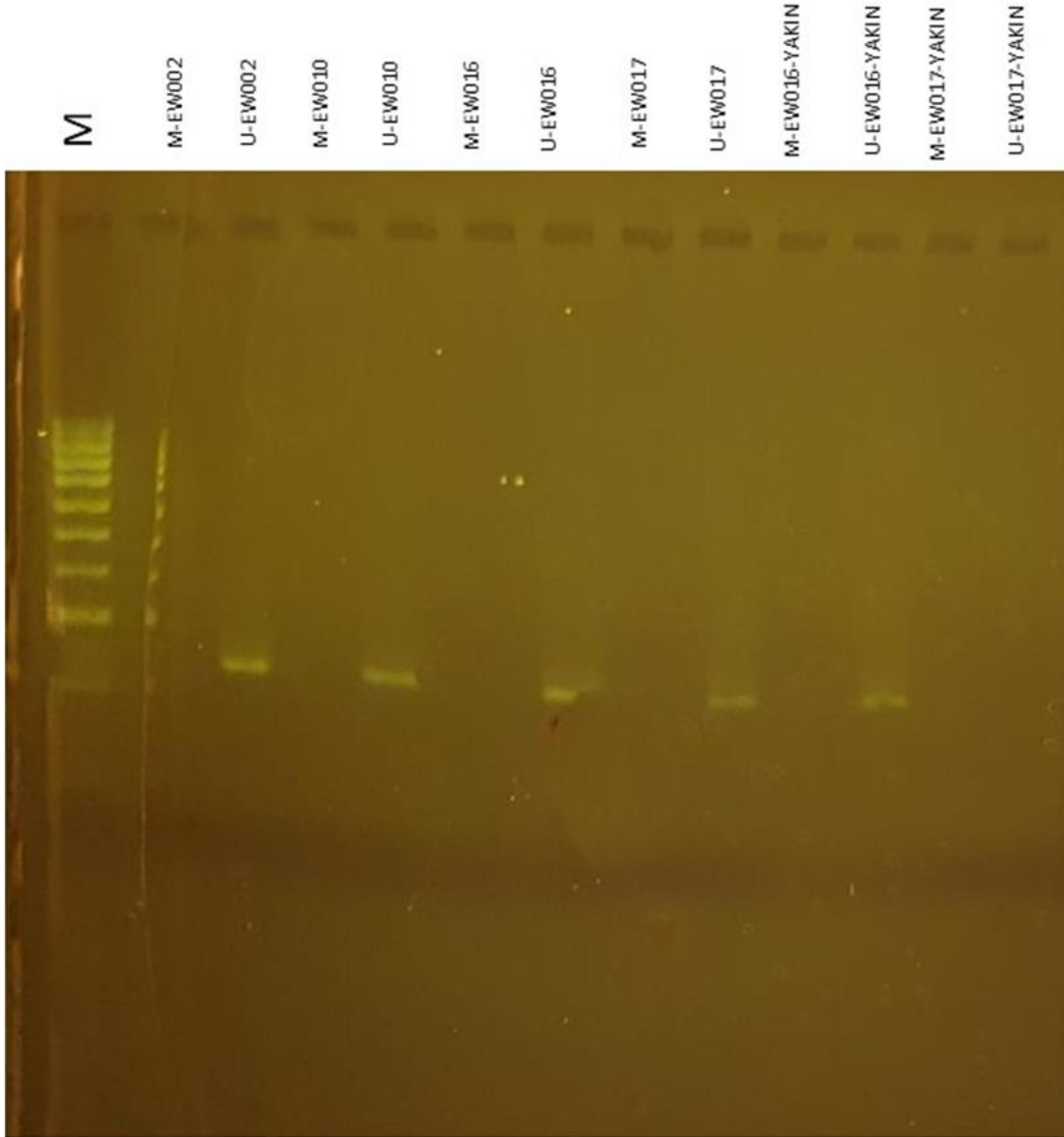
#### 4.4. Sağkalım Analizi

Hastaların sağkalım durumlarını değerlendirirken Kaplan Meier sağkalım analizi kullanıldı. Bu analize göre hastaların Overall survival(OS) medyan değerleri 27,7 ay, standart hatası 8,8, güven aralığının ise 10,4 ile 45,1 arasında olduğu hesaplandı (Median 27,7  $\pm$  8,8 [10,4-45,1]). Sağkalım grafiği ise Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



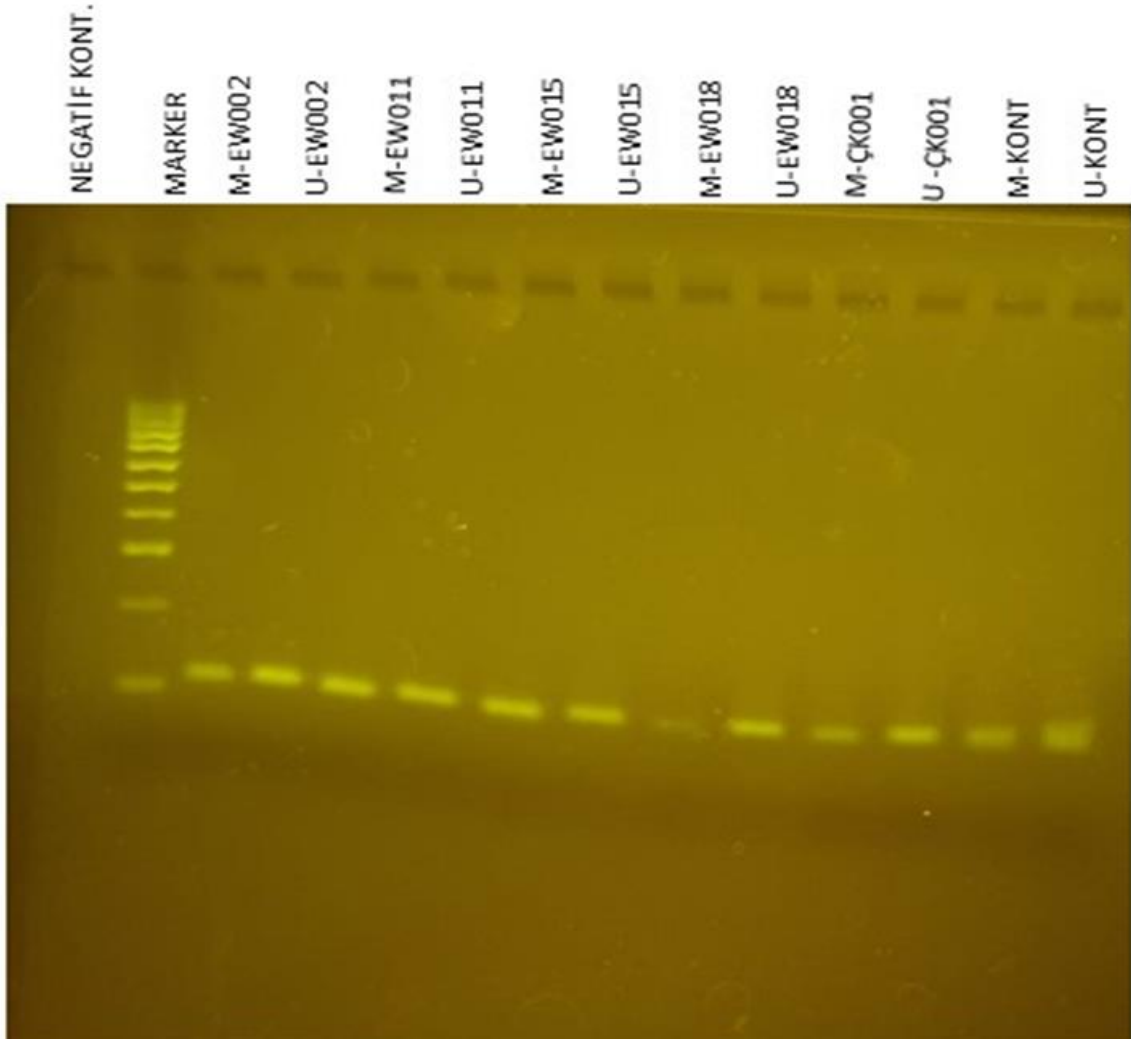
Şekil 4-12: Hastalara ait sağkalım grafiği

#### 4.5. Metilasyon Spesifik PCR için bulgular



**Şekil 4-13** : Sarkomlu Hastaların tümör dokularının ve yakın dokularının Metilasyon Spesifik PCR sonrası agaroz jel görüntüsü (M: Marker-ThermoScientific Gene Ruler LR ; M-EW002 – metile örnek; U-EW002- unmetile örnek; M-EW0016-YAKIN-metile yakın doku ; U-EW0016- YAKIN- unmetile yakın doku)

EW002, EW010, EW016, EW017 tümör dokularının ve EW016- tümöre yakın dokunun metilasyon örneklerinin unmetile olduğu agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. EW017- yakın dokuya ait PCR örneği defalarca tekrar edilmesine rağmen DNA örneğinin çalışmadığı saptandı.



**Şekil 4-14 :** Sarkomlu ve sağlıklı kontrollere ait periferik lenfosit örneklerinin Metilasyon Spesifik PCR sonrası agaroz jel görüntüsü

25 hasta örneğinden 4 hasta (EW001, EW004, EW006, EW007 kodlu örnekler) defalarca DNA izolasyonları da tekrarlanmasına rağmen PCR’da sonuç alınamadı. Kalan 21 hasta ve 22 kontrol örneğinin hepsinde hem metile de hem de unmetile de bantlar görüldü.

## 5. TARTIŞMA

Ewing sarkom ve osteosarkom çocuklarda ve genç erişkinlerde oldukça agresif seyreden ve en sık görülen malign tümörlerdir [6], [7]. Ewing sarkomu (ES), tüm kemik sarkomlarının %10 ila %15'ini oluşturan, adolesan ve genç erişkinlerde görülen agresif bir tümördür [8]. Ewing sarkomu, TET / FET (TLS / FUS, EWSR1 ve TAF15) familyası genleri ile E26 transformasyon spesifik familyası genleri arasında kromozomal translokasyonları olan malign küçük yuvarlak hücreli bir tümördür [9]. Bu tümörde t(11;22)(q24;q12) translokasyonu vardır. 22 numaralı kromozomdaki EWS geni, 11 numaralı kromozom üzerindeki FLI-1 geni ile birleşerek Ewing Sarkom proteini olarak isimlendirilen bir füzyon proteinine yol açar [10].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 yılında yeni bir sınıflandırma yayınlayarak kanser teşhisinin standardizasyonuna yönelik önemli bir adım attı. Özellikle yumuşak doku tümörleri, kemik tümörleri gibi nadir hastalıklarda, tanı doğruluğunu artırmak oldukça önemli olmaktadır. Son 20 yılda genetik bilimindeki gelişmeler özellikle yeni füzyon genlerin tanımlarını giderek artırdı. t(11;22)(q24;q12) translokasyonu tümörlerin %85'i ile ilişkilidir ve EWS-FLI-1 oluşumuna yol açarken, t(21;12)(22;12) ve daha az yaygın olan translokasyonlar EWS-ERG füzyonuna yol açarak vakaların %10 ila %15'ini oluşturur [9]. Klasik Ewing Sarkomuna ilaveten füzyon yapan EWSR1 ile ilişkili yuvarlak hücreli sarkom (ETS olmayan füzyonlar), CIC(Capicua Transcriptional Repressor) rearanjmanı ilişkili sarkom, BCOR (BCL-6 transcriptional corepressor) rearanjmanı ilişkili sarkomlarda artık sınıflandırma da yerini almıştır.

Osteosarkom en yaygın olarak büyüme plakalarının yakınındaki uzun kemiklerin metafizinde ortaya çıkar, tümörlerin üçte ikisi distal femurda diz eklemi çevresinde ortaya çıkar ve bunu ikinci en sık bölge olarak proksimal tibia takip eder; proksimal humerus, tümörlerin %10'unu oluşturan üçüncü en yaygın bölgedir [45], [46].

Agresif nitelik taşıyan bu tümörlerin etiyojisi tam olarak bilinmediği için, sarkom tedavisinde çok fazla ilerleme kaydedilememiştir. Sarkomlarla ilgili yapılan çalışmalarda en önemli kısıtlayıcı ve zorlayıcı faktörlerin moleküler çalışmalar için uygun tümörlerin nadir olması, materyalin bulunamaması kemoterapiden sonra tümörün tamamen kaybolması ve örneklerin dekalsifikasyonu gibi teknik zorluklar sayılabilir [44].

Tez çalışmasında *WASF3* gen ifadesi için 25 sarkomlu hastanın periferik kan örneklerinden elde edilen lenfositler ile yaş, cinsiyet ve etnik köken olarak eşleştirilmiş 22 sağlıklı çocuğun periferik kan lenfositleri kullanılarak gerçek zamanlı PCR yapılan işlemi gerçekleştirildi. miR-218-5p gen ifadesi çalışılırken 23 hastadan ve 22 sağlıklı kontrolden

çalışıldı. 2 hasta örneğinde miR-218-5p' yi defalarca tekrar etmemize rağmen çalışmadı. Metilasyon Spesifik PCR çalışmasın da 21 hasta ve 22 kontrol grubuyla çalışma tamamlandı. Bunların dışında 16 yaşında bir hastanın tedavi öncesi, operasyon esnasında kan ve tümör dokusu, operasyon sonrası 3 ay aralıklarla kan örnekleri çalışıldı. Çalışmamıza yön vermesi açısından toplamda 4 tümör dokusu ve bu hastaların 2 tane de yakın dokusu tüm teknikler için çalışılmıştır.

Wiskott-Aldrich sendromu protein (*WASP*) ailesi, hücre invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynar. Aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol oynayan çeşitli genler arasında, özellikle *WASF3*'ün invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu ve yüksek dereceli tümörlerde upregüle olduğu gösterilmiştir [126]. *WASF3*, aktin polimerizasyonunu destekleyen *ARP2/3* kompleksinin güçlendirmesi yoluyla aktin hücre iskeleti dinamiklerinin düzenlenmesinde rol oynayan Wiskott-Aldrich sendromu protein ailesinin (*WASP*) bir üyesidir. Hücre hareketliliği, göçü ve invazyonu ile ilişkili olan lamellipodia gibi zar yapılarının üretiminde sorumludur. *WASF3*'ün çeşitli hücre tiplerinde in vitro yıkılması, invazyon kaybına yol açar. Bu invazyon ve metastaz kaybı, mutant *TP53*, mutant *RAS* gibi kanser hücrelerinin genetik yapısından ve *STAT3*'ü eksprese edip etmemelerinden bağımsızdır. *WASF3*'ün aşırı ekspresyonu invaziv olmayan kanser hücrelerinde invazyonu artırır. Bununla birlikte, yapısal olarak aktive edilmiş *STAT3*'ü eksprese eden hücrelerde *WASF3*'ün inaktivasyonu, yine de invazyon ve metastazın baskılanmasına yol açar, bu da yukarıda açıklanan *STAT3* tarafından düzenlenen genlerin aktivasyonunun metastatik fenotipi korumak için yeterli olmadığını gösterir. Birkaç çalışma, artan *WASF3* seviyelerinin artan invazyona yol açtığını ve kanser hücrelerinin IL-6 tedavisinin artmış ekspresyon seviyelerine ve artan *WASF3* aktivasyon seviyelerine yol açtığını göstermektedir [71]. *STAT3*'ün, *WASF3* promotöründeki elementlere bağlandığını, IL-6 tedavisine yanıt olarak ekspresyonunun upregüle olduğu gösterilmiştir, bu da artan invazyon potansiyeline yol açmıştır. İnvazyonu desteklemek için *WASF3*, *PI3K*, *ABL*, ve *JAK2* gibi farklı kinazlar tarafından gerçekleştirilebilen fosfoaktivasyon yolları vardır [78]. Çalışmalar *WASF3*'ün kansere doğrudan dahil olduğunu ve kanserin gelişimi, ilerlemesi sırasında hücre çoğalması ve migrasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. *WASF3* ekspresyonunun kaybı, invaziv özellikleri kontrol eden metalloproteinazların downregülasyonu ile sonuçlanır [75].

Yapılan çalışmada *WASF3* hesaplamaları için hastaların medyan yaşı  $13,5 \pm 6,3$  (5-38) şeklindeydi. Hastaların 24'ü 20 yaş altında tanı almışken sadece 1 tanesi 20 yaş üzerinde tanı almıştı. Hastaların 18'si erkek 7'si ise kadın hastalardan oluşmaktaydı. Çalışmaya alınan hastaların radyolojik tümör çapları 0,3cm-19cm arasında olup hastaların tümör çapı ortalaması 8,3 cm idi. Hastaların 3'ünde metastaz bulunurken 22'sinde metastatik bir tutulum

saptanmamıştı. Hastaların tümör tutulum bölgeleri değerlendirildiğinde; 3'ünün cranium, 7'sinin trunk, 1'inin üst ekstremité, 14'ünün ise alt ekstremité bölgelerinde konumlandığı belirlendi. Hastaların klinik özellikleri ile tedavi öncesi *WASF3* gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar Tablo 4-5' de verildi. Hastalara ait *WASF3*'ün ifade düzeyi ile tanı yaşı ( $p:0,718$ ), cinsiyet farkı ( $p:0,106$ ), tümör çapı ( $p:0,642$ ), metastatik durumları ( $p:0,514$ ), tümör tutulum bölgeleri ( $p: 0,965$ ) arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Aile bireylerindeki kanser öykülerine değerlendirildiğinde 25 hastanın 12'sinde 1. veya 2. derece aile bireylerinde kanser öyküsü geçmişi görülmüştür. İstatistiksel olarak  $p=0,051$  değeri çıkması anlamlı olmasa da daha yüksek popülasyonlarda çalışıldığında ailesel öykünün önem kazanacağı görülmektedir.

Tez çalışmasında *WASF3* için sarkomlu hastaların, sağlıklı gruba göre ifade düzeyindeki ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) artış veya azalışı belirten grafikler Şekil 4-1'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre hastalar, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *WASF3*'ün  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,6$  değeri iken sağlıklı grupta bu değer 3,6 olarak bulundu. Bulgularımıza göre *WASF3*'ün sarkomlarda kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan Mann-Whitney U testine göre *WASF3*'ün ifade düzeyinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). *WASF3* için elde edilen p değeri  $p=0,004$  (Tablo 4-4). Ayrıca incelediğimiz *WASF3* moleküllerinin aday biyobelirteç olarak tanısal performansını diğer bir deyişle sarkom tanılı hasta ve sağlıklı kontrol grubunu ayırt edebilme gücünü gösterebilmek amacı ile Receiver Operator Characteristics (ROC) analizi gerçekleştirildi (Şekil 4-5). Tablo 4-8' te verilen *WASF3* için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları yer almaktadır ve bu sonuçlara göre sarkom hastalarının tanısında *WASF3* moleküllerinin tanısal gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p=0,000$ ). Sonuçlara göre hastalarda tedavi öncesi kanları çalışılan için *WASF3* ekspresyonunun azaldığı bulundu. Fakat kanları çalışılan 4 hastanın tümör dokusuna bakıldığında EW002 numaralı osteosarkomlu hastanın tümöründeki *WASF3* ekspresyonunu  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 146,9$  bulundu. Osteosarkomlu yetişkin hasta tümör dokusunda gen ifade değeri 11,4, sinoviyal sarkomlu hastada 397 bulundu. Retinoblastoma sonrası osteosarkom metastazı gelişen hastada *WASF3* gen ifade düzeyinin 914,9 olduğunu görmekteyiz. Sinoviyal sarkomlu ve retinoblastoma metastatik osteosarkomu olan hastaların iki yakın tümör dokusuna bakıldığında *WASF3* gen ifade düzeylerinin çok düşük olduğu tespit edildi. Bu da bize invazyonda ve metastazda sarkomlu hastalar için, hastalık süreci ilerledikçe *WASF3*'ün aktif bir şekilde tümör oluşumunda rol aldığını göstermektedir.

16 yaşında osteosarkomlu bir hastanın tedavi öncesi kanı, operasyon esnasında da kanı ve tümör dokusu incelendiğinde; hastanın tedavi öncesi *WASF3* ekspresyon seviyesi 1,18 iken hastanın tümör dokusunda bu değer 146,96' e çıktı. Operasyon esnasında alınan kan

örneğindeki ekspresyon değeri ise 122,96 olarak bulunmuştur. Hastanın operasyondan 3 ay sonra alınan kan örneğinde ise 10,12' lere kadar ekspresyon seviyesinin gerilediğini görmekteyiz. Daha sonraki 3 aylık kontrolde ise hastanın *WASF3* ekspresyon seviyesinin 0,08'lere kadar düştüğünü görmekteyiz. Bu duruma göre hastalık sürecinde *WASF3* gen ifadesinin rutin bir şekilde ölçülmesi hastalığın prognozu konusunda kliniğe çok ciddi bilgiler verecektir. Bu durumda *WASF3* hem diyagnostik hem de prognostik biyobelirteç olabilir.

MiRNA'lar, hem normal gelişimin hem de kanserin ayırt edici özelliklerinin güçlü düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Çeşitli kanserlerde miRNA'ların fonksiyon ve işlev bozukluğu, miRNA ekspresyonunun modüle edilmesinin bu tür hastalıklar için yeni bir terapötik modalite olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir [127], [128].

Yapılan bir çalışmada insan meme kanseri örneklerinde miR-218-5p ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yoluyla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, miR-218-5p'nin meme kanseri dokularında normal meme dokularına göre önemli ölçüde downregüle edildiğini gösterdi. Diğer kanser türlerinde de benzer bulgular bildirilmiştir bu da miR-218-5p ekspresyonundaki düşüşlerin insan kanser örneklerinde ve hücre dizilerinde yaygın olduğunu gösterir [129],[130]. 2017 yılında yapılan bir çalışmada miR-218 , *IL-6R* ve *JAK3* gen ekspresyonunu baskılayarak akciğer kanseri hücre proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe etmektedir [131]. Farklı bir çalışmada miR-217'nin tümör baskılayıcı bir miRNA olarak işlev gördüğünü ve *WASF3*'ü hedefleyerek osteosarkom tümör oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir [132]. Bunların aksine miR-218-5p, meme kanseri hücrelerinde *LRIG1*'i inhibe ederek *ErbB2* ve *EGFR* ekspresyonunu destekler, bu da miR-218-5p ve *LRIG1*'in meme kanserinde bir onkogen olarak hareket edebileceğini ve meme kanseri tedavileri için terapötik bir hedef olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir [133]. Tez çalışmasında da tedavi öncesi sarkomlu hastalarda miR-218-5p gen ifadesi burda bir onkogen gibi davranarak *WASF3*'ü inhibe etmiştir. Söz konusu miRNA mesane, ağız içi, hepatoselüler karsinom gibi bir çok kanser türünde tümör baskılayıcı olarak davranmasına rağmen sarkomlarda yaptığımız çalışmada miR-218-5p ekspresyonunun yüksek bulunması söz konusu miR-218-5p'nin sarkomlarda onkogen olarak davrandığını düşündürmektedir.

Yapılan çalışmada hastaların medyan yaşı  $12,5 \pm 6,6$  (5-38) şeklindeydi. Hastaların 22'si 20 yaş altında tanı almışken sadece 1 tanesi 20 yaş üzerinde tanı almıştı. Hastaların 16'si erkek 7'si ise kadın hastalardan oluşmaktaydı. Çalışmaya alınan hastaların radyolojik tümör çapları 0,3cm-19cm arasında olup hastaların tümör çapı ortalaması 8,3 cm idi. Hastaların 3'ünde metastaz bulunurken 20'sinde metastatik bir tutulum saptanmamıştı. Hastaların tümör tutulum bölgeleri değerlendirildiğinde; 3'ünün cranium, 5'sinin trunk, 1'inin üst ekstremitte, 14'ünün ise alt ekstremitte bölgelerinde konumlandığı belirlendi. Hastaların klinik özellikleri ile tedavi öncesi miR-218-5p gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar Tablo 4-12' de

verildi. Hastalara ait miR-218-5p'nin ifade düzeyi ile tanı yaşı (p:0,705), cinsiyet farkı (p:0,245), tümör çapı (p:0,649), metastatik durumları (p:0,493), tümör tutulum bölgeleri (p: 0,694) arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık saptanmadı. miR-218-5p ekspresyonu aile öyküsü açısından değerlendirildiği zaman 1. veya 2. Derece aile öyküsü geçmişinin 23 hastadan 11'inde olduğu görülmektedir. Bu 11 hastanın da 9' unda artmış gen ekspresyonu bulundu.

Çalışmadan miR-218-5p'nin ifade düzeyinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı (p=0,006) olması, miR-218-5p'nin sarkomlarda diyagnostik ve prognostik açıdan önemli bir molekül olduğunu düşündürmektedir. Bu bulguyu, miR-218-5p molekülünün sarkom tanılı hastaları sağlıklı kişilerden ayırt edebilme gücünü gösteren ROC analiz sonucu istatistiksel anlamı olarak desteklemektedir (p=0,003). Bununla birlikte, miR-218-5p'nin sarkomların onkogenezinde etkili bir moleküler mekanizma olduğu, gerek miR-218-5p gerekse bu molekülün etkileştiği proteinlerin gelecekteki çalışmalarda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda ilk defa osteosarkomlu bir hastanın tanı anından başlayarak farklı tedavi aşamaları esnasında periferik kanında miR-218-5p ekspresyon düzeyi araştırılmış ve tedavi sırasında periferik kandaki miR-218-5p ekspresyon düzeyinin tedaviye bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Bu değişimin ve miR-218-5p'nin tedavi süresince takibinin hastalığı izlemede ve prognozu belirlemede kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca incelediğimiz hastanın tümör dokusunun alındığı andaki periferik kanındaki miR-218-5p ekspresyonlarının birbirine çok yakın değerde çıkmış olması söz konusu molekülün periferik kanda incelenmesinin tümör dokuda incelenmesi kadar değerli olduğunu ve periferik kan örneklerinin bu grupta hastalarda tümör dokusu yerine kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu bulguların daha fazla hastanın takipli incelendiği geniş hasta gruplarda gösterilmesi bu bulgunun değerini arttıracaktır. Tüm bu bulgular miR-218-5p'nin hem diyagnostik hem de prognostik non-invaziv biyolojik belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Tümör dokusunda miR-218-5p'nin incelendiği örnekler arasında özellikle sinoviyal sarkomlu hastaya ait tümör dokusunda miR-218-5p ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre 5982,1 kat artış gösterdiği ve yine bu hastadan tümöre 0,5cm uzaklıktan alınan tümöre yakın normal dokuda 660 kat olduğu görülmektedir. Yetişkin sinoviyal sarkomlu hastanın tümör dokusunda miR-218-5p seviyesinin tümöre yakın normal dokuya göre 9 kat yüksek olarak saptanması çalışılan dokunun tam tümör yatağından alındığını, normal gibi görünen yakın çevre dokunun da tümör hücreleri ile infiltre olduğunu göstermektedir. miR-218-5p'nin sinoviyal sarkomlar içinde gerek diyagnoz gerekse prognoz açısından önemli bir biyolojik belirteç olabileceğini göstermekte olup daha geniş hasta gruplarında sonuçların tekrarlanması bu molekülün diyagnostik ve prognostik önemini tam olarak belirlenmesi açısından değerli olacaktır.

Literatürde 2020 yılında Li ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada lenfoma, lösemi, Wilms tümörü ve retinoblastom gibi çeşitli kanserler için tedaviden sonra teşhis edilen Ewing sarkomu hastalarını bildirmişlerdir [101]. Çalışmamızda retinoblastoma tanılı kemik metastazı olan hastanın kemik dokusundan alınan tümör dokusunda ve kemiğe metastaz yapmış tümör çevresine yakın normal dokusunda sırasıyla 13,2 ve 0,9 olmak üzere farklı miR-218-5p ekspresyon düzeylerinin olduğu görülmüştür. Bu değerler incelendiğinde miR-218-5p ekspresyon düzeyinin retinoblastoma kemik metastazları için de anlamlı bir biyolojik belirteç olacağını düşündürmektedir.

Yapılan String analizinde miR-218-5p için beklenenden çok daha fazla anlamlı etkileşimleri olduğu bulunmuştur. miR-218-5p'nin hedef genleri arasında özellikle hücre morfolojisi ve hücre iskeleti organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan *ABII*, *ABI2*, *WASF3* gibi birçok genin bulunduğu gösterilmiştir. Bu genlerden *ABII*'in, 2021 yılında yapılan çalışmada meme kanserinde tümör invazyonunda ve metastazında rol oynadığı gösterilmiştir [134]. *WASF3* ekspresyonunun mide kanseri hastalarında daha kötü prognoz ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [65]. miR-218-5p için bulunan böyle bir etkileşim proteinlerin bir grup olarak en azından kısmen biyolojik olarak bağlı olduğunu ve invazyonla ilişkili olduğunu göstermektedir.

Çalışma kapsamında ele aldığımız miR-218-5p'nin kan ve tümör dokusunda araştırılan ifade düzeyi Ewing sarkomu, osteosarkom ve sinoviyal sarkomda yüksek diyagnostik değere sahip olduğu ve hem terapötik hem de prognostik belirteç olabileceği görülmektedir. Nadir tümörler olduğundan hasta sayısının az olması bu çalışmanın en önemli kısıtlı tarafını oluşturmaktadır. Çalışmadaki bir başka zorluk hastaların çoğunun İstanbul dışında yaşaması ve cerrahi operasyon sonrasındaki tedavilerine kendi yaşadıkları şehirlerdeki hastanelerinde devam etmek istemeleri nedeniyle tedavi takipli periferik kan örneklerinin alınamamış olmasıdır.

Hastaların sağkalım durumlarını değerlendirirken Kaplan Meier sağkalım analizini kullandık. Bu analize göre hastaların Overall survival (OS) medyan değerleri 27,7 ay, standart hatası 8,8, güven aralığı ise 10,4 ile 45,1 şeklindeydi (Median 27,7 ±8,8 [10,4-45,1]). Sağkalım grafiği ise Şekil 4.11'de gösterilmiştir

Metilasyonun iki temel görevi vardır. Bunlardan biri transkripsiyonu baskılamak diğeri genom bütünlüğünü ve güvenliğini sağlamaktır. Metillenmemiş durumdaki CpG adacıkları özellikle kanser ve yaşlanmada rol oynar. Bir çok genin özellikle hipermetilasyonda rol oynadığı gösterilmiştir [135]. Bazı kanser türlerinde metillenme gerçekleşirken bazılarında gerçekleşmemektedir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, hipometilasyonun meme ve over [136], kolorektal [137], lösemi [138] ve mesane [139] gibi kanserlerde gerçekleştiği görülmüştür. Metilasyon Spesifik PCR için hasta sonuçlarına bakıldığında EW002, EW010, EW016, EW017 tümör dokularının ve EW016-Yakın dokunun metilasyon örneklerinin

unmetile olduğu agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. EW017-yakın dokuya ait PCR örneği defalarca tekrar edilmesine rağmen örnek çalışmadı. Kalan 22 hasta ve 22 kontrol örneğinin hepsinde metilasyon görüldü. Hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanamadı. DNA'nın hipermetilasyonu gende istenmeyen suskunluğa sebep olurken, DNA'nın hipometilasyonu onkojenlerin aktivasyonuna neden olur. Bu çalışmada tümörde meydana gelen hipometilasyon *WASF3* geni üzerinde onkojenik etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Tümör dokularındaki değişikliklerin periferik kanda gözlenmemesi tümörlerin üzerinde çok daha fazla hasta ile ekspresyon düzeyinde çalışmalarla desteklenmelidir.

Sonuç olarak, *WASF3*'ün ekspresyonunun periferik kanda tanı anında düşük bulunması, tümör dokusunda ve operasyon esnasında yüksek çıkması genin tümör invazyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca tedavi sonrası gen ekspresyonunun düşmesi hastalığın prognozu boyunca takip edilebilecek önemli bir marker olduğunu ortaya koymaktadır. Lösemi hastalarının klinik takibinde kullanılan *JAK2*, *inv(16)*, *BCR-ABL* değerleri gibi *WASF3* değerinin de sarkomlu hastalarda klinik takibinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Fakat tabii bunun için çok fazla sayıda takipli hasta ile sonuçların çalışılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, miRNA'lar, çeşitli biyolojik süreçlerdeki kritik rolleri nedeniyle sarkomlarda umut verici terapötik hedefler olma potansiyeline sahiptir. Çalışma sonuçlarımız tedavi öncesi sarkomlu hastalarda miR-218-5p ekspresyonunun yüksek çıkarak bir onkogen gibi hareket ettiğini düşündürmektedir. Osteosarkomlu hastanın tedavi süresince hem periferik kan hem de tümör örneklerinde yapılan çalışmalarda miR-218-5p ekspresyon düzeyinin tedaviye bağlı olarak değiştiği ayrıca tedavi süresince takibinin hastalığı izlemede ve prognozu belirlemede kullanılabileceğini göstermektedir. Bunlara ilaveten çalışma sonuçları miR-218-5p ekspresyonunun sinoviyal sarkomlu ve retinoblastomlu kemik metastazlı hastalarda da yüksek diyagnostik değere sahip olduğunu ve hem terapötik hem de prognostik belirteç olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Kanwal, R., K. Gupta, and S. Gupta, *Cancer epigenetics: an introduction*. Cancer epigenetics, 2015: p. 3-25.
2. DeVita, V.T., T.S. Lawrence, and S.A. Rosenberg, *Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer*. 2012: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Williams, R.F., I. Fernandez-Pineda, and A. Gosain, *Pediatric sarcomas*. Surgical Clinics, 2016. **96**(5): p. 1107-1125.
4. Magrath, I., et al., *Paediatric cancer in low-income and middle-income countries*. The lancet oncology, 2013. **14**(3): p. e104-e116.
5. Johnston, W., et al., *Childhood cancer: estimating regional and global incidence*. Cancer Epidemiology, 2021. **71**: p. 101662.
6. Kim, S.K. and Y.-K. Park, *Ewing sarcoma: a chronicle of molecular pathogenesis*. Human pathology, 2016. **55**: p. 91-100.
7. Misaghi, A., et al., *Osteosarcoma: a comprehensive review*. Sicot-j, 2018. **4**.
8. Ludwig, J.A., *Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future*. Current opinion in oncology, 2008. **20**(4): p. 412-418.
9. Riggi, N. and I. Stamenkovic, *The biology of Ewing sarcoma*. Cancer letters, 2007. **254**(1): p. 1-10.
10. Eaton, B.R., et al., *Ewing sarcoma*. Pediatric blood & cancer, 2021. **68**: p. e28355.
11. Ewing, J., *THE CLASSIC: Diffuse Endothelioma of Bone*. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 2006. **450**: p. 25-27.
12. Sbaraglia, M., E. Bellan, and A.P. Dei Tos, *The 2020 WHO classification of soft tissue tumours: news and perspectives*. Pathologica, 2021. **113**(2): p. 70.
13. Ross, K.A., et al., *The biology of ewing sarcoma*. International Scholarly Research Notices, 2013. **2013**.
14. Dabbs, D.J., *Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications*. 2022: Elsevier Health Sciences.
15. Asif, A., et al., *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for differential diagnosis of soft tissue sarcomas*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 2018. **19**(3): p. 655.
16. Sabah, D., *Ewing sarkomu*. TOTBİD, 2014.
17. Kaçmaz, İ.E., *Ewing Sarkom Hastalarında Tedavi Sonuçları*, in *Tıp Fakültesi*. 2015, Ege Üniversitesi: İzmir.
18. Zucman-Rossi, J., et al., *Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination*. Human genetics, 1997. **99**(3): p. 357-363.
19. Randall, R., et al., *Is there a predisposition gene for Ewing's sarcoma?* Journal of Oncology, 2010. **2010**.
20. Spunt, S.L., et al., *Ewing sarcoma-family tumors that arise after treatment of primary childhood cancer*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2006. **107**(1): p. 201-206.
21. Valery, P.C., et al., *Hernias and Ewing's sarcoma family of tumours: a pooled analysis and meta-analysis*. The lancet oncology, 2005. **6**(7): p. 485-490.

22. Li, S., et al., *Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase levels in Ewing's sarcoma: A meta-analysis*. *Molecular and Clinical Oncology*, 2016. **5**(6): p. 832-838.
23. Olmos, D., et al., *Targeting the insulin-like growth factor 1 receptor in Ewing's sarcoma: reality and expectations*. *Sarcoma*, 2011. **2011**.
24. Parafioriti, A., et al., *Ewing's sarcoma: an analysis of miRNA expression profiles and target genes in paraffin-embedded primary tumor tissue*. *International journal of molecular sciences*, 2016. **17**(5): p. 656.
25. Berber, U., et al., *Frequent CD99 and Fli-1 expressions in diffuse large B-cell lymphoma and their association with proliferative and apoptotic rates*. *EVALUATION*, 2013. **21**: p. 25.
26. Van Mater, D. and L. Wagner, *Management of recurrent Ewing sarcoma: challenges and approaches*. *OncoTargets and therapy*, 2019. **12**: p. 2279.
27. Kebudi, R. and D.U. Alkaya, *Epidemiology and survival of childhood cancer in Turkey*. *Pediatric Blood & Cancer*, 2021. **68**(2): p. e28754.
28. Gaspar, N., et al., *Ewing sarcoma: current management and future approaches through collaboration*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(27): p. 3036-3046.
29. Garnett, M.J., et al., *Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells*. *Nature*, 2012. **483**(7391): p. 570-575.
30. Kovac, M., et al., *Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency*. *Nature communications*, 2015. **6**(1): p. 1-9.
31. Brown, H.K., et al., *Biology of bone sarcomas and new therapeutic developments*. *Calcified tissue international*, 2018. **102**(2): p. 174-195.
32. Paoluzzi, L., et al., *Response to anti-PDI therapy with nivolumab in metastatic sarcomas*. *Clinical Sarcoma Research*, 2016. **6**(1): p. 1-7.
33. Machado, I., S. Navarro, and A. Llombart Bosch, *Ewing sarcoma and the new emerging Ewing-like sarcomas:(CIC and BCOR-rearranged-sarcomas). A systematic review*. 2016.
34. Chen, S., et al., *Ewing sarcoma with ERG gene rearrangements: a molecular study focusing on the prevalence of FUS-ERG and common pitfalls in detecting EWSR1-ERG fusions by FISH*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2016. **55**(4): p. 340-349.
35. Riggi, N., M.L. Suvà, and I. Stamenkovic, *Ewing's sarcoma*. *New England Journal of Medicine*, 2021. **384**(2): p. 154-164.
36. Ng, T.L., et al., *Ewing sarcoma with novel translocation t (2; 16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV*. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2007. **9**(4): p. 459-463.
37. Brohl, A.S., et al., *The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation*. *PLoS genetics*, 2014. **10**(7): p. e1004475.
38. Thanindrarn, P., et al., *Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy*. *Journal of bone oncology*, 2019. **15**: p. 100221.
39. Gorthi, A., et al., *EWS-FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma*. *Nature*, 2018. **555**(7696): p. 387-391.
40. Pappo, A.S. and U. Dirksen, *Rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma, and other round cell sarcomas*. *Journal of Clinical Oncology*, 2018. **36**(2): p. 168-179.

41. Gianferante, D.M., L. Mirabello, and S.A. Savage, *Germline and somatic genetics of osteosarcoma—connecting aetiology, biology and therapy*. Nature Reviews Endocrinology, 2017. **13**(8): p. 480-491.
42. Júnior, L.C.L., et al., *Emerging cytokine networks in osteosarcoma*. Cancer Cell & Microenvironment, 2017. **4**.
43. Gill, J. and R. Gorlick, *Advancing therapy for osteosarcoma*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2021. **18**(10): p. 609-624.
44. Tsiambas, E., et al., *Novel molecular and metabolic aspects in osteosarcoma*. J BUON, 2017. **22**(6): p. 1595-8.
45. Bielack, S.S., et al., *Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols*. Journal of clinical oncology, 2002. **20**(3): p. 776-790.
46. Fletcher, C.D., K.K. Unni, and F. Mertens, *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Vol. 4. 2002: Iarc.
47. Choi, J.H. and J.Y. Ro, *The 2020 WHO classification of tumors of bone: an updated review*. Advances in anatomic pathology, 2021. **28**(3): p. 119-138.
48. Ayan, İ., R. Kebudi, and H. Özger, *Childhood osteosarcoma: multimodal therapy in a single-institution Turkish series*. Pediatric and Adolescent Osteosarcoma, 2009: p. 319-338.
49. Bauer, H.C., et al., *DNA analysis in the differential diagnosis of osteosarcoma*. Cancer, 1988. **61**(7): p. 1430-1436.
50. Ragland, B.D., et al., *Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma*. Laboratory investigation, 2002. **82**(4): p. 365-373.
51. Boehm, A., et al., *Cytogenetic findings in 36 osteosarcoma specimens and a review of the literature*. Pediatric Pathology & Molecular Medicine, 2000. **19**(5): p. 359-376.
52. Tarkkanen, M., et al., *DNA sequence copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma*. International journal of cancer, 1999. **84**(2): p. 114-121.
53. Czarnecka, A.M., et al., *Molecular biology of osteosarcoma*. Cancers, 2020. **12**(8): p. 2130.
54. Miller, C.W., et al., *Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcomas*. Journal of cancer research and clinical oncology, 1996. **122**(9): p. 559-565.
55. Burningham, Z., et al., *The epidemiology of sarcoma*. Clinical sarcoma research, 2012. **2**(1): p. 1-16.
56. Mai, P.L., et al., *Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort*. Cancer, 2016. **122**(23): p. 3673-3681.
57. Ballinger, M.L., et al., *Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study*. The Lancet Oncology, 2016. **17**(9): p. 1261-1271.
58. Pang, Y., et al., *To explore the mechanism of the GRM4 gene in osteosarcoma by RNA sequencing and bioinformatics approach*. Medical science monitor basic research, 2018. **24**: p. 16.
59. Savage, S.A., et al., *Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma*. Nature genetics, 2013. **45**(7): p. 799-803.

60. Ji, J., et al., *Inherited germline ATRX mutation in two brothers with ATR-X syndrome and osteosarcoma*. American journal of medical genetics Part A, 2017. **173**(5): p. 1390-1395.
61. Loveless, R. and Y. Teng, *Targeting WASF3 signaling in metastatic cancer*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(2): p. 836.
62. Schaks, M., et al., *Distinct interaction sites of Rac GTPase with WAVE regulatory complex have non-redundant functions in vivo*. Current Biology, 2018. **28**(22): p. 3674-3684. e6.
63. Beltzner, C.C. and T.D. Pollard, *Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(11): p. 7135-7144.
64. Frugtniet, B., W.G. Jiang, and T.A. Martin, *Role of the WASP and WAVE family proteins in breast cancer invasion and metastasis*. Breast Cancer: Targets and Therapy, 2015. **7**: p. 99.
65. Nie, Y., et al., *WASF3 expression correlates with poor prognosis in gastric cancer patients*. Future Oncology, 2019. **15**(14): p. 1605-1615.
66. Wu, J., et al., *Expression of WASF3 in patients with non-small cell lung cancer: Correlation with clinicopathological features and prognosis*. Oncology Letters, 2014. **8**(3): p. 1169-1174.
67. Ji, Y., et al., *Overexpression of WAVE3 promotes tumor invasiveness and confers an unfavorable prognosis in human hepatocellular carcinoma*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015. **69**: p. 409-415.
68. Park, G.B. and D. Kim, *TLR5/7-mediated PI3K activation triggers epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells through WAVE3-dependent mesothelin or OCT4/SOX2 expression*. Oncology Reports, 2017. **38**(5): p. 3167-3176.
69. Sossey-Alaoui, K., et al., *WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression*. Experimental cell research, 2005. **308**(1): p. 135-145.
70. Ghoshal, P., et al., *HIF1A induces expression of the WASF3 metastasis-associated gene under hypoxic conditions*. International Journal of Cancer, 2012. **131**(6): p. E905-E915.
71. Teng, Y., et al., *Critical role of the WASF3 gene in JAK2/STAT3 regulation of cancer cell motility*. Carcinogenesis, 2013. **34**(9): p. 1994-1999.
72. Teng, Y., et al., *HSP90 and HSP70 proteins are essential for stabilization and activation of WASF3 metastasis-promoting protein*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(13): p. 10051-10059.
73. Lang, L., R. Loveless, and Y. Teng, *Emerging links between control of mitochondrial protein ATAD3A and cancer*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(21): p. 7917.
74. Teng, Y., et al., *Mitochondrial ATAD3A combines with GRP78 to regulate the WASF3 metastasis-promoting protein*. Oncogene, 2016. **35**(3): p. 333-343.
75. Teng, Y., et al., *WASF3 provides the conduit to facilitate invasion and metastasis in breast cancer cells through HER2/HER3 signaling*. Oncogene, 2016. **35**(35): p. 4633-4640.
76. Sossey-Alaoui, K., et al., *WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(23): p. 21748-21755.

77. Wang, W., et al., *WAVE3 phosphorylation regulates the interplay between PI3K, TGF- $\beta$ , and EGF signaling pathways in breast cancer*. *Oncogenesis*, 2020. **9**(10): p. 1-13.
78. Sossey-Alaoui, K., X. Li, and J.K. Cowell, *c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE3 is required for lamellipodia formation and cell migration*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(36): p. 26257-26265.
79. Qin, H., et al., *Wasf3 deficiency reveals involvement in metastasis in a mouse model of breast cancer*. *The American journal of pathology*, 2019. **189**(12): p. 2450-2458.
80. Teng, Y., et al., *Targeting the WASF3–CYFIP1 complex using stapled peptides suppresses cancer cell invasion*. *Cancer research*, 2016. **76**(4): p. 965-973.
81. Teng, Y., et al., *The WASF3–NCKAP1–CYFIP1 Complex Is Essential for Breast Cancer Metastasis Role of the CYFIP1–NCKAP1 Complex in Metastasis*. *Cancer research*, 2016. **76**(17): p. 5133-5142.
82. Yazici, H., *Functions of miRNAs in the Development, Diagnosis, and Treatment of Ovarian Carcinoma*, in *Current Trends in Cancer Management*. 2019, IntechOpen London, UK.
83. Palmi, G. and M.L. Brandi, *microRNAs and bone tumours: Role of tiny molecules in the development and progression of chondrosarcoma, of giant cell tumour of bone and of Ewing's sarcoma*. *Bone*, 2021. **149**: p. 115968.
84. Cho, W.C., *MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010. **42**(8): p. 1273-1281.
85. Wang, J., et al., *The role of miRNA in the diagnosis, prognosis, and treatment of osteosarcoma*. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 2019. **34**(10): p. 605-613.
86. Zhou, X., et al., *MicroRNA-638 inhibits cell growth and tubule formation by suppressing VEGFA expression in human Ewing sarcoma cells*. *Bioscience Reports*, 2018. **38**(1).
87. Roberto, G.M., et al., *MiR-708-5p is inversely associated with EWS/FLII Ewing sarcoma but does not represent a prognostic predictor*. *Cancer Genetics*, 2019. **230**: p. 21-27.
88. Chen, J., et al., *MiR-107 suppresses cell proliferation and tube formation of Ewing sarcoma cells partly by targeting HIF-1 $\beta$* . *Human cell*, 2018. **31**(1): p. 42-49.
89. Kawano, M., et al., *MicroRNA-20b promotes cell proliferation via targeting of TGF- $\beta$  receptor II and upregulates MYC expression in Ewing's sarcoma cells*. *International journal of oncology*, 2017. **51**(6): p. 1842-1850.
90. Satterfield, L., et al., *miR-130b directly targets Arhgap1 to drive activation of a metastatic CDC42-PAK1-API positive feedback loop in Ewing sarcoma*. *International journal of cancer*, 2017. **141**(10): p. 2062-2075.
91. Wu, G., et al., *MicroRNA-145-3p suppresses proliferation and promotes apoptosis and autophagy of osteosarcoma cell by targeting HDAC4*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018. **46**(sup2): p. 579-586.
92. Qu, L., et al., *The miR-146b-5p promotes Ewing's sarcoma cells progression via suppressing the expression of BTG2*. *Science Progress*, 2021. **104**(2): p. 00368504211002043.

93. Tanoglu, G. and S. Ozturk, *miR-145 suppresses epithelial-mesenchymal transition by targeting stem cells in Ewing sarcoma cells*. Bratislavske Lekarske Listy, 2021. **122**(1): p. 71-77.
94. Kawano, M., et al., *MicroRNA-301a promotes cell proliferation via PTEN targeting in Ewing's sarcoma cells*. International journal of oncology, 2016. **48**(4): p. 1531-1540.
95. Cheng, Y., et al., *MicroRNA-218 inhibits bladder cancer cell proliferation, migration, and invasion by targeting BMI-1*. Tumor Biology, 2015. **36**(10): p. 8015-8023.
96. Liu, Y., et al., *MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1*. Oncology reports, 2012. **28**(3): p. 1013-1021.
97. Kogo, R., et al., *The microRNA-218~ Survivin axis regulates migration, invasion, and lymph node metastasis in cervical cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(2): p. 1090.
98. Wang, G., et al., *miR-218 inhibits proliferation, migration, and EMT of gastric cancer cells by targeting WASF3*. Oncology research, 2017. **25**(3): p. 355.
99. Guo, J., et al., *Expression of Concern: MiRNA-218 regulates osteoclast differentiation and inflammation response in periodontitis rats through Mmp9*. Cellular Microbiology, 2019. **21**(4): p. e12979.
100. Tu, K., et al., *Prognostic significance of miR-218 in human hepatocellular carcinoma and its role in cell growth*. Oncology reports, 2014. **32**(4): p. 1571-1577.
101. Li, L., H. Yu, and Q. Ren, *MiR-218-5p suppresses the progression of retinoblastoma through targeting NACCI and inhibiting the AKT/mTOR signaling pathway*. Cancer Management and Research, 2020. **12**: p. 6959.
102. Tang, S., et al., *miR-218 suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion via regulation of angiopoietin-2*. Experimental and therapeutic medicine, 2016. **12**(6): p. 3837-3842.
103. Wang, Y., Y. Jiang, and L. Chen, *Role of miR-218-GREMI axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma: An in vivo and vitro study based on microarray data*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. **24**(23): p. 13824-13836.
104. Li, Y., et al., *LncRNA KCNQ1OT1 facilitates the progression of bladder cancer by targeting MiR-218-5p/HS3ST3B1*. Cancer Gene Therapy, 2021. **28**(3): p. 212-220.
105. Sun, B., C. Zhao, and Y. Mao, *MiR-218-5p Mediates Myocardial Fibrosis after Myocardial Infarction by Targeting CX43*. Current Pharmaceutical Design, 2021. **27**(44): p. 4504-4512.
106. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-798.
107. Park, J.W. and J.-W. Han, *Targeting epigenetics for cancer therapy*. Archives of pharmacal research, 2019. **42**(2): p. 159-170.
108. Skvortsova, K., C. Stirzaker, and P. Taberlay, *The DNA methylation landscape in cancer*. Essays in biochemistry, 2019. **63**(6): p. 797-811.
109. Cooper, D.N., *Eukaryotic DNA methylation*. Human genetics, 1983. **64**(4): p. 315-333.
110. Edwards, J.R., et al., *DNA methylation and DNA methyltransferases*. Epigenetics & chromatin, 2017. **10**(1): p. 1-10.

111. Mendelsohn, J., et al., *The molecular basis of cancer*. 2014: Elsevier Health Sciences.
112. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 27-36.
113. Hur, K., et al., *Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis*. *Gut*, 2014. **63**(4): p. 635-646.
114. Koch, A., et al., *Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited*. *Nature reviews Clinical oncology*, 2018. **15**(7): p. 459-466.
115. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
116. Xing, X., et al., *The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis*. *British journal of cancer*, 2013. **108**(12): p. 2542-2548.
117. Du, Q., et al., *Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome*. *Epigenomics*, 2015. **7**(6): p. 1051-1073.
118. Kohli, R.M. and Y. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. *Nature*, 2013. **502**(7472): p. 472-479.
119. Sun, W., et al., *TKTL1 Is Activated by Promoter Hypomethylation and Contributes to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Carcinogenesis through Increased Aerobic Glycolysis and HIF1 $\alpha$  Stabilization*. *TKTL1 in Head and Neck Cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2010. **16**(3): p. 857-866.
120. Barbano, R., et al., *Aberrant Keap1 methylation in breast cancer and association with clinicopathological features*. *Epigenetics*, 2013. **8**(1): p. 105-112.
121. Klughammer, J., et al., *The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space*. *Nature medicine*, 2018. **24**(10): p. 1611-1624.
122. Cecotka, A. and J. Polanska, *Region-specific methylation profiling in acute myeloid leukemia*. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 2018. **10**(1): p. 33-42.
123. Liu, X. and D.A. Brenner, *DNA methylation controls liver fibrogenesis*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2016. **13**(3): p. 126-128.
124. Kantarjian, H.M., et al., *Guadecitabine (SGI-110) in treatment-naive patients with acute myeloid leukaemia: phase 2 results from a multicentre, randomised, phase 1/2 trial*. *The Lancet Oncology*, 2017. **18**(10): p. 1317-1326.
125. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1996. **93**(18): p. 9821-9826.
126. Kulkarni, S., et al., *Increased expression levels of WAVE3 are associated with the progression and metastasis of triple negative breast cancer*. 2012.
127. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. *EMBO molecular medicine*, 2012. **4**(3): p. 143-159.
128. Kumar, M.S., et al., *Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(10): p. 3903-3908.
129. Luu, H.N., et al., *miRNAs associated with prostate cancer risk and progression*. *BMC urology*, 2017. **17**(1): p. 1-18.

130. Xia, C., et al., *The multifunction of miR-218-5p-Cx43 axis in breast cancer*. *OncoTargets and therapy*, 2019. **12**: p. 8319.
131. Yang, Y., et al., *MicroRNA-218 functions as a tumor suppressor in lung cancer by targeting IL-6/STAT3 and negatively correlates with poor prognosis*. *Molecular cancer*, 2017. **16**(1): p. 1-13.
132. Shen, L., et al., *MicroRNA-217 regulates WASF3 expression and suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma*. *PloS one*, 2014. **9**(10): p. e109138.
133. Qian, M., et al., *MiR-218-5p promotes breast cancer progression via LRIG1*. 2021.
134. Regua, A., et al., *ABII-based expression signature predicts breast cancer metastasis and survival*. *Molecular Oncology*, 2021.
135. Baylin, S.B. and J.G. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. *Trends in genetics*, 2000. **16**(4): p. 168-174.
136. Gupta, A., et al., *Hypomethylation of the synuclein  $\gamma$  gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma*. *Cancer research*, 2003. **63**(3): p. 664-673.
137. Kim, K.-H., et al., *Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2006. **12**(35): p. 5651.
138. Roman-Gomez, J., et al., *Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia*. *Oncogene*, 2005. **24**(48): p. 7213-7223.
139. Seifert, H.-H., et al., *In situ detection of global DNA hypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer*. *Experimental and molecular pathology*, 2007. **82**(3): p. 292-297.

## HAM VERİLER



## FORMLAR

### Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD Kanser Genetiği Polikliniğine başvuran sarkom kanser tanısı almış bireyleri “Çocukluk Çağı Sarkomlarında *WASF3* Geninin Ekspresyon, Metilasyon ve miRNA Profilinin Araştırılması” araştırmasına davet etmek üzere hazırlanmıştır.

**Çalışmanın Adı:** Çocukluk Çağı Sarkomlarında *WASF3* Geninin Ekspresyon, Metilasyon ve miRNA Profilinin Araştırılması

**Tez Öğrencisi:** Msc. Bio. Fazilet ÖZDENOĞLU

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Hülya YAZICI

**Araştırmayı Yürütecek Kuruluşun Adı:** İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD

**Destekleyici Kuruluş:** İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi

#### Araştırma Hakkında Bilgi

“Çocukluk Çağı Sarkomlarında *WASF3* Geninin Ekspresyon, Metilasyon ve miRNA Profilinin Araştırılması” adını verdiğimiz çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.”

Projemizin amacı aday olarak belirlenen *WASF3* geninin, sarkomlu çocuklar ile sağlıklı çocuklardan alınan kan örnekleri arasında moleküler olarak karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Çalışmanın sonunda aday olarak belirlenen genin metilasyonu, ekspresyonu ve ilgili miRNA ekspresyonu düzeyi belirlenerek çocukluk çağı sarkomlarında erken tanı ve taramada kullanılıp kullanılmayacağı belirlenmiş olacaktır. İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD Kanser Genetiği Polikliniğine başvuran 30 kişi, çalışma hakkında bilgilendirilip onayı alındıktan sonra genetik test öncesi periferik kan (7-10 cc.) örnekleri alınacaktır.

Kan alma sırasında kan alınan bölgede acı, morarma, kanama ya da diğer rahatsızlıklar meydana gelebilir, fakat bu güçlüklerin en aza indirilmesi için gereken önlemler alınacaktır. İşlem sonrası ortaya çıkabilecek olası enfeksiyonlar için gerekli ilaçlar reçete edilecektir. Bu araştırma sonunda Tez tamamlandığında WASF3 gen ekspresyonunun metilasyonla mı yoksa ilişkili miRNA ile mi kontrol edildiği ve bu ilgili moleküllerin çocukluk çağı sarkomlarındaki durumu belirlenmiş olacaktır.

### **Katılımcının Beyanı**

Doktor Hülya Yazıcı tarafından İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsünde “Çocukluk Çağı Sarkomlarında WASF3 Geninin Ekspresyon, Metilasyon ve miRNA Profiline Araştırılması” konusunda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilendirmeden sonra böyle bir araştırmaya “gönüllü” olarak katılmak üzere davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin, gizlilik içinde, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile korunacağı güvencesi verildi. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında da kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Tarafıma bir ücret ödenmeyecektir. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle olabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak parasal bir yük altına da girmeyeceğim. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof.Dr. Hülya Yazıcı İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsünde 0212 414 24 34 / 34186 numaralı telefon ve adresten arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde **gönüllü** olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun bir örneğinin bana verileceğini de biliyorum.”

**İmza ve ulaşım bilgileri****Gönüllünün**

Adı-Soyadı:.....

İmzası:.....

Tarih:.....

Adresi (varsa telefon no., faks no.):.....

**Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının**

Adı-Soyadı:.....

İmzası:.....

Tarih: .....

**Gerekliyse olur işlemine tanık olan kişinin**

Adı-Soyadı:.....

İmzası:.....

Tarih:.....

Adresi (varsa telefon no., faks no.):.....

**Gerekliyse yasal temsilcisinin**

Adı-Soyadı:.....

İmzası:.....

Tarih:.....

Adresi (varsa telefon no., faks no.):.....

## ÇOCUKLUK ÇAĞI SARKOMLARI HASTALARINA AİT BİLGİ FORMU

- 1-Adınız, Soyadınız? .....
- 2-Kaç yaşındasınız? .....
- 3-Doğum tarihiniz? ..... Doğum kilosu: .....
- 4-Cinsiyetiniz nedir? Kadın ( ) Erkek ( )
- 5-Kan grubunuz nedir? ..... Göz renginiz nedir? .....
- 6-İkiziniz var mı?
- a) Evet – tek yumurta ikizi misiniz? → a) Evet b) Hayır
- b) Hayır
- c) Bilmiyorum
- 7-İkiz kardeşinizde herhangi bir hastalık var mı? .....
- 8-Şu andaki boy ve kilonuz? .....
- 9-Kanser tanısı koyulmadan bir yıl önceki kilonuz? .....
- 10-Öğrenim durumunuz nedir? .....
- 11-Medeni durumunuz nedir? .....
- 12-Sizin, anne ve babanız ile anneanneniz ve dedeniz, babaanneniz ve dedenizin doğdukları şehir ya da ülke neresidir?
- Siz:
- Anneniz:
- Babanız:
- Anneanneniz:
- Dedeniz:
- Babaanneniz:
- Dedeniz:
- 13-Etnik kökeniniz nedir ya da hangi ırktan geliyorsunuz?
- Türk ( ); Arap ( ); Kürt ( ); Rum ( ); Süryani ( ); Kafkas ( ); Balkan ( );
- Asya ( ); Tatar ( ); Diğer ( )
- 14-Sosyoekonomik durumunuz?
- Düşük ( ) Orta ( ) Normal ( ) Yüksek ( )
- 15-Herhangi bir doktor çocuğunuzun hastalığı hakkında size bilgi verdi mi? Sarkom, osteosarkom ya da habis bir hastalıktan söz etti mi?
- a) Evet -kanser tipi nedir? .....
- ilk tanı koyulduğunda kaç yaşındaydı? .....
- b) Hayır
- c) Bilmiyor

16-Kemiklerde bir şişlik, kırık fark ettiniz mi? Kaç yaşındaydı?

- a) Evet  
b) Hayır

17-Daha önce çocuğunuza aşağıdaki hastalıklardan herhangi biri için tanı konuldu mu?

- | a) Evet                                     | b) Hayır           |
|---|--------------------|
| a) Retinoblastoma                           | Evet ( ) Hayır ( ) |
| b) Kondrosarkom                             | Evet ( ) Hayır ( ) |
| c) Fibrosarkom                              | Evet ( ) Hayır ( ) |
| d) Rabdomiyosarkom                          | Evet ( ) Hayır ( ) |
| e) Leiomyosarkom                            | Evet ( ) Hayır ( ) |
| f) Lösemi                                   | Evet ( ) Hayır ( ) |
| g) Lenfoma                                  | Evet ( ) Hayır ( ) |
| h) Melanom                                  | Evet ( ) Hayır ( ) |
| i) Beyin tümörü                             | Evet ( ) Hayır ( ) |
| j) Göz kapağı karsinomu                     | Evet ( ) Hayır ( ) |
| k) Malign filloides tümörler                | Evet ( ) Hayır ( ) |
| l) Retinom ve diğer benign retinal tümörler | Evet ( ) Hayır ( ) |
| m) Osteosarkom                              | Evet ( ) Hayır ( ) |
| n) Wilms Tümörü                             | Evet ( ) Hayır ( ) |
| o) Ewing Sarkom                             | Evet ( ) Hayır ( ) |

18-Ailenizden veya akrabalarınızdan herhangi biri arasında genetik test yaptıran oldu mu?

- a) Evet- Hangi tip? RB( ) p53( ) BRCA1/2( ) APC( ) Diğer ( )  
Mutasyon durumu? .....  
Akrabalık derecesi? .....
- b) Hayır

19-Ailede kemik rahatsızlığı yönünden takip yapıldı mı?

- a) Evet b) Hayır  
Sonuç? .....  
Akrabalık derecesi? .....

20-Kanser tanısından önce hiç ameliyat geçirdi mi?

- Kasık Fıtığı? .....  
a) Evet Kaç yaşındaydı?..... Nedeni:.....  
b) Hayır

21-Kanser tanısı koyulması için aşağıdaki tetkikler yapıldı mı?

- BT
- MR
- Oftalmolojik muayene
- Göz Anjiyosu
- Ultrasonografi
- Lomber Ponksiyon
- Kemik İliği Aspirasyonu

- a) Evet – Kaç yaşındaydı?.....
- b) Hayır

22-Hastalıkla ilgili tedavi oldu mu?

- a) Evet
- b) Hayır

23-Hangi tedavi yöntemleri uygulandı?

- Dondurma (Kriyoterapi)
- Lazer
- Yakma (Termoterapi)
- Radyoterapi
- Kemoterapi
- İntraarteriyel kemoterapi
- Enükleasyon(Gözün cerrahi müdahale ile çıkarılması)

24-Tedavi amaçlı kullandığı ilaç var mı? İlaç isimleri nelerdir?

- a) Evet
- b) Hayır

**İlaçlar:** .....

**ANNE**

25-Çocuğun biyolojik annesi siz misiniz? .....

26-Annenin doğum tarihi nedir? ..... Doğum yaptığınızda kaç yaşındaydınız?.....

27- Mesleğiniz nedir? Kaç yıldır bu işle uğraşıyorsunuz?.....

28-Annenin sigara içme alışkanlığı:

Hiç içmedim ( ) Eskiden içerdim ( ) Kaç Yıl: ..... Adet/Gün: .....

29-Anne sigara içilen ortamlarda sıkça bulunur mu?

- a) Evet
- b) Hayır

30-Anne hamilelik döneminde sigaraya maruz kaldı mı?

- a) Evet
- b) Hayır

31-Anne alkollü içecekler kullanır mı?

- a) Evet
- b) Hayır
- c) Eskiden kullanırdım
- Nadiren/Sosyal içici ( ) Haftada 1 kez ( ) Haftada 2-3 kez ( )
- Haftada 4-5 kez ( ) Haftada 6-7 kez ( )
- Bira/Şarap/Likör ( ) Rakı/Viski/Votka ( )

32-Anne hamilelik döneminde alkol kullandınız mı?

- a) Evet b) Hayır

33- IVF uygulaması aldınız mı? Hasta olan çocuğunuz tüp bebek miydi?

- a) Evet 1 kez ( ) 2 kez ( ) 3 kez ( ) 3'den fazla ( )  
b) Hayır

34- Hasta olan çocuğunuz tüp bebek miydi?

- a) Evet b) Hayır

35- Doğum hangi yolla gerçekleştirildi?

- a) Normal b) Sezaryen

36- Hamilelik döneminde sabah kusmaları görülür müydü?

- a) Evet Nadiren ( ) Günde bir kez ( ) Günde 2-5 kez ( ) Günde 5'den fazla  
b) Hayır

37-Hamilelik döneminde sabah kusmaları görüldü mü? Kaç ay sürdü?

- a) Evet 1 ay ( ) 2 ay ( ) 3 ay ( ) 3 aydan fazla ( )  
b) Hayır

### RADYASYON ETKİLEŞİMİ

38-Hiç radyasyona maruz kaldınız mı? Ne sıklıkta?

- a) Evet b) Hayır

X ışını uygulama sayısı ..... X- ışını uygulandığındaki yaşı .....

- a) Tomografi ya da MR  
b) İnce bağırsağa ya da mideye Baryum uygulaması  
c) Pelvise X-ışını uygulaması  
d) Scoliosis  
e) Kanseri tedavisi  
f) Sintigrafi  
g) Kalbe katater takılması  
h) Tüberküloz (fluoroskopik X-ışını)  
i) Diğer (Belirtiniz)  
j) Hiç  
k) Bilmiyor

39-Anne hamilelik döneminde radyasyona maruz kaldı mı?

- a) Evet Kaç kez? .....  
b) Hayır

40-Aşağıdaki cihazları ne sıklıkla kullanırsınız?

- Cep Telefonu → ..... saat/gün  
 Bilgisayar → ..... saat/gün  
 Mikrodalga fırın → haftada kaç gün mikrodalgada ısıtılmış bir şey  
yiyorsunuz?  
1 kez ( ) 2 kez ( ) 3 kez ( ) 3 kezden fazla ( )

**BABA**

41-Çocuğun biyolojik babası siz misiniz? .....

42-Doğum Tarihiniz? ..... Çocuğunuz doğduğunda siz kaç yaşındaydınız? .....

43- Mesleğiniz nedir? Kaç yıldır bu işle uğraşıyorsunuz? .....

Aşağıdaki meslek gruplarında buldunuz mu? Kaç yıl?

Kaç Yıl

- |   |       |
|---|-------|
| <input type="checkbox"/> Askeriye         | ..... |
| <input type="checkbox"/> Metal Endüstrisi | ..... |
| <input type="checkbox"/> Kaynakçılık      | ..... |
| <input type="checkbox"/> Makinist         | ..... |
| <input type="checkbox"/> Diğer            | ..... |

44-Babanın sigara içme alışkanlığı:

Hiç içmedim ( )      Eskiden içerdim ( )      Kaç Yıl: ..... Adeti/Gün: .....

45-Baba sigara içilen ortamlarda sıkça bulunur mu?

- a) Evet      b) Hayır

46- Baba alkollü içecekler kullanır mı?

- a) Evet      b) Hayır      c) Eskiden kullanırdım
- Nadiren/Sosyal içici ( )      Haftada 1 kez ( )      Haftada 2-3 kez ( )
- Haftada 4-5 kez ( )      Haftada 6-7 kez ( )
- Bira/Şarap/Likör ( )      Rakı/Viski/Votka ( )

**RADYASYON ETKİLEŞİMİ**

47-Hiç radyasyona maruz kaldınız mı? Ne sıklıkta?

- a) Evet      b) Hayır

X ışını uygulama sayısı ..... X- ışını uygulandığındaki yaşı .....

- a) Tomografi ya da MR
- b) İnce bağırsağa ya da mideye Baryum uygulaması
- c) BT ya da Pelvise X-ışını uygulaması
- d) Scoliosis
- e) Kanser tedavisi
- f) Sintigrafi
- g) Kalbe katater takılması
- h) Tüberküloz (fluoroskopik X-ışını)
- i) Diğer (Belirtiniz)
- j) Hiç
- k) Bilmiyor

48- Aşağıdaki cihazları ne sıklıkla kullanırsınız?

- Cep Telefonu → ..... saat/gün  
 Bilgisayar → ..... saat/gün  
 Mikrodalga fırın → haftada kaç gün mikrodalgada ısıtılmış bir şey yiyorsunuz?  
1 kez ( ) 2 kez ( ) 3 kez ( ) 3 kezden fazla ( )

**Ortak Sorular**

49-Evinizde küf problemi var mı?

- a) Evet b) Hayır

50-Staphylococcus aureus enfeksiyonu geçirdiniz mi?

- a) Evet Hamilelik döneminde mi? .....  
b) Hayır



## ETİK KURUL KARARI



**PATENT HAKKI İZİNİ**



## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### ÇOCUKLUK ÇAĞI SARKOMLARINDA WASF3 GENİNİN EKSPRESYON, METİLYASYON VE MİRNA PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI-2

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>12</b> BENZERLİK ENDEKSİ	% <b>12</b> İNTERNET KAYNAKLARI	% <b>1</b> YAYINLAR	% <b>2</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>8</b>
<b>2</b>	<a href="http://dergipark.org.tr">dergipark.org.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444">nek.istanbul.edu.tr:4444</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://earsiv.anadolu.edu.tr">earsiv.anadolu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>6</b>	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://jag.journalagent.com">jag.journalagent.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

