T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN KORDOMALARINDA EKSPRESYON FARKLILIKLARI OLAN MİKRORNA'LARIN VE İLGİLİ TRANSKRİPTLERİN İNCELENMESİ VE BUNLARIN KORDOMALARIN PATOGENEZİNDEKİ ÖNEMİNİN BELİRLENMESİ

Ömer Faruk Bayrak

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN KORDOMALARINDA EKSPRESYON FARKLILIKLARI OLAN MİKRORNA'LARIN VE İLGİLİ TRANSKRİPTLERİN İNCELENMESİ VE BUNLARIN KORDOMALARIN PATOGENEZİNDEKİ ÖNEMİNİN BELİRLENMESİ

Ömer Faruk Bayrak

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Hasan ACAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202069 proje numarası ile ve Yeditepe Üniversitesi Bilimsel Çalışma / Araştırma Kurulu tarafından B.30.2.YTÜ.0.70.10.00-001/471 nolu kararla desteklenmiştir.

KONYA-2010

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

……tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından …….. Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	"Unvanı Adı SOYADI" …… Üniversitesi	İmza
Danışman:	"Unvanı Adı SOYADI" …… Üniversitesi	İmza
Üye:	"Unvanı Adı SOYADI" …… Üniversitesi	İmza
Üye:	"Unvanı Adı SOYADI" …… Üniversitesi	İmza
Üye:	"Unvanı Adı SOYADI" …… Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu …… tarih ve …… sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza
"Unvanı Adı Soyadı"
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Kıymetli hocam İstanbul Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Özen'e akademik hayatın en önemli dönüm noktası olan doktora aşamasında bana verdiği sonsuz destek ve gösterdiği sabır için; lisans öğrenimim ardından beni her türlü konuda maddi ve manevi olarak destekleyen kıymetli büyüğüm ve hocam Yeditepe Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Fikrettin Şahin'e, kıymetli fikirlerinden her anlamda faydalandığım değerli hocam Yeditepe Üniversitesi öğretim görevlisi Doç. Dr. Mustafa Çulha'ya ve ağabeyim Dr. Altay Burak Dalan'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım Esra Aydemir, Serhat Sevli, Şükrü Güllüoğlu ve Nur Ekimci'ye, laboratuvarda bana son derece huzurlu ve mutlu anlar yaşatan mesai arkadaşlarım Zeynel Demir, Hülya Yeldan, Havva Şimşek, Meral Gültomruk, Levent Erkan'a, U-CHI hücre hattını bize hediye ederek çalışmamızı destekleyen Duke üniversitesinden David Alcorta'ya ve Amerikan kordoma vakfı kurucusu Josh Simone'e, mikroçiplerden elde edilen istatistiki verilerin konfirmasyonu yapan Baylor Üniversitesi öğretim görevlisi Yrd. Doç. Dr. Chad Creighton'a ve son olarak yolunda yürümekten hep gurur duyacağım babam Hamit Bayrak'a minnet ve teşekkürlerimi arz ediyorum.

Bu tezi rahmetli annem Nezihe BAYRAK'a ve hayatımın her aşamasında bana mutluluk kaynağı olan eşim Gül BAYRAK, kızlarım; Nezihe Neva BAYRAK ve Elif Asude BAYRAK'a ithaf ediyorum.

BEYAN

Prof. Dr. Hasan Acar'ın danışmanlığında gerçekleştirilen bu tez çalışmasının kendi çalışmamız olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ömer Faruk Bayrak

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**
BEYAN ..... **ii**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Kanser 1
1.1.1. Kanserin Tarihçesi 2
1.1.2. Kanserin Moleküler Biyolojisi ve Mekanizmaları 3
Hücre döngüsü ve kanser 5
Büyüme faktörleri ve kanser 7
Tirozin kinazlar 7
Onkogenler 8
Tümör baskılayıcı genler 11
1.1.3. Tarihsel Gelişim Sürecinde Kanser Tedavi Yöntemleri 14
Hormon tedavisi 14
Radyasyon tedavisi 14
Kemoterapi 15
Biyolojik tedavi 16
1.1.4. Kanserin Sınıflandırılması ve Kordoma 17
1.1.5. Gen Ekspresyon Analizine Bağlı Tümör Profillemesi 18
1.2. Kordoma 19
1.2.1. Kordomaların Patolojisi 23
1.2.2. Kordomaların Tanısı 24
1.2.3. Kordoma Sitogenetigi 27
1.2.4. Kordomanın Ailesel Geçişi 27
1.2.5. Kordomaların Tedavisi 28
1.2.6. Kordomanın Moleküler Biyolojisi 29
1.3. MikroRNA 31
1.3.1. miRNA Sentezi 33
1.3.2. mRNA Hedeflerinin mikro RNA'lar Tarafından Düzenlenmesi 36

1.3.3. miRNA Hedef Öngörüsü 37
Onkogen ve tümör baskılayıcı olarak miRNA'lar 39
Onkogen olarak miRNA'lar 42
1.3.4. miRNA çalışmalarında kullanılan temel yöntemler 43
1.4. Mikroçip 44
1.5. Mikroçip, miRNA ve Kordoma 47
2. GEREÇ VE YÖNTEM 50
2.1. Dokudan RNA İzolasyonu 50
2.2. Primer ve UCH-I Hücrelerinin Kültürü 53
2.3. Klasik PCR Çalışması 56
2.4. Mikroçip Çalışması 59
2.5. Real time PCR çalışması 62
2.6 İstatistiksel Değerlendirme 64
3. BULGULAR 65
3.1. RNA izolasyon Bulguları 65
3.2. Hücre Kültür Bulguları 68
3.3. Klasik PCR Bulguları 73
3.4. Mikroçip Deney Bulguları 76
3.5. Real-Time PCR bulguları 87
4. TARTIŞMA 97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 107
6. ÖZET 109
7. SUMMARY 110
8. KAYNAKLAR 111
8.1. EK-A Etik Kurul Onay Belgesi 143
8.2. EK-B Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu 145
8.3. EK-C Aydınlatılmış Gönüllü Onay Formu 146
8.4. EK-D miRNA Hedef bilgileri 147
9. ÖZGEÇMİŞ 151

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGO	:Argonat proteini
AML	:Akut miyeloid lösemi
ALL	:Akut lenfoblastik lösemi
CAM	:Hücre tutunma molekülü
CDC25	:Hücre bölünme döngüsü-25 (cell division cycle 25)
CDK	:Siklin bağımlı kinazlar (cyclin dependent kinase)
CGH	:Genomik hibridizasyon kıyaslaması
CKI	:Siklin kinaz inhibitörleri (Cyclin kinase inhibitor)
CSF	:Makrofaj koloni uyarıcı faktör
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DLB	:Diffüz büyük B hücreli lenfoma
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
eIF4E	:Ökaryotik başlatım faktörü 4E
EMA	:Epiteliyal zar antijeni
EST	:Yazılmış sekans-dizi etiketi
FGF	:Fibroblast büyüme faktörü
FISH	:Floresans in-sitü hibridizasyon
FLT3	:FMS bağımlı tirozin kinaz
GAPDH	:Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz
GSS	:Genomik keşif dizi analizi

IGF	:İnsülin benzeri büyüme faktörü
JAK	:Janus kinaz
KIT	:kök hücre faktör reseptör öncüsü
KLL	:Kronik lenfositik lösemi
KML	:Kronik miyeloid Lösemi
LOH	:Heterozigotluğun kaybı
MAPK	:Mitojen aktive edici protein kinaz
MET	:Hepatosit büyüme faktör reseptörü
miRNA	:mikroRNA
MMP	:Matriks metalloproteinaz
mRNA	:haberci RNA
mTOR	:Memeli rapamisin hedefi
PCR	:Polimeraz zincir tepkimesi
PDGF	:platelet büyüme faktörü (PDGF)
RAF	:Serin treonin protein kinaz
RB	:Retinoblastoma
RISC	:RNA ile uyarılmış susturucu kompleks
RNA	:Ribonükleik asit
RNAi	:RNA interferans
RTK	:Reseptör tirozin kinaz
STAT	:Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktive edici

TGF-α	:Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming growth Factor)
UTR	:Translasyona uğramayan bölge
VEGF	:Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Bütün canlılar hücrelerden oluşmuş ve en temel hayat formu olan tek hücrenin ikiye bölünmesi ile çoğalan hücre veya hücre topluluklarıdır. İnsan gibi kompleks organizmalar hücrelerin oluşturduğu doku ve organlardan meydana gelir ve hücreler birbirlerine belli bir program çerçevesinde birbirleri ile bilgi ağları vasıtasıyla bağlıdırlar. Normal olarak hücre bölünmesine eşlik eden büyüme ve gelişme belirli bir program ve denetim içerisinde gerçekleşir. Embriyonik evreden itibaren organizmaların yaşamlarında doku ve organların gelişmesi, hücre bölünmesi ve farklılaşması söz konusudur. Yaşam boyu bu süreç aynı döngüyle devam eder. Hayatın farklı dönemlerinde organizmada tek bir hücrede de olsa bu döngüde aksamalar ortaya çıkabilmektedir. Ortaya çıkan bu değişiklik canlıda farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olur.

1.1. Kanser

Normal vücut hücreleri belirli bir program çerçevesinde büyür, gelişir, bölünür ve ölür. İnsan hayatının ilk dönemlerinde vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğu, birey yetişkin oluncaya kadar oldukça büyük bir hızla bölünürken daha sonraki dönemlerde ise ölen hücrelerin yerini doldurmak veya sınırlı da olsa yenileme amacıyla bölünür. Kanserli hücreler ise herhangi bir ihtiyaç olmaksızın vücudun herhangi bir bölgesinde kontrolsüz olarak çoğalan hücrelerdir. Birçok kanser türü olmasına rağmen bütün kanser çeşitleri temel olarak program dışı ve kontrolsüz hücre bölünme esasına dayalıdır.

Yapılan araştırmalar ışığında kanserin genetik temelli bir hastalık olduğu tartışmasız kabul edilmektedir. Kanser; proto-onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin, DNA tamir mekanizması genlerinin ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerin mutasyona uğramasıyla ortaya çıkan bir süreçtir. Deoksiribonükleik asit (DNA)'te mutasyonların oluşmasından sonra: tümör başlangıcı, tümör gelişimi, malignansi dönemi ve tümörün yayılması olmak üzere belli başlı 4 farklı süreç ortaya

çıkar (Hahn ve Weinberg 2002). Fiziksel veya kimyasal faktörler ile DNA arasındaki etkileşimden kaynaklanan DNA'daki genetik değişim tümör başlangıcı olarak tarif edilir. Bu değişim geri dönüşümsüz olup bu değişikliğe sahip hücrelerin malin olma olasılığı normal hücrelerden çok daha fazladır. Bölünme döngüsü devam ederken mutasyon taşıyan bu hücrelerde; onkogenlerin aktifleştirebilecek, tümör baskılayıcı genleri veya DNA tamir mekanizmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genleri de inaktif hale dönüştürecek yeni mutasyonların oluşma ihtimali oldukça yüksektir. Oluşan bu mutasyonlar, genomik stabilitenin bozulmasına ve sonuç olarak kanser oluşumuna neden olabilmektedirler (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanserli olgular çok eski zamanlardan beri bilinmesine rağmen etkin bir tedavisinin bulunamamış olması, günümüzde binlerce insanın ölümüne neden olmaktadır. Her geçen yıl kanser vakalarında da artış kaydedilmektedir. 2006 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılmış bir araştırmada kalp rahatsızlıklarına bağlı ölümlerden sonra dünyada en fazla ölüme neden olan hastalığın kanser olduğu belirlenmiştir (Heron MP 2009).

1.1.1. Kanserin Tarihçesi

Kanser kelimesinin kökeni yunanca olup "yengeç" kelimesinden türetilmiştir. İlk olarak Hipokrat ortaya atmıştır. Kansinos ve karsinom kelimelerini tümörlerin ülseratif olup olmamasına bağlı olarak kullanmıştır. İnsanoğlunun kanserle bilimsel olarak tanışması 17. yüzyılı bulmuştur ve bu yüzyıl insanoğlunun kanserle alakalı bilgiler edinme sürecine hız katmıştır. Giovanni Morgagni yaptığı otopsilerde ölüme neden olan patolojik değişiklikleri keşfederek onkoloji çalışmalarının temelini atmıştır (Hunt 2000). Ünlü İskoç bilim adamı John Hunter bazı kanserlerin cerrahi müdahale ile düzeltilebileceğini ortaya koymuştur (Nutton 1988). Cerrahi müdahalelerin keşfinden bir yüzyıl sonra anestezideki gelişmeler cerrahi müdahalelerde de ilerlemeler kaydedilmesine yol açtı ve mastektomi geliştirildi (Mansi ve ark 1989).

19. yüzyılda mikroskop teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak onkoloji bilimi doğdu. Hücresel patolojinin kurucularından sayılan Rudolf Virchow modern patolojiyle onkolojiyi birleştirdi. Bu sayede, sadece kanser patolojisinin tespitinde değil, aynı zamanda kanser cerrahisinde de yeni bir çığır açtı. Ameliyatla çıkarılan vücut dokularından hastalığın kesin tanısı konulmaya başlandı (RATHER 1957).

Bununla birlikte, 18. yüzyıl boyunca üç önemli gözlem kanser epidemiyolojisinde öne çıktı. İtalyan Doktor Bernardino Ramazzini 1713 yılında rahibelerdeki serviks kanseri oranı ve göğüs kanseri oranını kıyasladığında hayat stilinin de kansere etkisi olduğunu ortaya koydu. Bu bulgu hamilelik ya da enfeksiyon gibi hormonal faktörlerin kanser oluşumu üzerine etkilerinin anlaşılmasında kilometre taşı olmuştur (Felton 1997). Bu dönemlerdeki araştırmacılar tümörlü dokunun alınmaması durumunda hastalığın çok fazla ilerleyeceğini görmüşler ve tümör kitlesinin alınmasına yönelik bir takım yöntemler ve cerrahi müdahaleler denemişlerdir. Anestezi ve kan naklinin keşfinden önce birçok cerrahi operasyon yapılmış, anestezinin de keşfiyle bu yüzyıl ameliyat yüzyılı olarak tarihe kaydedilmiştir (Felton 1997).

1.1.2. Kanserin Moleküler Biyolojisi ve Mekanizmaları

İlk olarak 1914 yılında Boveri genomik yapıdaki anomalilerin kanser oluşumunda etkili olabileceğini söylemiş ve yıllar sonra yapılan araştırmalarda bu hipotezi haklı çıkarmıştır (Descamps ve Prigent 2002, Sathananthan ve ark 2006). Teknolojinin ilerlemesi ve yeni buluşlarla beraber kanserin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında çok önemli gelişmeler yaşanmıştır. Mutasyonlar kanser hücrelerine; apoptoz sinyallerine duyarsızlık ve kendi kendine büyüme faktörü üretebilme gibi normal hücrelerde mevcut olmayan özellikler kazandırır ve bu özellikleri kazanan kanser hücreleri kontrolsüz olarak çoğalır. Tabi ki hücrelerde oluşan her türlü mutasyon kansere sebebiyet vermez, fakat bir takım genler vardır ki bu genler üzerindeki mutasyonlar kanser ile sonuçlanır. Bu gen grupları; proto-onkogenler, tümör baskılayıcı ve DNA tamir mekanizması genlerdir. Proto-

onkogenler hücre bölünmesinde, büyümesinde ve farklılaşmasında önemli roller üstlenen proteinlerin sentezinden sorumlu genlerdir. Proto-onkogenler üzerinde meydana gelen mutasyonlar genellikle bu genlerin fonksiyonun artmasıyla sonuçlanır. Tümör baskılayıcı genler ise hücre bölünmesini ve farklılaşmayı baskılayan proteinlerin sentezinden sorumlu genlerdir. Tümör baskılayıcı genler üzerinde meydana gelen mutasyonlar ise genellikle bu genlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Bu mutasyonlar baskın veya çekinik özellik gösterebilirler. Bu genlerdeki mutasyonların haricinde genomik dengesizlik oluşturabilecek mutasyonlar da kansere sebebiyet vermektedir. Yine çok önemli bir grup gen vardır ki bu genler üzerindeki mutasyonlarda kanser oluşumunda rol oynar. Bu genler DNA tamir mekanizmalarında görev alan proteinlerin kodlanmasından sorumlu genlerdir. Kanserin oluşumu kadar ilerlemeside genetik açıdan oldukça önemlidir. Bu yüzden hücrelerdeki mutasyonların birikmesi kanser oluşumunu ve gelişimini desteklemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar kanserin oluşumunda epigenetik faktörlerin önemli rol oynadığını göstermiştir. DNA'nın belirli bölgelerinin metillenmesi veya metillenmemesi de kanser oluşumunda oldukça önemli sonuçlar doğurur (Zhu ve Yao 2007).

Yapılan çalışmalarda kanserin kalıtıldığı gösteren kanıtlar olduğu gibi çoğu kanserin sporadik mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı da bilinmektedir.

Araştırmalar sonucu kanser hücrelerinin belirli özellikleri paylaştığı görülmüştür;

- Kanser hücreleri, dışarıdan bir uyarıya gerek duymaksızın sürekli olarak bölünüp çoğalırlar.

- Kanser hücreleri, büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlık kazanmışlardır.

- Kanser hücreleri sınırsız bölünme kapasitesine sahip olduğu için ölümsüz olarak kabul edilmektedirler.

- Tümör oluşumu içerisinde yeni damar yapılanması yeteneğine sahiptirler (angiogenez).

- Diğer dokulara nüfuz edebilme yetenekleri mevcuttur.

Hücre döngüsü ve kanser

Mitotik hücre döngüsü, birbirinin aynı olan iki oğul hücre oluşumu için gereklidir. Normal hücre döngüsü düşünüldüğünde son derece korunaklı olarak yürütülen bu işlem kanser hücreleri için aynı hassaslıkta ilerlemez.

Temel hücre döngü mekanizması G_1, S, G_2 ve M (mitoz) olarak 4 ana başlıkta incelenir. Bu aşamalarda sırasıyla hücre büyüme ve bölünme için gerekli proteinleri üretir, DNA replikasyonu gerçekleşir, mitoz için hazırlık yapılır ve mitotik proteinler üretilir ve son olarak hücrede mitoz bölünme gerçekleşir. Bu aşamaların haricinde hücrenin bölünme döngüsüne girmeden durağan olarak kalabildiği G_0 denilen bir dönem de mevcuttur.

Kanser hücresi mutasyonlar sonucu kontrolsüz olarak bölünür. Hücre döngüsünde gerek tümör baskılayıcı proteinler ve gerekse proto-onkogenler çeşitli fonksiyonlar üstlenirler. Bu durumda hücre; bölünme veya durağan olarak kalma veya apoptoza gitme gibi kararları alırken gerek hücre içi gerek hücre dışı sinyallerden faydalanır. Kanser hücrelerinde sinyalizasyondan sorumlu olan genler üzerinde mutasyonlar oluştuğu için hücre bölünme programına sağlıklı olarak karar veremez. Hücre kontrolsüz olarak bölünme kararı aldığında ise hücre döngüsündeki proteinler devreye girer. Kanser olgusunda hücre döngüsünde rol oynayan siklin bağımlı kinazlar (CDK-cyclin dependent kinase), CDK genlerini aktif veya inaktif (CKI-Cyclin kinase inhibitor) eden enzimleri sentezleyen genler üzerinde de

mutasyon oluşumu söz konusudur. Hücre döngüsünün her bir basamağı bu genlerle sıkı sıkıya kontrol edilmekte iken kanserli hücre, bu kontrollerden yoksun olarak hücre döngüsünü gerçekleştirmektedir.

G_1 fazında hücre, büyüme sinyallerini alarak bölünme hazırlıklarına başlar. Fakat normal hücrelerde G_1 fazından S fazına geçerken gerçekleşen kontrol, kanser hücrelerinde genellikle bozulmuştur. G_1/S fazı arasında kontrolde en önemli noktalardan birisi olan retinoblastoma (RB) genin fosforlanması, E2F transkripsiyon faktörünün serbest kalması ve bunun sonucu olarak DNA replikasyonun başlamasıdır (Umemura ve ark 2009). CDK'lar üzerinde oluşacak mutasyonlar tümör baskılayıcı genlerin aktive edilmesini engelleyebilir. CDK4 ve CDK6 üzerinde oluşan bazı mutasyonların bu proteinleri CKI'lere karşı duyarsız hale getirdiği bazı melanom, sarkom ve gliomalarda görülmüştür (Della Torre ve ark 2001, Flores ve ark 1997, Kanoe ve ark 1998, Tsao ve ark 1998). Ayrıca bazı kolon kanserlerinde hücre döngüsünde önemli rolleri olan CDK1 ve CDK2'nın çok fazla sentezlendiği gösterilmiştir (Salh ve ark 1999a, Seabra ve Warenius 2007, Walker ve Hayward 2001). G_1/S fazı arası geçiş için önemli olan CDC25 (cell division cycle 25 -hücre bölünme döngüsü-25)'in de kanserlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Boldrini ve ark 2007, Fraczek ve ark 2007, Guo ve ark 2004, Laezza ve ark 2006, Molinari 2000). Buna göre CDC25 proteinindeki mutasyonlar sonucu CDK'lar yeteri miktarda aktive olamaz ve hücre döngüsünde bozulmalara yol açar (Molinari 2000, Tang ve ark 1999).

Birçok kanser türünde yüksek miktarda sentezlendiği gösterilen Siklin D1 proteini CDK4 ve CDK2'yi G_1 erken dönemimde bağlayarak hücre bölünmesini indükler (Abboudi ve ark 2009, Burnworth ve ark 2006, Eshkoor ve ark 2009, Georgieva ve ark 2001, Vesely ve ark 2009, Yu ve ark 2008). t(11;14) translokasyonu görülen B hücre lenfomalarında da siklin D1'in yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Gumina ve ark 2010, Gupta ve ark 2009).

Yapılan çalışmalarda, gerek proto-onkogenler ve gerekse tümör baskılayıcı proteinlerle birlikte hareket eden CDK proteinlerindeki mutasyonların genellikle hücre döngüsünü bozduğu ve bu sebeple tümör oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (Bartkova ve ark 1996, Bishop ve Bishop 2005, Gao ve ark 1997).

Büyüme faktörleri ve kanser

Genellikle pro-onkogenler sınıfında yer almayan büyüme faktörlerinin kanser gelişiminde önemli rolleri vardır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-Insulin like growth factor), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF), platelet büyüme faktörü (PDGF), ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-α) gibi büyüme faktörlerinin, çeşitli kanser türlerinde etkili oldukları gösterilmiştir (Mundhenke ve ark 2002, Schimanski ve ark 2010, Tovar ve ark 2010, Youngren ve ark 2005, Zhang ve ark 2007).

Tirozin kinazlar

İnsan genom projesinin tamamlanmasının ardından bine yakın tirozin kinaz proteinin varlığı gösterilmiştir. Tirozin kinazlar hücre yüzey reseptörlerini fosforilleyerek bu reseptörlere bağlı biyokimyasal yolakları aktif hale getirirler. Tirozin kinazlar ve reseptörlerindeki mutasyonların birçok kanserde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Andrechek ve Muller 2000, Castellone ve ark 2008, Frattini ve ark 2004, Janes ve ark 1994, Meshinchi ve ark 2003, Ocal ve ark 2001, Salh ve ark 1999b, Yu ve ark 2010). Tirozin kinazların; reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve reseptör olmayan tirozin kinazlar olmak üzere iki ana grubu vardır. RTK'lar, membrana bağlı olan ve hücre dışı ligand bağlayıcı domain, transmembran domain ve oldukça iyi korunmuş hücre içi domain kısımlarından oluşan reseptöre bağlı kinazlardır. Bunlar, ligand bağlanması, hücreler arası adezyon molekülleri ya da G-protein bağlı reseptörlerin uyarılması ile aktive olurlar. Bu reseptörlerin fosforile olmuş özgün domainleri, SH2 içeren sitoplazmik adaptör ve efektör proteinler için yüksek afiniteye sahiptir. RTK'lar başlıca 4 ana gruba ayrılabilir. Sınıf I, epidermal

büyüme faktör reseptörlerini, Sınıf II, insülin benzeri büyüme faktör reseptörünü, sınıf III ise, PDGFR, makrofaj koloni uyarıcı faktör (FMS-R ya da CSF-1R), kök hücre faktör reseptörü (KIT) ve FLT3R, Sınıf IV ise FGFR reseptörlerini içermektedir. RTK'lar tüm bu sinyal yolakları ile ilişkili olarak kanser oluşumunda görev alırlar (Zwick ve ark 2002).

v-erbB ve HER-2 gibi genler bazı RTK'larla birlikte onkogen olarak da görev yapmaktadırlar (Buhring ve ark 1995, Janes ve ark 1994, Mellinghoff ve ark 2002, Waterhouse ve ark 2003, Xie ve ark 1999). EGFR üzerinde oluşan bir mutasyona bağlı olarak ligandlardan bağımsız olarak tirozin kinazların bu yolağı aktif hale getirildiği bildirilmiştir (Jones ve ark 2001, Turbov ve ark 2002). Benzer şekildeki aktivasyonlar MET, RET, c-KIT yolakları içinde gösterilmiştir (Grabellus ve ark 2010, Naka ve ark 2008a).

Yapılan kanser araştırmalarında tirozin kinazlar hedeflenerek kanser hücrelerine ilaçlar geliştirilmiştir (Brunelleschi ve ark 2002, Carlomagno ve Santoro 2005, Melillo ve Santoro 2005, Zwick ve ark 2002).

Kanser, hücre iletim mekanizmalarındaki bozukluklar sonucunda da ortaya çıkmaktadır. Bunlardan, RAS–RAF–MAPK, fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K), mTOR (mammalian target of rapamycin), JAK/STAT, Wnt–β-katenin, NOTCH gibi sinyal iletim yolaklarının birçok kanser türünde etkin olduğu gösterilmiştir (Boulikas 1995, Cho ve ark 2008a, Feng ve ark 2008, Hui ve ark 2009, Maelandsmo ve ark 1996, Matsuda ve ark 2009, Nefedova ve ark 2004, Nemoto ve ark 2004, Park ve ark 2009, Shalaby ve ark 2009).

Onkogenler

Somatik hücreler bölünme döngüsüne girmek için mitojenik sinyallere ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Büyüme faktörleri ise hücredeki çeşitli reseptörlere bağlanarak hücre döngüsünü başlatabilir ve hücrenin G_1/S arası geçişi

sağlarlar (Boulikas 1995, Polsky ve Cordon-Cardo 2003, Schafer 1998). Bu karmaşık yapı sağlıklı hücrelerde son derece korunaklı olmakla beraber kanser hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu hücre plansız bir şekilde hücre döngüsüne sürekli olarak girer ve bölünme kesintisiz bir şekilde gerçekleşir (Couzin 2005, Croce 2008, Sekido ve ark 2003). Birçok kontrol noktasının ve hücre bölünmesinde rol oynayan binlerce genin olduğu düşünüldüğünde kanserlerde karşılaşılan farklı mutasyonların aynı sonucu, yani kontrolsüz bölünme ile sonuçlanan akışı daha iyi anlaşılmaktadır.

Onkogenler proto-onkogenlerin aktif hallerine denir ve genellikle hücrenin bölünme ve büyüme hızını artırırlar. Onkogenler hücre bölünmesini düzenleyen proteinlerin sentezinden sorumlu genlerdir. Onkogenlerin büyük çoğunluğu; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri ve sinyal dönüştürücüler olarak dört büyük grupta incelenir. Bu özelliklerinin yanı sıra onkogenler, hücresel farklılaşmayı baskılar, hücre hareketliliğinde rol oynar, hücreyi apoptoza karşı duyarsızlaştırırlar (Colombo ve ark 2004, Gruber ve ark 2008, Janes ve ark 1994, Krivtsov ve ark 2009, Mackinnon ve ark 2009, Malumbres ve Barbacid 2009, Sanchez-Beato ve ark 2003, Watanabe ve ark 2009). Onkogenlerin listesi çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Önemli onkogenler bulundukları kromozomal bölgeler, kanserdeki etkileri ve bağlı bulundukları protein aileleri (Vogelstein ve Kinzler 1998).

Onkogen	Bulunduğu bölge	Etki Mekanizması	Protein ailesi
HST	11q13.3	Yapısal sentez	FGF y
INT2	11q13	Yapısal Aktivasyon	FGF
KS3	11q13.3	Yapısal Aktivasyon	FGF
v-sis	22q12.3-13.1	Yapısal Aktivasyon	PDGF
HER1/EGFR	7p1.1-1.3	Gen amplifikasyonu	EGF reseptör
HER2/NEU	17q11.2-12	Gen amplifikasyonu	EGFR
FMS	5q33-34	Yapısal Aktivasyon	CSF1 reseptör
KIT	4q11-21	Yapısal Aktivasyon	Scf reseptörü
MET	7p31	DNA düzenlenmesi/ füzyon proteini de oluşturur	HGF/SF reseptörü
RET	10q11.2	DNA düzenlenmesi	GDNF reseptör
TRK	1q32-41	DNA düzenlenmesi/ füzyon proteini de oluşturur	NGF reseptör
MAS	6q24-27	5'-UTR bölgesinin düzenlenmesi	Anjiotensin reseptörü
ABL	9q34.1	DNA düzenlenmesi/ füzyon proteini de oluşturur	Tirozin kinaz
FGR	1p36.1 -36.2	Yapısal aktivasyon	Tirozin kinaz
FES	15q25-26	Yapısal aktivasyon	Tirozin kinaz
SRC	20p12-13	Yapısal aktivasyon	Tirozin kinaz
YES	18q21-3	Yapısal aktivasyon	Tirozin kinaz
H-RAS	11p15.5	Nokta mutasyonu	GTPaz
RAS	12p11.1-12.1	Nokta mutasyonu	GTPaz
N-RAS	1p11-13	Nokta mutasyonu	GTPaz
DBL	Xq27	DNA düzenlenmesi	cdc42
VAV	19p13.2	DNA düzenlenmesi	RAS
RAF	3p25	Yapısal aktivasyon	Protein kinaz (Ser/Thr)
PIM-1	6p21	Yapısal aktivasyon	Protein kinaz (Ser/Thr)
ETS-2	21q24.3	Bozulmuş aktivite	Transkripsiyon faktörü
ERBA1	17p11-21	Bozulmuş aktivite	T3 Transkripsiyon faktörü
FOS	14q21-22	Bozulmuş aktivite	Transkripsiyon faktörü
JUN	p31-32	Bozulmuş aktivite	Transkripsiyon faktörü
c-MYC	8q24.1	Amplifikasyon/Translokasyon	Transkripsiyon faktörü
MYB	6q22-24	Bozulmuş aktivite	Transkripsiyon faktörü
BCL2	18q21.3	Yapısal aktivite	Anti-apoptotik protein

Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı gen ürünleri (proteinler) DNA hasarına karşı hücrenin koruyucu güçleridir. Yapılan araştırmalarda tümör baskılayıcı genlerin tüm genlerle kıyaslandığında sadece % 0,001 (30) civarında olduğu tespit edilmiştir. Tümör baskılayıcı gen ürünleri DNA'daki hasarı tespit ederek hücrenin kontrolsüz ve programsız bir şekilde çoğalmasını önlemek için bölünmenin başlangıcında hücrenin bölünmesini durdurup mutasyonun tamir edilmesine veya mümkün değil ise mutasyona uğramış bu hücreyi apoptoza gitmesi için uyarır (Auer ve ark 2007, Evan ve di Fagagna 2009, Georges ve ark 2009, Hwang-Verslues ve ark 2008, Mannefeld ve ark 2009, Pietenpol ve Stewart 2002, Schafer 1998, Wick ve ark 1995). Tümör baskılayıcı proteinler; mitotik döngü, DNA tamiri, transkripsiyon, apoptoz ve farklılaşma gibi önemli aşamaları kontrol ederler. Bazı tümör baskılayıcı proteinler ise hücre sinyalizasyonunu aktif hale getirecek düşük miktardaki uyarıcıların etkilerini baskılayabilirler (Fegers ve ark 2007, Lee ve ark 2010, Qian ve Chen 2010, Sangodkar ve ark 2009, Serrano 1997, Shamma ve ark 2009, Zabarovsky ve ark 2002, Zuckerman ve ark 2009). Kanser oluşumunda tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonel olarak baskılanması sonucu hücre programlanmasında dengesizlikler meydana gelir. Bazı ailesel kanserlerde bireyler tümör baskılayıcı genlerden yoksun veya defektli olarak hayata gelirler (Greene 1999, Negrini ve ark 2010).

Bütün memeli hücreleri en azından birkaç tümör baskılayıcı proteini sentezleyerek kanser oluşumunu bir miktar önlemektedir. Kanser çalışmalarında tümör baskılayıcı genlerin kalıtım modelinin ortaya çıkmasına ışık tutan hipotezlerden bir tanesi çift vuruş (two hit) hipotezidir. Bu hipotezi ortaya atan Knudson retinoblastomalardan (*RB)* yola çıkarak kanser oluşumu için en az iki mutasyonun gerçekleşmesini ön görmektedir. Buna göre ender olarak karşılaşılan ve çocuklukta ortaya çıkan ailesel retinoblastomalarda çocuklar mutasyon taşıyıcısı olarak doğarlar ve ardından yaşamsal süreç içinde ikinci mutasyona maruz kalmaları sonucu olarak retinoblastoma ortaya çıkar (Knudson 1996). Burada dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biri ise tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı

olması için onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genlerde her iki allelde defektler (homozigot mutasyon) görülmesinin gerekliliğidir.

İlk keşfedilen tümör baskılayıcı gen *RB* genidir. *RB* geni DNA'sı hasar görmüş hücrede *E2F* adı verilen transkripsiyon faktörünü bağlayarak hücrenin S fazına geçmesini engeller ve hücre *E2F* inaktif olduğu süre içinde G_1 fazında bekler (Halaban 1999, Sylvestre ve ark 2007). Bunun haricinde oluşan Rb-E2F kompleksi histondeasetilaz etkisini de artırarak DNA replikasyonunu engeller (Witt ve ark 2009).

Daha sonraki yıllarda birçok tümör baskılayıcı gen keşfedilmiştir. Bunlar arasında en öne çıkanı bir transkripsiyon faktörü olan *p53* genidir. İlk yapılan çalışmalarda yabanıl tip *p53* genin hücre bölünmesini engellediği gösterilmiştir (Lane 1992). Bunun yanı sıra homozigot mutant *p53* geninin etkisi birçok kanser türünde gösterilmiştir (Arola ve ark 2000, Barnabas ve ark 1995, Hollstein ve ark 1991, Ishii ve de Tribolet 1998, Manhani ve ark 1997, Mayerhofer ve ark 1999, Spandidos ve ark 1994, Tachibana ve ark 2000). Tümör süpresör genlerin listesi çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Tümör baskılayıcı genler, bulundukları kromozomal bölgeler ve fonksiyonları (Rami 2007).

Tümör Baskılayıcı Gen	Bulunduğu Kromozomal Bölge	Fonksiyonu
RB	13q14.1-q14.2	Hücre döngü düzenleyicisi
P53/TP53	17p13.1	Apoptoz Düzenleyici
CDKN2A/INK4A	9p21	Hücre döngü düzenleyicisi
CDKN2A/ARF	9p21	Hücre döngü düzenleyicisi
APC	5q21-q22	Sinyalizasyon
BRCA1	17q21	DNA tamiri
BRCA2	13q12.3	DNA tamiri
CDKN2C/INK4C	1p21	Hücre döngü düzenleyicisi
CDKN1B/KIP1	17p	Hücre döngü düzenleyicisi
MSH2	2p22-p21	DNA tamiri
MLH1	3p21.3	DNA tamiri
VHL	3p26-p25	Transkripsiyon uzamasından sorumlu
PTCH	9	Gelişme ve farklılaşma düzenleyicisi
PTEN	10q23.3	Sinyalizasyon
WT1	11p13	Transkripsiyon düzenleyicisi
NF1	17q11.2	Ras inaktivasyonundan sorumlu
NF2	22q12.2	Hücre iskeletinden sorumlu
TSC1	9q34	
DPC4	18q21.1	TGF-β/BMP
ATM	11q23.1	Hücre döngü düzenleyicisi
DMP1	7q21	*Arf* ekspresyonundan sorumlu

1.1.3. Tarihsel Gelişim Sürecinde Kanser Tedavi Yöntemleri

Hormon tedavisi

19. yüzyılda göğüs kanserin tedavisinde ve önlenmesinde yeni bir keşif yapıldı. 1896 yılında Thomas Beatson overler ile göğüste süt üretimi arasında bir bağ olduğunu düşünmüş ve bunu ortaya koymak için yapmış olduğu çalışmalarda tavşanların ovaryumlarını çıkardığında süt üretiminin kesildiğini keşfetmiştir. Böylece bir organın kendinden ayrı olan bir başka organ üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir. Bundan sonra, Beatson göğüs kanserli hastalarda ovaryum dokusunu almaya (ooforektomi) başladı ve ooforektominin ardından hastalarda belirli bir iyileşmenin olduğunu gözlemledi. Ayrıca ovaryumun göğüsteki karsinomdan da sorumlu olduğunu ve östrojen hormonunun göğüs kanseri üzerine olan etkisini keşfetti. Bu keşiflerden sonra da tamoksifen gibi hormon düzenleyici ilaçların göğüs kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmasına öncülük etti (Beatson 1983).

Beatson'un keşfinden yarım asır sonra Chicago üniversitesinden Charles Huggins metastatik prostat kanserinin testislerin alınmasından sonra gerilediğini göstermiştir. Daha sonraları erkeklik hormonunun prostat kanserinin tedavisinde etkin olduğu bulundu (Huggins ve Hodges 2002). Bundan sonra erkeklik hormonu salınımını baskılayan ve prostat kanserinin gelişimini durduran ilaçlar geliştirildi.

Radyasyon tedavisi

19. yüzyılın sonlarına gelinirken 1896'da alman fizik profesörü Wilhelm Conrad Roentgen X-ray'i tanıttı. Bu tanıtım bütün dünyada heyecanla karşılandı. Hemen bir kaç ay sonra X-ray kanserin tanısı için kullanılmaya sonra da kanserin tedavisi için kullanılmaya başlandı. 20. yüzyılın başından hemen sonra radyasyonun kanseri tedavi ettiği kadar kansere neden olduğu da keşfedildi.

İlerleyen teknoloji sayesinde radyasyonun sadece tümör üzerine odaklanması böylelikle sağlıklı olan hücreler üzerine olan zararlı etkisinin azaltılması başarıldı.

Bu metoda konformal radyasyon terapisi denildi. Günümüzde halen daha iyi odaklanma ve radyasyonun yan etkilerinin azaltılması yönünde birçok çalışma sürdürülmektedir. Konformal proton tanecik radyasyon tedavisi kanser üzerine en iyi odaklanma sağlayan terapi yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu teknikte X-ray ışını kullanmak yerine proton tanecikleri kullanılmaktadır (Rossi 1999).

Sterotaktik operasyon ve sterotaktik radyasyon tedavisi küçük tümörler için kullanılan ve bir kaç tekniği içinde barındıran genel itibarı ile yüksek radyasyon miktarının çok hassas olarak odaklanması ile tanımlanan bir tedavi yöntemidir. Bu teknik yaygın olarak beyin tümörlerinde kullanılır (Bova ve ark 1991, Henderson ve ark 2009, Lax ve ark 1994, Levine ve ark 2009).

Kemoterapi

II. Dünya savaşı sırasında hardal gazına maruz kalan deniz piyadelerinde kemik iliğinin baskılandığı bulundu (Green ve ark 1985, Vistica ve ark 1981). Aynı zamanlarda ABD ordusundaki bilim adamları hardal gazının etkisinin artırılması ve hardal gazından korunma gibi konular üzerinde araştırma yapıyorlardı. Bu çalışmaların kollarından bir tanesi ise nitrojen hardal (nitrojen mustard) gazı bileşimiydi. Bu bileşik hızla çoğalan kanser hücrelerinin DNA'sına zarar vererek kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğu gözlemlendi. Bu bileşik daha sonra DNA'yı alkilleyici ajan olarak literatürde yerini aldı (Andersson ve ark 1994, Ozturk ve ark 2002, Poszepczynska ve ark 2001, Smith ve Wilson 2008).

Nitrojen hardal gazının keşfinden hemen sonra folik asit ile alakalı olan aminopterin denen bileşiğin akut lösemiyi hafiflettiği gösterildi (Fraser ve ark 1950, Hart 1949, Pierce ve Alt 1948, Seaman ve ark 1950, Stickney ve ark 1948). Yapılan araştırmalar ilerledikçe aminopterin'in DNA replikasyonu için gerekli olan kimyasal yolaklardan birkaçını durdurduğu bulundu (Grignani ve ark 1974, Sirotnak ve Donsback 1975, Vesely ve ark 1961). Bu ilaç bugün sıklılıkla kullanılan metotreksat

ilacının ilk versiyonudur (Fischer 1962). Bundan sonra araştırmacılar hücre büyümesini ve bölünmesini durduran çeşitli ilaçlar üzerinde çalışmaya başladılar. Böylelikle kemoterapi kanser tedavisine dahil oldu.

Lipozomal terapi kemoterapötik ilaçların lipozomların (sentetik yağ kürecikleri) içine konarak kullanılmasına dair geliştirilen yeni bir tekniktir. Lipozom sayesinde kemoterapötik ajanlar hücrelerin içine rahatlıkla nüfuz ederek ilacın etkisini artırmışlardır. Doksorubisin ve metotreksat'ın lipozomlarla kapsüllendikten sonra kullanılması lipozomal terapinin öncü çalışmaları olmuştur (Forssen ve Tokes 1983, Gabizon ve ark 1982, Todd ve ark 1980, Woo ve ark 1983).

Cerrahi müdahalenin ardından kalan az sayıdaki kanser türlerinin kemoterapi uygulanarak öldürülmesi yardımcı tedavi olarak nitelendirilir. Yardımcı tedavi ilk olarak göğüs kanserinde denendi ve etkili olduğu gözlemlendi ardından kolon, testis ve diğer kanser türlerinde de başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Biyolojik tedavi

20. yy. sonları ve 21. yy başlarında artan kanser araştırmaları kanserin oluşumunda önemli rol alan biyokimyasal yolakları çözülmesi ile kanserin tedavisinde; hücrelerin büyüme, bölünme ve apoptozu uyaran biyolojik ajanları taklit eden sentetik ajanların kullanılmasına yol açmıştır. Bu sentetik ajanlarla yapılan tedaviye biyolojik yanıt değiştirici tedavi (BRM-biological response modifier) denir. Yapılan klinik denemeler bu tedavi şeklinin oldukça faydalı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Chauhan ve ark 2009a, Chauhan ve ark 2009b, Deodhar ve ark 1982).

Vücutta doğal olarak oluşan interferonlar, interlökinler, sitokininler gibi moleküllerin yanı sıra 2000'li yıllardan itibaren miRNA'larında keşfiyle kanserle mücadelede bu biyolojik ajanlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu ajanlar kanser hücrelerini bertaraf etmenin yanı sıra sağlıklı hücrelerin korunmasını sağlamak amacıyla yönlenilen alternatif tedaviler için kullanılması hedeflenmiştir.

Monoklonal antikorlar laboratuarlarda üretildikten sonra kemoterapötik ajanlara kılavuzluk yapmak için kullanılmıştır. Monoklonal antikorlar kanser hücresinde bulunan yüzey proteinlerine özgü üretilerek kemoterapötik ajanlara bağlanarak ilaç hedefleme sistemi amacıyla kullanılmıştır (ElBayoumi ve Torchilin 2008, Pan ve ark 2008, Sawant ve ark 2008).

1.1.4. Kanserin Sınıflandırılması ve Kordoma

Klinik olarak doğru kanser sınıflandırılması tümörün tanımlanması, gelişim basamaklarının anlaşılması ve sonrasında uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesinde çok önemlidir.

Tümör türleri

Tümörler iyi ve kötü huylu olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Bunlardan iyi huylu (Benin)tümör, başladığı dokuda kalıp olduğu bölgede büyümeye devam eder. Çok büyük hacimlere ulaşabilir. Genellikle hayati tehlike arz etmez. Cerrahi müdahale ile bazen de radyasyon terapisi ile tedavi edilebilir. Kötü huylu (malin) tümör, ise iyi huylu tümöre nazaran çok daha tehlikeli ve öldürücüdür. Geliştiği dokunun haricinde diğer dokulara yayılabilir. Buradan gelişen kanser hücreleri kan ve lenf dolaşımına geçebilirler. Gittikleri bölgede yeni malin tümörler oluşturabilirler.

Amerikan kanser komitesi TNM sınıflandırma sistemini esas kabul etmektedir ve bu sınıflama yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna göre T tedaviye başlanmadan önceki tümör büyüklüğünü, N tümörün lenf nodlarına nüfuz edip etmediğini ve son olarak M ise tümörün metastaz yapma durumunu izah etmek için kullanılmaktadır.

Bu bilgiler ışında yapılan değerlendirmelerde 2002 yılı sonrasında kordoma kemik tümörleri içerisine dahil edilmiş IA T1 N0 M0 G1,2 düşük dereceli fakat malin tümör olarak belirlenmiştir.

1.1.5. Gen Ekspresyon Analizine Bağlı Tümör Profillemesi

Klasik olarak kanser sınıflandırılmasında ve derecelendirilmesinde tümörün köken aldığı doku, tümörün morfolojisi ve metastaz durumuna dikkat edilirken günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte yeni yöntemler kanser sınıflandırılması için kullanılabilir hale gelmiştir. Bazen benzer morfolojik verilere sahip tümörlerin klinik verileri ve tedaviye karşı verdiği yanıtlar oldukça farklı olabilmektedir. Mikroçip ile yapılan protein ekspresyon analizi ve mutasyon analizlerine bağlı olarak yapılan kanser sınıflandırılması tedaviye yönelik yeni bir bakış açısı kazandırmıştır.

Belirli kanser fenotiplerinin tanımlanması; kontrol edilemeyen bölünme, apoptoza karşı direnç ve total gen ekspresyonu etkileyen değişimlerin tanımlanmasında gen ekspresyon analizi kullanılmaktadır.

Gen ekspresyon profiline bağlı olarak patolojik alt grupları belirlemek için yapılan ilk çalışmalar lösemi ve lenfomada gerçekleştirilmiştir (Golub ve ark 1999). Golub ve arkadaşları (1999) akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalıklarında mikroçip ile gen ekspresyon analizi yaptılar. Bu analize bağlı olarak AML ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) sınıflarının bilinmesine bağlı olarak iki farklı gruba ayırdılar. İlaveten AML'leri ALL'lerden ayırt eden 50 tane gen tespit edildi. Bu çalışma gen ekspresyon analizinin ilk olarak kanser sınıflandırılmasında kullanılabileceğini gösterdi.

Kanserlerin gen ekspresyonuna bağlı sınıflandırılması 2000'li yıllarda oldukça popüler hale gelmiş bununla alakalı birçok çalışma yapılmıştır (Alizadeh ve ark 1999, Alizadeh ve ark 2001). Bu yıllarda yapılan bir başka çalışmada ise hastaların klinik verilerinin ve tedaviye karşı verdikleri yanıtların çok farklı olduğu bilinen diffüz büyük B hücre lenfoması (DLBCL) hasta grupları üzerinde yapılmış ve gen ekspresyon profiline bağlı olarak iki farklı grup bulunmuştur (Alizadeh ve ark 2000). Daha sonraki çalışmalar ile gen ekspresyon analizine bağlı sınıflandırma lösemi ve lenfomalarla sınırlı kalmamış meme kanserli hasta gruplarında da yapılmış

ve ekspresyon analizine bağlı olarak farklı gruplar ortaya çıktığı gösterilmiştir (Hedenfalk 2002, Hedenfalk ve ark 2002).

Bu yöntemin keşfedilmesiyle birlikte birçok araştırma grubu yönlerini çeşitli kanser türlerinin gen ekspresyon analizi ile profillenmesine çevirmiştir. Yapılan çalışmalar kanserin moleküler mekanizmasının da daha iyi anlaşılması sağlanmıştır. Ayrıca kanserde rol oynayan genlerin aydınlatılması ve genler arasındaki biyokimyasal yolakların ortaya konması konusunda da çalışmalar devam etmektedir.

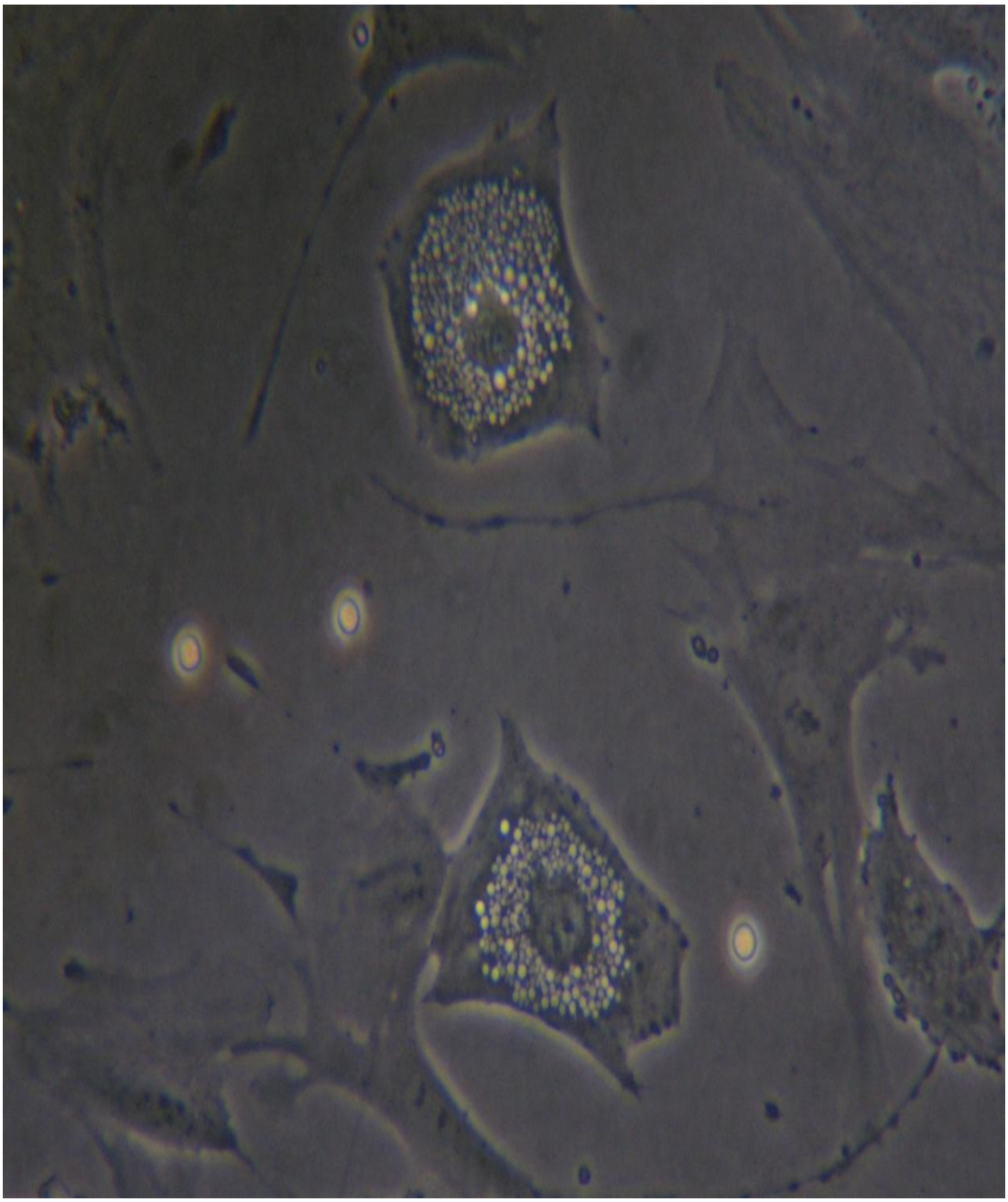
Gen ekspresyon analizine bağlı olarak yapılan profillemede klinik verilerle uyumlu çok başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen mikroçip yönteminde çeşitli kısıtlamalar ile karşı karşıya kalınmıştır. Örneğin heterozigotluğun kaybı (LOH-lost of heterozygosity) durumu kanserde önemli bir veridir ve verinin mikroçip teknolojisiyle belirlenmesi şimdilik mümkün olmamaktadır. Diğer taraftan, gen ekspresyon analizine bağlı sınıflandırma çok hassas olmasına rağmen DNA'sı izole edilen dokunun da heterojenliği bu yöntemin çıkmazlarından biridir. Bu tür problemleri aşmak içinse DNA'sı izole edilen dokunun siber bıçak teknolojisi kullanılarak alınması öngörülmüştür (Maitra ve ark 2001).

1.2. Kordoma

Kordoma ilk olarak 1856 yılında Virchow tarafından tanımlanmış olup klivus'da görülen bir tümör olarak nitelendirilmiştir. Daha sonra 1857 yılında bu tümörün kıkırdaktan köken aldığını düşünerek Virchow bu lezyonları ecchondrosis physaliphora spheno-occipitalis olarak isimlendirilmiştir. İlk mikroskobik bulgularda bu tümör hücrelerinin vakuoller içerdiğini gözlemlemiştir. Ardından Müller 1858 yılında bu tümörün embriyonik korda dorsalis'den köken aldığını göstermiştir. 1894 yılında ise Müllerin teorisini deneysel olarak gösteren Ribbert tarafından kordoma olarak isimlendirilmiştir (Casali ve ark 2007).

SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) tarafından açıklanan bilgilere göre yıllık kordoma görülme olasılığı 100.000'de 0,08 olarak açıklanmıştır. Ayrıca yine aynı verilerden yola çıkılarak kordomanın erkeklerde görülme sıklığının kadınlara nazaran yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (McMaster ve ark 2001). Kordomalar ender karşılaşılan aksiyel iskelet üzerinde oluşan bir çeşit kemik tümörüdür. Kordoma aksiyel iskelet üzerinde %32 kranial %32,8 spinal ve % 29,2 oranında sakrumda oluştuğu bildirilmiştir (Papagelopoulos ve ark 2004).

Kordomaların biyolojik özellikleri değişiklik göstermesine rağmen genellikle genç yaşlarda görülenlerin daha hızlı büyüme seyri izledikleri bildirilmiştir (Mendenhall ve ark 2005). Çoğunlukla kordomalar musin salgılayan lobüle, gri ve saydam solid kitlelerdir. Bu özellikleriyle kıkırdak tümörlerine benzerlik gösterirler. Kordoma yapısal özellikleri itibariyle kemikleşmiş veya kalsifiye olmuş olabilir. Bu açıdan tümör kitlesi miksoid, yumuşak olabildiği gibi sert yapılı kitleler de görülmektedir. Bu tümörler yumuşak doku içinde oluşturulan yalancı kapsül içinde olduklarından dolayı toplu olarak görülürken kemik içerisinde multifokal bir yapı izlenir. Mikroskobik olarak fizaliferöz (sitoplazmik vakuollere sahip) hücrelerden oluşan kordoma iğsi hücre morfolojisine sahip hücreler de barındırırlar (Resim 1.1) (Sundaresan ve ark 2009).



Resim 1.1. Primer kordoma kültürlerine ait fizaliferöz hücre yapısı (100X büyütme).

Ayrıca yaşlıların omurgalarında oluşan bu tümörün MIB-1 indeksinin düşük olduğu ve bu tümörlerde apoptoz indeksinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Kilgore ve Prayson 2001, Naka ve ark 2003). Bununla birlikte tekrarlayan tümörlerde ise MIB-1 indeksinin yüksek apoptoz indeksinin de yüksek olduğu gösterilmiştir (Kilgore ve Prayson 2001, Naka ve ark 2003). Kordomaların oldukça yavaş büyüyen ve lokal invazyon gösteren bir yapısı vardır (Ahlhelm ve ark 2005).

Notokord mezodermden köken alan ve bütün omurgalı canlıların embriyonal aşamasında mevcut olan fakat insan gibi yüksek organizasyonlu canlılarda yaşamsal süreç içerisinde yerini vertebralara bırakan bir yapıdır (Casali ve ark 2007). Normal olarak omurların *Nükleus pulposus*, *Annulus fibrosus* ve intervertebral *disk* olmak üzere 3 bileşeni vardır (Humzah ve Soames 1988). Notokordun nükleus pulposus hücrelerinden oluştuğu hipotezi 1950'li yıllara kadar gitmektedir (Rufai ve ark 1995). Fareler üzerinde 2008 yılında yapılan bir çalışmada nükleus pulposus hücrelerinin embriyonal notokord'dan köken aldığı gösterilmiştir. Bu yapılan çalışmada kordomanın da nükleus pulposus hücrelerinden köken aldığını gösteren kanıtlar ortaya konmuştur (Choi ve ark 2008).

Kordomalar kemoterapiye ve radyoterapiye karşı oldukça dirençlidir (Carrabba ve ark 2008, Dehdashti ve ark 2008, Foweraker ve ark 2007, Hasegawa ve ark 2007b, Igaki ve ark 2004, Karger ve ark 2006, Rhomberg ve ark 2006). Bu yüzden kordomaların tedavisinde radikal cerrahi yöntemlerinin çok daha etkili ve tedavi edici olduğu düşünülmektedir (Bailey ve ark 2006, Cho ve ark 2008b, Fatemi ve ark 2008, Hasegawa ve ark 2007a, Hasegawa ve ark 2007b, Henderson ve ark 2009, Jiang ve ark 2009, Krishnan ve ark 2005, Liu ve ark 2008, Noel ve ark 2004). Yapılan araştırmalarda kordoma hastalarının yaşam süreleri ortalama 6 yıl olarak belirlenmiş olmakla beraber ilk beş yılda yaşama oranı %70 iken onuncu yılının ardında bu oranın %40'lara kadar indiği bildirilmiştir (Casali ve ark 2007).

Yapılan çalışmalar kordomanın moleküler biyolojisini tam olarak ortaya koymaya yetmemiştir. In-vitro olarak kültüre edilebilen hücre hatlarının sayısının

çok az olması kordomayı günümüzde dahi anlaşılmasını güçleştirmektedir. Kordoma hücre hatlarının üretilmesi ve karakterize edilmesi kordomanın moleküler alt yapısının aydınlatılmasında oldukça önemli adımlar olacaktır. Kordomalar genel itibarıyla düşük dereceli tümörler olmasına rağmen bazı hastalarda agresif olabildikleri gibi metastaz yapabilmektedirler. Literatürde akciğere, kemiğe ve karaciğere metastaz yaptıkları gösterilmiştir (Auger ve ark 1994, Guedes ve ark 2009, McPherson ve ark 2006, Perasole ve ark 1991).

Kordomaların çoğu genellikle sporadik olmasına rağmen literatürde ailesel geçiş olduğu gösterilen vakalar da mevcuttur (Almefty ve ark 2009, Bayrakli ve ark 2007, Bhadra ve Casey 2006, Stepanek ve ark 1998, Yang ve ark 2001, Yang ve ark 2009).

1.2.1. Kordomaların Patolojisi

Kordoma ender karşılaşılan ve tüm kemik tümörleri arasında görülme oranı %2–4 arasında olan birincil kemik tümörüdür. Bütün intrakranial tümörler arasında ise görülme oranı % 0,1–0,2 arasında değişmektedir. Kordoma, 2002 yılındaki dünya sağlık organizasyonunun yapmış olduğu patolojik sınıflandırmada düşük-orta dereceli malign tümör olarak tanımlanmıştır (Mirra JM 2002). Kordoma aksiyel iskelette ve çoğunlukla sakral omurlarda görülür. Makroskopik olarak çok lobüllü mavi-gri renkte ve jelatin yapılıdır. Mikroskobik olarak muko-miksoid yapıda lobüllerden oluştuğu gözlemlenmiştir (Romeo ve Hogendoorn 2006).

Aksiyel iskelet kemik, kıkırdak, fibrokıkırdak, notokord, merkezi sinir sistemi yağ dokusu ve düz kas gibi birçok dokudan oluşmuştur. Aksiyel iskelet üzerinde oluşan herhangi bir tümör bu dokuların herhangi birinden kaynaklanabilir. (Chugh ve ark 2007) Kafa ve omurlarda en sık görülen benin kemik tümörü hemanjiomadır. Bununla birlikte en sık görülen malin kemik tümörü ise kordomalardır. Kordoma genellikle tüm yaş gruplarında görülmesine rağmen 50-60'lı yaşlarda daha sık görülmektedir (McMaster ve ark 2001).

Kordoma patolojik olarak klasik, kondroid ve dediferensiye olarak 3 alt gruba ayrılır.

Klasik kordoma lobüler bir yapı gösterir ve etrafındaki yumuşak dokudan belirgin bir şekilde ayrılır. Tümörün büyüklüğü oldukça değişken olmakla birlikte en büyük tümörlere sakrumda rastlanılmıştır (Jeanrot ve ark 2000, Osaka ve ark 2006, Sung ve ark 2005). Klasik kordomalarda hücre tipi sitoplazmik vakuol içeren hücrelerle kendini belli eder fakat bu hücre morfolojisinin yanı sıra iğsi yapıda hücrelere rastlamakta mümkündür (Oconnell ve ark 1994). Mitoz oranı düşük olmakla birlikte nekroz odakları da görülebilir. İmmunohistokimyasal olarak klasik kordoma keratin ve bazı epiteliyal belirteçleri eksprese eder. Özellikle kalsiyum bağlama proteini olan S-100 ile boyanır (Barnes 1991, Oconnell ve ark 1994).

Kondroid kordoma, klasik kordoma gibi benzer özellikler göstermesine rağmen bazı bölgelerde düşük dereceli kondrosarkom özelliklerini de taşır. Bu açıdan klasik kordomaya nazaran daha ılımlı prognozu gösterir. Kondroid kordoma daha sık olarak kafa tabanında görülür (Wenig ve ark 1985, Wojno ve ark 1992).

Dediferensiye kordoma en az görülen kordoma türüdür. Klasik kordoma ve yüksek dereceli iğsi hücre sarkom bölgeleri içerir. Çoğunlukla sakrokoksiyal bölgede görülür. Rekürens oranı daha yüksektir (Bisceglia ve ark 2007, Ridenour ve ark 2010).

1.2.2. Kordomaların Tanısı

Kordomalar sitokeratin 8, 18 ve 19, ayrıca epiteliyal membran antijeni ve S-100 proteinlerini üretirler (Hayashi ve ark 1991, Johnson ve Nagle 1984, Nakamura ve ark 1983, Walker ve ark 1991). Bununla birlikte bu veriler kordomaların kondrosarkomlardan ayrılması için yeterli olmamıştır. Mezenkimal tümörlerin gen ekspresyonu analizi için yapılan bir çalışmada araştırmacılar kordomaların diğerlerinden farklı olarak notokordda sentezlendiği bilinen bir proteinin

kordomalarda da sentezlendiğini gösterdiler (Henderson ve ark 2005). Yapmış oldukları bu çalışmanın ardından 2006 yılında *Brachyury* geninin kordomalarda oldukça fazla miktarda sentezlendiğini gerek mikroçip ve gerekse immunohistokimyasal olarak gösterdiler. Elde edilen bu bulgular sayesinde kıkırdak tümörleri ile kordomalar net bir şekilde ayrıldığı gibi kordomaların notokordal kökenli olduğu ispat edilmiştir (Romeo ve Hogendoorn 2006, Vujovic ve ark 2006). *Brachyury* Yunancadan köken alır ve kısa kuyruk anlamına gelir (Kavka ve Green 1997). *Brachyury* T-kutusu transkripsiyon ailesinin bir üyesi olup embriyonal devrede mezoderm gelişimde önemli roller üstlenir (Beddington ve ark 1992, Fehling ve ark 2003). İlk olarak 1991 yılında klonlanmıştır (Herrmann, 1991). *Brachyury*'nin farelerde kuyruk oluşumunda önemli roller üstelendiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Beddington ve ark 1992, Herrmann 1991, Stott ve ark 1993). Son yıllarda, *Brachyury*'nin embriyonik kök hücrelerde varlığı üzerinde durulmuş ve kök hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Christoforou ve ark 2008, Paige ve ark 2010, Schubert ve ark 1995). Tüm bunların haricinde diğer bazı teratomlarda da *Brachyury* ekspresyonuna rastlanmıştır (Park ve ark 2008, Sangoi ve ark 2009, Takei ve Powell 2010).

Kordomalar ve nükleus pulposus hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise CD24 antijenin yüksek miktarda üretildiği gösterilmiştir (Fujita ve ark 2005). Bu çalışma ile kordomanın köken aldığı hücrelerin nükleus pulposus hücreleri olduğu hipotezi biraz daha güç kazanmıştır. Tüm bu bulguların ardından daha öncede bahsedildiği üzere 2008 yılında yayımlanan çalışma kordomanın köken aldığı hücreler hakkında kuşku götürmeyecek bilgiler ortaya koymuştur (Choi ve ark 2008).

Yapılan tüm bu çalışmalar sayesinde kordomanın moleküler tanısı için yeni belirleyici proteinler ortaya konulmuş ve bu sayede literatürde kondrosarkomlar gibi kordomaların sıklıkla karıştırıldığı vakalar azalmıştır. Kordomaların tanısı için kullanılan belirteçlerin listesi çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Kordomalarda yüksek ekspresyon gösteren genler, bulunduğu kromozomal bölgeler ve bu genlerin kordomalardaki varlığını gösteren kaynaklar.

Gen İsmi mRNA kodu	mRNA nükleotit kodu	Kromozomal Bölge	Literatür
EMA	NM_002456	1q21	(Walker ve ark 1991)
Galektin-3	NM_002306	14q22.3	(Gotz ve ark 1997)
E-kaderin	NM_004360	16q22.1	(Naka ve ark 2001)
Vimentin	NM_003380.2	10p13	(Niwa ve ark 1994)
CD24	NM_013230	6q21	(Oakley ve ark 2008)
CD44	NM_000610.3	11p13	(Saad ve Collins 2005)
Sitokeratin-19	NM_002276	17q21.2	(Walker ve ark 1991)
c-met	NM_001127500	7q31	(Naka ve ark 1997)
Brachyury	NM_003181	6q27	(Romeo ve Hogendoorn 2006)

1.2.3. Kordoma Sitogenetigi

Kordomalar sitogenetik açıdan incelenmiş ve klasik G bantlama yöntemi, genomik kıyaslama (CGH) ve floresan in-situ hibridizasyon teknikleri de kullanılarak kromozomal seviyedeki anomaliler ortaya konmuştur (Bayrakli ve ark 2007, Hallor ve ark 2008, Kuzniacka ve ark 2004, Scheil ve ark 2001). Yapılan bu çalışmalarda yaklaşık 100 kadar vaka kullanılmıştır. Literatürde kordomalardaki sitogenetik anomali ilk olarak Persons tarafından gösterilmiştir (Persons ve ark 1991). Bu çalışma için sadece iki vaka kullanılmış olup her ikisinde de çeşitli kromozomal anomaliler gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda kromozomlarda birçok anomali gösterilmesine karşın kordomalar için belirleyici bir anomali saptanamamıştır. En tutarlı sonuçlar olarak 2001 yılı içerisinde yapılan CGH çalışması ile gösterilmiştir (Scheil ve ark 2001). Bu çalışmada CGH yöntemi ile karyogramı yapılmış 16 vakanın bulgularına göre kordomaya spesifik bir bölge tespit edilememiştir (Scheil ve ark 2001). Diğer taraftan, 2000 yılı içerisinde yapılan 5 sporadik ve 4 ailesel geçiş izleyen vaka üzerinde yapılan çalışmada 1p36 bölgesinde dublikasyonların olduğu gösterilmiştir (Miozzo ve ark 2000). 2005 yılında 6 kordoma vakası üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise CGH ve interfaz FISH yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçta 3 tümörde 1q23~q24, 7p21~p22, 7q ve 19p13 bölgelerinde duplikasyonlar gözlemlenmiştir. Bunlardan sadece 7. Kromozomlar üzerindeki anomaliler interfaz FISH yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır (Brandal ve ark 2005).

1.2.4. Kordomanın Ailesel Geçişi

Literatürde kordomanın ailesel geçiş izleyebildiği yönünde yapılan çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu konuda ilk bulgular, 1998 yılında rapor edilmiş İskoçyalı bir ailenin iki kuşağında rastlanan 4 vaka (Stepanek ve ark 1998) ve 1999 yılında ailesel kordoma olduğu söylenen 2 vaka üzerinde yapılan sitogenetik araştırmalardır (Dalpra ve ark 1999, Stepanek ve ark 1998). Bu çalışmaların ardından 2001 yılında linkage analizi kullanılarak yapılan bir çalışmada kordomalardaki

ailesel geçiş için 7p33 bölgesinin önemli olabileceğini belirten bir çalışma yayınlanmıştır (Kelley ve ark 2001, Yang ve ark 2001). Buna ilave olarak ailesel geçiş izleyen kordomalar için 7p33 ve 1p36 bölgeleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Kelley ve ark 2001, Yang ve ark 2001). Mevcut bulgular ışığında kordoma ile ilişkilendirilmiş spesifik bir kromozomal bölge tanımlanmamıştır.

1.2.5. Kordomaların Tedavisi

Kordomalar kemoterapilere karşı oldukça dirençlidirler. Literatürde agresif kordomalara karşı kullanılan bazı kemoterapötik ajanların küçük çaplı etkileri gösterilmesine karşın yapılan çalışmalarda incelenen vaka sayısı oldukça azdır. Bu nedenle elde edilen bu bulguya şüphe ile bakılmaktadır (Fleming ve ark 1993). Yapılan çalışmalarda bu tümörden alınan dokularda yüksek miktarda platelet büyüme faktörü reseptörünün (PDGFR) ve onun aktif formu olan fosforlanmış şeklinin olduğunu gösterilmiştir (Tamborini ve ark 2006). Bu sonuçlardan yola çıkılarak halen daha faz çalışmaları devam eden tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib kordomanın tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (Casali ve ark 2004, Orzan ve ark 2007). Yapılan bu çalışmalarda, imatinibin kordomaların en azından metastaz yapma oranını düşürdüğünü ve prognozu daha iyi hale getirdiğini göstermişlerdir (Casali ve ark 2005). Bunun haricinde kordomalarda setuksimab, gefitinib ve talidomid kullanılmış fakat hasta sayısı az olduğu için güvenilir sonuçlar elde edilememiştir (Hof ve ark 2006, Schonegger ve ark 2005). 2009 yılında kordomanın moleküler temellerinin aydınlatılması için yapılan diğer bir çalışmada ise kordomalarda mTOR (mamalian target of rapamycin) yolağının aktive edildiği bunun sonucu olarak da rapamisin veya analoglarının kordomanın tedavisinde rol oynayabileceği savunulmuştur (Presneau ve ark 2009). Fakat bu fikri destekleyen çalışmalar literatürde bulunmamaktadır.

Kordomalar üzerinde sadece kemoterapötik ajanlar değil aynı zamanda çok çeşitli radyoterapiler de uygulanmıştır. Literatüre bakıldığında sakral ve kafa tabanında oluşan kordomalar için karbon iyon radyoterapi uygulamaları mevcuttur

(Brackmann ve Teufert 2006, Combs ve ark 2009, Schulz-Ertner ve ark 2007). Sonuç olarak bu çalışmalarda varılan nokta tümörün büyümesi durdurulsa bile yok edilmesinin mümkün olmadığıdır (Mizoe ve ark 2009). Karbon iyon radyoterapinin haricinde proton tedavi ve varyasyonları da hastalar üzerinde uygulanmıştır (Cho ve ark 2008b, Foweraker ve ark 2007, Jereczek-Fossa ve ark 2006, Noel ve ark 2005, Weber ve ark 2007). Bu alanda odaklanmış siber bıçak (cyber knife), gamma bıçak (gamma knife) (Hasegawa ve ark 2007b, Henderson ve ark 2009, Hug ve ark 2002, Liu ve ark 2008, Marucci ve ark 2004) radyoterapi uygulamaları da kordomalar üzerinde denenmiş ve umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalarda varılan ortak sonuç kordomalar üzerinde yüksek dozlarda uygulanan radyoterapilerin etkinliği söz konusu olmakla birlikte fayda-zarar denge verileri ışığında vakaya yönelik uygulamaların daha doğru olacağı yönündedir.

Tüm bu gelişmeler çerçevesinde kordomanın en etkin tedavisinin cerrahi yöntemlerle (en bloc) tümörün alınması olduğu düşünülmektedir.

1.2.6. Kordomanın Moleküler Biyolojisi

Kordoma çok eskiden beri bilinmesi karşın diğer kanser türlerinin aksine üzerinde yapılan moleküler biyoloji temelli çalışmalar oldukça azdır. Günümüze kadar yapılan araştırmalardan yola çıkılarak kordomaların oluşumundaki temel yapılar ortaya net olarak ortaya konmamıştır.

Kordomalar üzerinde yapılan ilk moleküler temelli çalışma 1997 yılında yapılmış olup 7 vakadan elde edilen dokulardan DNA izolasyonu yapılarak tümör baskılayıcı bir gen olan *RB* genindeki mutasyonlar araştırılmış ve sonuç olarak iki vakada *RB* genin 17. İntron bölgesinde heterozigotluğun kaybı (LOH-Loss of Heterozygosity) belirlenmiştir (Eisenberg ve ark 1997). Yine aynı yıl yapılan, fakat bu defa bir onkogen olan c-Met (karaciğer büyüme faktörü) üzerinde yapılan çalışmada kordomalarda c-Met genin fazla eksprese olduğu gösterilmiştir (Naka ve ark 1997). 2001 yılında yapılan bir çalışmada, yüzey tutunma proteinleri (CAM-cell

adhesion molecule) olan E-kaderin, alpha-katenin, beta-katenin, gamma-katenin ve nöral hücre tutunma molekülü olan NCAM'in kordomalarda büyük ölçüde eksprese edildiği gösterilmiştir (Naka ve ark 2001). Bu aşamadan sonra kordomalarda malign tümör oluşumunda önemli bir etken olarak görülen galektin-3 proteinin varlığı da başka bir çalışmada ortaya konmuştur (Juliao ve ark 2002).

Kordomalarda görülen lokal invazyonu açıklayan bir çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda kordoma dokularında yüksek miktarda MMP-1(matriks metallo proteinaz), MMP-2, TIMP-1 ve katepsin-B'nin varlığına rastlanmıştır. Bu bulgulardan yola çıkılarak kordomanın bulunduğu bölgede hücre dışı ortamı yıkarak hücrelerin hareketliliğini sağladığı gösterilmiştir (Naka ve ark 2008b).

Kordoma üzerine yapılan çalışmalar arttıkça hücre döngüsü üzerinde etkili olan proteinlerin ekspresyonu araştırılmaya başlamış, ilk olarak da hücre döngüsü üzerindeki etkisi daha önce bahsedilen siklin D1 proteinin yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir (Kilgore ve Prayson 2001). Tümör baskılayıcı genlerin kordomalardaki durumlarının araştırıldığı bir çalışmada ise TSC1 (tuberosklerosis kompleks) ve TSC2 genlerinin kordomalarda inaktif olduğu gösterilmiştir (Lee-Jones ve ark 2004).

Birçok kanserde varlığı gösterilen c-Met, ve epidermal büyüme faktör reseptörünün (EGFR) kordomalarda yüksek miktarda sentezlendiği c-Erb-b2 (HER2/neu)'nin ise farklı seviyelerde sentezlendiği gösterilmiştir (Weinberger ve ark 2005). Bu çalışmadan yola çıkılarak kordomanın tedavisinde erlotinib (tarceva) kullanılmıştır (Loehn ve ark 2009, Singhal ve ark 2009).

Tirozin kinazlar anlatılırken bahsedilen platelet büyüme faktör reseptörünün (PDGFR) kordomalarda yüksek miktarda hem de fosforile edilmiş (aktif) olarak bulunduğunun tespiti kordomaların tedavisi için yeni kemoterapötik ajanların kullanılmasına yol açmıştır (Casali ve ark 2004, Lagonigro ve ark 2006, Negri ve ark 2007, Tamborini ve ark 2006).

Daha önce de bahsi geçtiği üzere epidermal büyüme faktörü ve reseptörü oldukça fazla miktarda kordomalarda sentezlendiği gösterilmişti. Araştırmacılar bu sonuçlardan yola çıkarak EGFR'ın uyardığı yolağının kordomalardaki durumuna bakmışlar ve sonuç olarak Akt-mTOR-S6K/4E-BP1 biyokimyasal yolağın kordomalarda oldukça aktif olduğunu göstermişlerdir (Dobashi ve ark 2009, Schwab ve ark 2009).

Son on yılda kordomanın moleküler mekanizmasının aydınlatılması üzerine yapılan çalışmalarda önemli yol kat edilmesine rağmen günümüzde halen net olarak bu mekanizma çözülmemiştir.

1.3. MikroRNA

Gen ekspresyonunun translasyon sonrası düzenlenmesinde küçük RNA parçaları tarafından müdahale edilerek genlerin baskılanmasının tanımlanması hücre biyolojisi tarihinin en önemli keşiflerinden biridir. İlk olarak bu küçük RNA parçalarının bir genin baskılamasının gösterilmesi petunya bitkilerinde olmuştur. Bu çalışmada petunya hücrelerine, dışarıdan verilen nükleik asit dizilerinin aktarımı (transfeksiyon) sonucunda, aktarılan bu nükleik asit dizisinin benzeri dizilimi içeren genin baskılandığı gösterilmiştir (Napoli ve ark 1990). Andrew Fire ve Rob Mello, *Ceanorhadbitis elegans* üzerinde yaptıkları çalışmada translasyon sonrası meydana gelen gen ekspresyon düzenlenmesinin mekanizmasını buldular. Bu sonuçlara göre gen ekspresyonunun düzenlenmesinde RNA interferansı (RNAi) adını verdikleri küçük RNA parçalarının sorumlu olduğunu gösterdiler (Fire ve ark 1998). RNAi'nın mekanizmasının açıklandığı bu ilk çalışmada, çift zincirli RNA taşıyan virüslere karşı bir hücresel immün tepki olduğu öngörülüyordu. Buna göre, hücreye dışarıdan gelen bu çift sarmal RNA yabancı olarak görülüyor; işlenerek kısa parçalara ayrılıyor ve RNAi'lere (siRNA) dönüştürülüyordu. RNAi'ler daha sonra kendi dizilimine benzer dizilime sahip mRNA'lara bağlanarak onların parçalanmasını sağlıyorlardı. Bu mekanizma sayesinde virüs replikasyonunun gerçekleşmesi için gerekli proteinlerin sentezlenmesi önleniyordu.

mikroRNA'lar, 20-25 nükleotid uzunluğunda, iç kaynaklı küçük RNA moleküllerinin geniş bir sınıfını oluştururlar (Ambros 2001, Bartel 2007, Carrington ve Ambros 2003). Tüm öncül miRNA'lar yüksek minimal katlanma serbest enerjisiyle (MFEI) (Zhang ve ark 2006e), ikincil saç tokası yapısında bulunur (Ambros 2001, Bartel 2007, Carrington ve Ambros 2003). Hayvanların (Pasquinelli ve ark 2000) ve bitkilerin (Floyd ve Bowman 2004, Zhang ve ark 2006c) bazı türleri arasında miRNA'lar oldukça korunmuştur.

Yapılan araştırmalarda kodlanmayan küçük RNA parçalarının bazı genler üzerinde baskılayıcı etkileri gösterilmiştir. Lee ve arkadaşları 1993 yılında tarafından keşfedilen küçük bir RNA parçasının, lineage-deficient-4 (lin-4), gen sekansına neredeyse mükemmel bir benzerlik gösterdiğini buldular. *C. elegans* üzerinde yapılan bu çalışmada iç kaynaklı (endojenik) küçük bir RNA parçasının (lin-4); post-embriyonik gelişme için gerekli bir proteini kodlayan lin-14' genin translasyonunu genin 3′ bölgesinde bulunan ve translasyona uğramayan bölgesiyle (3′-UTR) RNA-RNA etkileşimi sayesinde translasyonu düzenlediği gösterilmiştir (Lee ve ark 1993). O zamanlarda bu çalışma bilim adamların fazla ilgisini çekmemiş, çoğu araştırmacı bu bulguların solucan genetiğindeki bir gariplik olarak değerlendirmiştir. Daha sonra bu çalışmayı destekler nitelikte olan ve yine *C. elegans* üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise let–7 genini baskılayan küçük kodlanmayan RNA parçalarının varlığı gösterilmiştir (Reinhart ve ark 2000). Endojen küçük RNA'ların, haberci RNA'ların (mRNA) translasyonunu baskıladığı hipotezi yapılan araştırmalarla desteklenmiş ve "mikroRNA" terimi Science dergisinde yayınlanan bir dizi makalede önerilmiş ve kabul görmüştür (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001).

miRNA'lar, genomdan kodlanan ve ürün olarak bir polipeptidi şifrelemeyen, yeni küçük RNA ailesinin bir üyesidir. Kodlanmayan RNA'lar ailesinin Piwi-interacting RNA (Aravin ve ark 2007) ve endojen siRNA (Lee ve ark 2006) gibi transpozonları mutasyonu önlemek amacıyla susturan yeni üyeleri de keşfedilmiştir.

Hızla gelişen miRNA araştırmalarının bir göstergesi miRBase isimli miRNA girişlerinin ve bilgilerinin tutulduğu dizi veritabanıdır (Griffiths-Jones ve ark 2008).

miRNA'lar gen ekspresyonunu hedef mRNA'lara direk bağlanarak ya da hedeflenmiş mRNA'ların hayvanlardaki 3'-UTR bölgelerinde mükemmel ya da mükemmele yakın eşlenmesi sayesinde translasyonunu inhibe ederek düzenler (de Moor ve ark 2005, Lai 2002, Robins ve Press 2005, Stark ve ark 2005, Sun ve ark 2005).

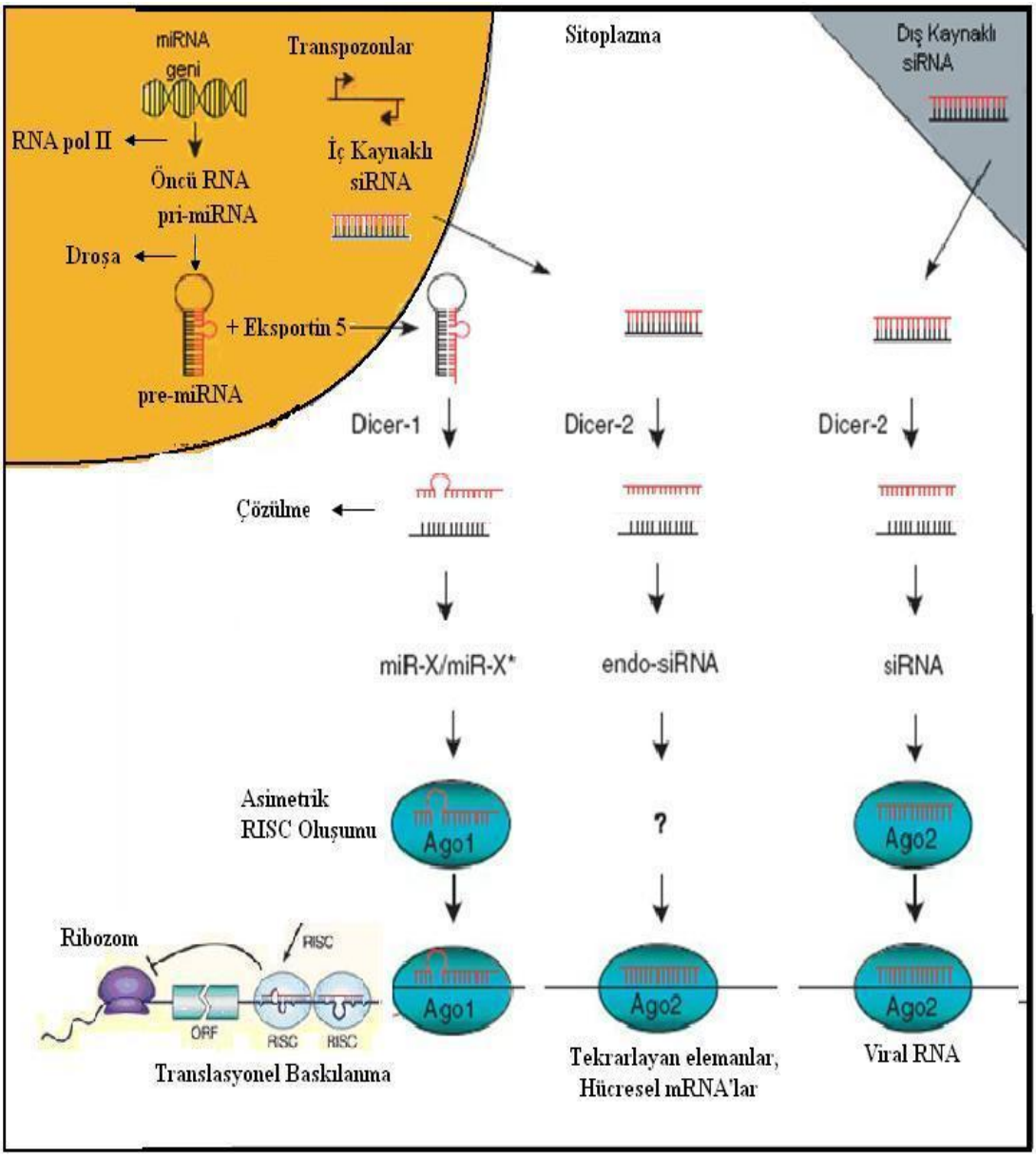
miRNA'ların hedef genlerinin; hayvanlarda gelişimsel zamanlama, kök hücre bölünmesi, apoptoz, çeşitli hastalıklar ve kanserde dahil olmak üzere birçok biyolojik işlemleri kontrol eden genler olduğu gösterilmiştir (Abelson ve ark 2005, Alvarez-Garcia ve Miska 2005, Cheng ve ark 2005a, Cheng ve ark 2005b, Cimmino ve ark 2005, Hatfield ve ark 2005, Houbaviy ve ark 2003, Lee ve ark 1993, Meltzer 2005, Miska ve ark 2004, Reinhart ve ark 2000, Suh ve ark 2004, Tanno ve ark 2005, Volinia ve ark 2006, Zhang ve ark 2006b). Günümüzde tanımlanmış binlerce miRNA; deneysel metotlar, biyoinformatik yaklaşımlar, yazılmış dizi etiketleri (EST-expressed sequence taq) ve genomik keşif dizisi (GSS-genetic survey sequence) analizleri kullanılarak tespit edilmiştir (Brown ve Sanseau 2005, Lee ve ark 1993, Zhang ve ark 2006a, Zhang ve ark 2006d, Zhang ve ark 2005). Ancak, deneysel metotların haricinde bulunan miRNA'ların yalnızca bir kısmının varlıkları laboratuar ortamında ispatlanmıştır (Griffiths-Jones ve ark 2006). Biyoinformatik yazılım ve teknikler kullanılarak belirlenen miRNA'ların yine yazılımlar kullanılarak mevcut mRNA'ların ancak %30 civarındakileri hedefleyebildiği gösterilmiştir (Berezikov ve ark 2005, Lai ve ark 2003, Lewis ve ark 2005, Lim ve ark 2003a, Lim ve ark 2003b).

1.3.1. miRNA Sentezi

Literatürde miRNA'ların sentezi ile ilgili yoğun çalışmalar bulunmaktadır (Bartel 2007, Chen 2005, Kim 2005, Tomari ve Zamore 2005). Mevcut çalışmalara

göre; miRNA'ların genlerden kodlandığı, iç kaynaklı siRNA'ların çift yönlü transpozon transkripsiyonundan oluştuğu ve dış kaynaklı siRNA'ların ise çift sarmal RNA virüslerinden (dsRNA) ya da deneysel müdahalelerden kaynaklanan RNA'lar olduğu gösterilmiştir (Chua ve ark 2009, Davis ve Hata 2009, Winter ve ark 2009).

miRNA sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi ile üretilen öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Bu öncü miRNA RNA pol II'nin imzası olan 5'-metil guanozin şapkası ve 3' poli A kuyruğu taşır ve yüz ile binlerce sayıda nükleotid içeren bir polinükleotitdir (Ambros 2004, Cai ve ark 2004, Lee ve ark 2002b, Lee ve ark 2004, Zeng ve ark 2005). Öncü miRNA'lar (pri-miRNA) saç tokası şekilli ilmek ve/veya sap yapılardan oluşmuştur. Öncü miRNA sentezinin ardından nükleusta bulunan Droşa (bir RNaz III endonükleazı) ve DGCR8/Paşa'dan (iki protein içeren çift zincirli RNA bağlama noktası 500-600kDa) oluşan ve mikroişlemci kompleksi de denilen yapıya bağlanır ve 60-70 nükleotidli 5' ucunda fosfat ve 3' ucunda 2 nükleotidlik çıkıntı olacak şekilde 60 ila 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür. pre-miRNA sitoplazmaya eksportin 5 (bir gen taşıma reseptörü ailesi) tarafından taşınır (Bartel 2007, Bohnsack ve ark 2004, Lund ve ark 2004, Yi ve ark 2003). Sitoplazmaya geçen pri-miRNA yine RNA-pol III'ün bir türü olan dicer tarafından kesilerek 20 ila 25 nükleotidlik bir dubleks yapıda olan olgun miRNA ve onun bütünler miRNA* çift sarmal halini alır (Grishok ve ark 2001, Hutvagner ve ark 2001, Ketting ve ark 2001). En sonunda miRNA:miRNA* ikilisi helikaz tarafından çözülerek olgun bir miRNA ve miRNA*ya dönüşür (Olgun miRNA'nın tamamlayıcı dizisi olan küçük RNA parçası miRNA* olarak gösterilir). Genellikle dubleksin bir iplikçiği yıkıma uğrar; bazı durumlarda ise iki iplikçikten de olgun miRNA'lar üretilebilir (Gregory ve ark 2007, Lin ve ark 2005). Dicer'e bağlanan olgun miRNA daha sonra argonat (Ago) proteinlerine bağlanır ve RNA-indüklenmiş susturma kompleksini (RISC) oluşturur (Morris 2008, Tang 2005, van den Berg ve ark 2008). İç kaynaklı ve dış kaynaklı siRNA'lar da paralel yolaklarla üretilir, fakat ayrı Dicer ve Ago protein izoformları mRNA yıkımında kullanılır(Morris 2008, Tang 2005, van den Berg ve ark 2008).



Şekil 1.1. miRNA, iç kaynaklı siRNA, ve dış kaynaklı siRNA'ların işlenme aşamaları (Saugstad 2010 değiştirilerek alınmıştır).

1.3.2. mRNA Hedeflerinin mikro RNA'lar Tarafından Düzenlenmesi

RNA ile uyarılmış susturma kompleksi (RNA Induced Silencing Complex-RISC) içindeki miRNA'lar hedef mRNA'ları 3' UTR bölgelerindeki baz eşleşmesine göre belirlerler (Bartel 2007, Pillai 2005). Hedef seçiminde bağlanmayı sağlayan kısım ise "çekirdek-seed" adı verilen sınırlı bir bölgedir (Ghildiyal ve Zamore 2009). Bunun yanı sıra, miRNA ya da mRNA'lara bağlanan proteinler de hedef seçimini etkiler (Forman ve Coller 2010). miRNA'lar genel olarak posttranskripsiyonel düzenlenmeyi; translasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımını sağlayarak yapar (Gebauer ve Hentze 2004, Meister 2007).

Olgun mRNA'larda translasyonun başlatılmasında eIF4E (ökaryotik başlatım faktörü 4E) ile 7-metilguanozin dizilimi arasında doğrudan bir etkileşim gereklidir (Gebauer ve Hentze 2004, Merrick 2004, Richter ve Sonenberg 2005). miRNA'lar mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlandığında, RISC'teki Ago proteinleri mRNA'nın 7-metilguanozin bölgesiyle etkileşime girerek eIF4E'nin mRNA'ya bağlanmasını bloke eder ve böylece translasyonun başlamasını engeller (Kiriakidou ve ark 2007). İlgili miRNA'nın bağlanmasını takiben mRNA yıkımı gerçekleştirilerek mRNA yok olmasıyla ile sonuçlanır (Mathonnet ve ark 2007). miR-124'ün mRNA hedefleri üzerine yapılan araştırmalar; miRNA'ların hedefi olan mRNA'ların hem translasyonunu hem de varlığını azalttığını, translasyonun başlangıç aşamasında sonlandırıldığını veya translasyonun olduğu bölgede ribozom sayısının azaltıldığını göstermiştir (Hendrickson ve ark 2009). Bu yüzden hedef mRNA'ların çoğu aynı anda hem translasyonel baskılandırma hem de yıkıma maruz kalırlar.

miRNA işlevi mRNA'nın tek bir belirli bölgesine bağlanmaya endeksli değildir. Çalışmalarda miRNA-ribonükleoprotein birleşmesinin hedef mRNA'nın herhangi bir bölgesine bağlanarak başlamış olan translasyonu mekanik olarak engelleyebildiği gösterilmiştir (Lytle ve ark 2007). Yapılan araştırmalarda miRNA'nın reseptör etkileşimli protein 140'ın 5'-UTR bölgesine bağlanmasıyla ve 3'-UTR bölgelerinde gösterdiği etkinliğiyle kıyaslandığında daha az etkin olsa da

miRNA'ların mRNA'da kodlanan bölgeleri de hedefleyebildiğini ortaya koyan sonuçlar alınmıştır (Forman ve Coller 2010, Tsai ve ark 2009).

miRNA'lar ve ilgili RISC bir mRNA hedefine bağlandığında, RISC kompleksinde bulunan ve mitojen aktive edici bir kinaz olan P38 ile fosforile olan argonat proteini-2 (Ago2)'nin hedef mRNA'yı işlevsel parçalara ayırdığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (Pillai ve ark 2005, Sheth ve Parker 2003, Zeng ve ark 2008). Bazı mRNA'ların yıkım sonrası RISC oluşumundan ayrıldıktan sonra ribozomlara bağlanıp translasyona uğradığı da gösterilmiştir (Bhattacharyya ve ark 2006).

1.3.3. miRNA Hedef Öngörüsü

miRNA hedef öngörüsünde ilk açık-kaynaklı yazılım olan miRanda 2005'in yardımıyla yüksek ihtimalli olarak öngörülen miRNA hedef gruplarının, transkripsiyon faktörler, miRNA mekanizması ve translasyonel düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerle ilgili mRNA'ları içerdiği gösterilmiştir (John ve ark 2004). Buna karşın, temel hücre süreçlerinde rol oynayan proteinlerin genlerinin büyük bir kısmı çok kısa 3'-UTR'lere sahiptir ve spesifik olarak miRNA bağlanma bölgeleri yoktur (Stark ve ark 2005). Omurgalılarda miRNA'ların her biri yaklaşık 200 transkript hedefler (Krek ve ark 2005), ancak miRNA başına öngörülen tahmini hedef sayısı birkaç taneden, 800'e kadar çıkabilir. Birkaç miRNA'nın aynı mRNA'yı hedef olarak tanıması mümkün olmaktadır bu durumda hedef belirlenmesi için kullanılan yazılımlar MiRanda 2005 ve 2008 (Betel ve ark 2008, John ve ark 2004) ve PicTar (Krek ve ark 2005) ortak hedefler için birleşimsel miRNA çözümlemeleri sunmaktadır. Çünkü çoklu miRNA'lar tarafından hedeflenen mRNA'larda güçlendirilmiş bir translasyonel baskılandırma gözlenmektedir (Doench ve Sharp 2004).

miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesinde ilk yaklaşım, hedefteki mRNA ile miRNA'lardaki çekirdek bölge arasındaki dizilim benzeşmesini incelemektir. Bununla birlikte, miRNA'ların bağlanmasındaki afinite nedenlerinin artması için

mRNA üzerindeki bağlanma bölgelerindeki yapısal özellikler ve bağlanma bölgesi de büyük önem arz eder (Alexiou ve ark 2009). Konu ile ilgili en yaygın kullanılan veri tabanları Tarbase (Sethupathy ve ark 2006), Ago (Shahi ve ark 2006), ve miRNAMAP'dir (Hsu ve ark 2006, Hsu ve ark 2008) .

miRNA'lar ve kanser

Kanser gelişiminde çevresel faktörlerin yanı sıra çok sayıda genetik faktörler de rol oynamaktadır. Bu genetik faktörlerin bazıları tümör gelişimini baskılamakta bazıları ise kanser gelişimi uyarmaktadır. Bunlardan onkogen ve tümör baskılayıcı (tumor suppressor) genler dahil olmak üzere insan veya diğer model hayvan genomlarında çeşitli genler tespit edilmiştir. Yakın bir tarihte keşfedilen miRNA, kanser araştırmalarına yeni bir bakış açısı getirmiştir. 2004'te yapılan bir çalışmada miRNA'yı kodlayan genlerin %50'sinden fazlasının kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da frajil bölgelerde yer aldığını gösterilmiştir (Calin ve ark 2004b). Bu bulgu miRNA'ların kanserin patojenezinde çok önemli olduğunu ortaya koymuştur (Calin ve ark 2004b).

Günümüzde miRNA'larla ilgili çalışmaların neredeyse tümü kanser hücreleriyle normal hücreler arasındaki ekspresyon profili farkına dayanmaktadır (Ozen ve ark 2008, Ozen ve Pathak 2000, Zhou ve ark 2010). Bununla birlikte mRNA ekspresyon profilini belirlemede kullanılan yöntemler aynı zamanda miRNA'ların kanserdeki potansiyel rolünü/rollerini tespit etmek için yapılan çalışmalarda da kullanılmaktadır.

Onkogen ve tümör baskılayıcı olarak miRNA'lar

Bir hücre anormal büyüme gösterdiğinde ve apoptoz yeteneğini yitirdiğinde genellikle kanser oluşumuna neden olur. Yapılan birçok çalışmada miRNA'ların hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde rol aldıkları gösterilmiştir (Cheng ve ark 2005a, Tanno ve ark 2005). Örneğin, miR-15 ve miR-16, lösemi, lenfoma ve epitelyum hücre kanseri dahil olmak üzere çoğu insan kanserinde anahtar rol görevi gören anti-apoptotik gen B hücresi Lenfoma 2 (BCL2) mRNA'sını hedefleyerek apoptozu indüklemektedir (Cheng ve ark 2005a, Sanchez-Beato ve ark 2003, Tanno ve ark 2005).

Diğer bir çalışmada ise miR-278 geninin yanlış eksprese edilmesinin gözleri gelişmekte olan Drosophila'larda devasa büyümelere sebep olduğu gösterilmiştir (Nairz ve ark 2006). Bu bulgular, miRNA'ların bazı kanserlerin oluşumunda, hücre büyümesi ve apoptoz mekanizması yoluyla patogenezde yer aldığını akla getirmektedir.

miRNA'ların kanserlerdeki varlığına dair ilk kanıt en çok karşılaşılan yetişkin lösemi tipi olan insan kronik lenfositik lösemide (KLL) karakterize edilen 13q14 delesyonuyla ilgili bir çalışmaya dayanmaktadır (Calin ve ark 2002, Dohner ve ark 2000). B-hücresi kronik lenfositik lösemi (B-KLL) vakalarının yarısından fazlasında delesyona uğramış bir bölge olan, kromozom 13q14'te bulunan bu bölgede miR-15a ve miR-16a isimli iki miRNA'nın sentezlendiği genleri içerdiği gösterilmiştir. Detaylı delesyon analizleri bu iki miRNA'nın KLL hastalarında kayıp ya da çok az sentezlendiğini göstermiştir (Calin ve ark 2002).

Tümör dokuları ve normal dokularda farklı seviyelerde ifade edilen miRNA'ların tanınması, bu miRNA'ların insan kanserlerindeki görevlerin belirlenmesi miRNA'ların kanserlerdeki zaten aşikar olan patojenik rolünün daha fazla aydınlatılabilmesi için yararlı olabilir (Iorio ve ark 2005). Bir araştırmada 245 insan ve fare miRNA geniyle ilgili 368 probu içeren bir mikro dizi çalışmasıyla insan

B hücresi KLL'lerindeki miRNA'ların genom genelindeki ekspresyon profilleri belirlenmiştir (Calin ve ark 2004a). Mikro RNA mikro dizi analizleri aynı zamanda miRNA ekspresyon modelinin KLL'nin biyolojik ve klinik davranışlarıyla da ilişkili olduğunu ortaya konmuştur (Calin ve ark 2004a). Bununla birlikte diğer çalışmada BCL'nin miR-15a ve miR-16-1'in hedeflerinden biri olduğunu ortaya konmuştur (Cimmino ve ark 2005). Burada KLL'de miR-15a ve miR-16-1'in ekspresyonunun BCL2'nin ekspresyonuyla ters orantılı olduğunu; iki miRNA'nın da post-transkripsiyon sırasında BCL2'yi negatif yönde düzenlediğini göstermiştir (Cimmino ve ark 2005). Bu durum, bir lösemi hücre hattı modelinde de doğrulanmıştır. Bu bulgular ile miR-15a ve mir-16-1'in fazla eksprese olan BLC2 tümörlerinin tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Cimmino ve ark 2005).

let-7 mikroRNA ailesi insanlarda bulunan ilk miRNA'lardır ve 12 farklı türü mevcuttur. Çoğu let–7 geninin birçok kanser türünde delesyona uğradığı veya daha az sentezlendiği gösterilmiştir elde edilen bu bulgular bu aileye mensup genlerin tumor baskılayıcı genlerden olduğu düşüncesini akla getirmektedir (Calin ve ark 2004b).

Akciğer kanseri, yetişkinler arasında en sık rastlanan kanser tiplerinden biridir. Takamizawa ve arkadaşları (2004) *in vivo* ve *in vitro* akciğer kanseri çalışmalarında let-7'nin ekspresyon seviyesinin ani bir düşüş gösterdiğini tespit etmişlerdir. Azalmış let-7 ekspresyonunun, hastalığın evresinden bağımsız olarak, cerrahi operasyon sonrası hayatta kalma süresinin kısalmasıyla belirgin bir şekilde ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Takamizawa ve ark 2004). Aynı zamanda A927 (akciğer adenokarsinomu) hücre hattındaki miRNA let-7'nin aşırı eksprese edilmesinin kanserli hücrelerin büyümesini engellendiği belirlenmiştir (Takamizawa ve ark 2004). RAS ve MYC ekspresyonunu, translasyonu baskılamak için, onların mRNA'larını hedef alarak negatif şekilde düzenlemektedirler (Johnson ve ark 2005). RAS ve MYC'nin, p53 ile birlikte, akciğer kanserinde anahtar onkogen olduğu vurgulanmaktadır. 3'-UTR'lerinde çok sayıda let-7'yi tamamlayan bölge bulunduğu bildirilmektedir (Johnson ve ark 2005).

Johnson ve arkadaşları (2005) akciğer tümörü dokusunun, normal akciğer dokusuna kıyasla, let-7 seviyesinde belirgin miktarda azalma ve RAS proteini miktarında dikkat çekici bir artış sergilediğini göstermişlerdir. Burada RAS'ın let-7 ile düzenlenmesinin akciğer onkogenezindeki bir mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Akciğer kanserinin haricinde let-7'nin meme kanserinde de etkili olduğu gösterilmiştir ve artan let-7 miktarının memede kanserli hücrelerin artışını yavaşlattığını ortaya koymuştur (Yu ve ark 2007).

Omurgalılarda miR-34'ün üç farklı formu vardır. Bunlar miR-34a, miR-34b ve miR-34c'dir. miR-34'ün nöroblastomlarla ilgili olduğu miR-34 transfeksiyonu sonucu nöroblastom hücrelerindeki kaspaz yolağını aktif ederek hücre canlılığını düşürdüğü gösterilmiştir (Welch ve ark 2007). Daha sonra ise miR-34'ün P53 yolağında etkili olduğu gösterilmiştir (Bailey ve ark 2010, Boominathan 2010, Ichimura ve ark 2010, Vilborg ve ark 2010). Biyoinformatik analizlerden ve yapılan çalışmalardan yola çıkarak miR-34'ün hücre döngüsünde ve apoptozda rol oynadığı bilinen E2F3, CDK4, CDK6, CCNE2, BIR3, DCR3 ve BCL2 gibi genler üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Bommer ve ark 2007, Tazawa ve ark 2007).

miR-17-92 ekspresyonu, let-7'nin tersine, akciğer kanserlerinde, özellikle en agresif şekli olan küçük hücreli akciğer kanserleri formunda, kayda değer bir artış göstermektedir (Hayashita ve ark 2005). miR-17-92 aynı zamanda akciğer kanseri hücrelerinin gelişimini de arttırır (Hayashita ve ark 2005).

miR-17-92 kümesinin tahmin edilen hedefleri arasında PTEN ve RB2 adlı iki tümör baskılayıcı genin de yer almasına rağmen hiçbir zaman kanıtlanmamıştır (Lewis ve ark 2003). Yapılan araştırmalar miR-17-92 kümesiyle küçük hücreli akciğer kanserlerinde aşırı miktarda sentezlendiği bilinen c-myc onkogeni arasında bir bağıntı olduğunu göstermiştir (O'Donnell ve ark 2005).

Onkogen olarak miRNA'lar

Çeşitli deneyler ve klinik analizler miRNA'ların yeni bir onkogen sınıfı ya da tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak nitelendirilebileceğini ileri sürmektedirler (Xiang ve Wu 2010, Zhang ve ark 2010b).

Tümörlerde miktarı artan miRNA'lar onkogen olarak düşünülebilir. Bu onkogen miRNA'lara "onkomir" adı verilmektedir. Genellikle tümör gelişimini; apoptozu ve tümör baskılayıcı genler üzerinde negatif etki yaparak patogenezde rol alırlar.

miR-17-92 onkogen miRNA için iyi bir örnektir. 13q31 bölgesine yerleşmiş olan polisistron bir miRNA olan miR-17-92 kümesi, lenfoma'nın birkaç tipi ve diffüz büyük hücreli B lenfomayı kapsayan akciğer kanserleri tiplerinde miktarlarının arttığı gösterilmiştir (Hayashita ve ark 2005, He ve ark 2005b). Normal dokularla karşılaştırıldığında akciğer kanseri ve lenfomalarda, özellikle bunların agresif formları olan Küçük hücreli akciğer kanseri ve B hücreli lenfoma gibi birkaç kanser tipinde miR-17-92 ekspresyonu önemli ölçüde artış göstermektedir (Hayashita ve ark 2005, He ve ark 2005b). miR-17-92'nin aşırı eksprese edilmesinin transgenik farelerde (hematopoetik kök hücreler) lenfomoid maligniteleri belirgin olarak hızlandırdığı belirlenmiştir (He ve ark 2005b).

c-Myc en iyi tanımlanmış onkogenlerden biridir. Bu genin ya fazla eksprese edilmesi ya da fonksiyon kaybı insanlarda kansere sebep olur (Cole ve McMahon 1999). Heliks-loop-heliks- lösin fermuar formunda bir transkripsiyon faktörü olan bu gen, insan ve hayvan genlerin % 10-15'ini hedefleyerek hücre bölünmesi, büyümesi ve apoptoz'a bağlı hücre ölümlerini yönetir (Fernandez ve ark 2003, Levens 2002, Li ve ark 2003, Orian ve ark 2003). c-Myc ekspresyonunun miR-17-92 ekspresyonuyla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (O'Donnell ve ark 2005). c-Myc üzerinde yapılan bu çalışmada; c-Myc'in, E2F1 ve miR-17-92'nin transkripsiyonunu eş zamanlı aktive ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, miR-17-92 kümesine dahil iki miRNA olan miR-17-5p

ve miR-20a, E2F1 translasyonunu baskıladığıda gösterilmiştir (O'Donnell ve ark 2005). Yapılan bu araştırma c-Myc tarafından düzenlenen miR-17-92'nin E2F1 ekspresyonunu düzenlediğini ileri sürmektedir (O'Donnell ve ark 2005).

Onkogenik miRNA'lara (germ hücreli testis tümörü onkogenlerine) ilaveten verilebilecek iki örnek de miR-372 ve miR-373'dür (Voorhoeve ve ark 2006). Bu iki miRNA hücre proliferasyonunu ve tümör gelişimini ve p53 aracılı CDK inhibisyonu ve muhtemelen tümör baskılayıcı LATS2 geninin ekspresyonunu direkt olarak baskılama yoluyla arttırır (Voorhoeve ve ark 2006).

Kanserdeki miRNA fonksiyonuyla ilgili araştırmalar mikroçip analizlere dayanmaktadır. Bu teknoloji ile bir örnek üzerinde yüzlerce miRNA'nın ekspresyon miktarı tayin edilebilmektedir. İnsan genomunda bu güne kadar 1048 miRNA tanımlanabilmiştir. (Griffiths-Jones 2004, Griffiths-Jones ve ark 2006). Tanımlanan bu miRNA'ların büyük çoğunluğunun henüz tam olarak fonksiyonları ve hangi genler üzerinde etkili olduğu konusunda net veriler yoktur.

1.3.4. miRNA çalışmalarında kullanılan temel yöntemler

miRNA çalışmalarında, temel moleküler biyolojik teknikler kullanılmaktadır (Lee ve ark 1993, Schmittgen ve ark 2004). Bununla birlikte, miRNA ekspresyon profili, miRNA'ların kanser patogenezindeki fonksiyonunu araştırmak için iyi bir başlangıç noktasıdır. Belirli bir miRNA'nın kanserli hücredeki yokluğu ya da fazla sentezlenmesi miRNA'nın kanser başlangıcı ve gelişimindeki özel rolünü çalışmaya imkân vermektedir.

miRNA araştırmalarında kullanılan birçok metot bulunmaktadır. Bu yöntemler; tamamlayıcı (antisense) inhibitörler, transgenik canlı ve hücre oluşturulması, özel dizayn edilen promotor bölgeler ve nokta mutasyonları oluşturarak miRNA ekspresyon seviyesinde farklılık oluşturacak deney düzenekleridir. Hedeflenmiş miRNA'nın işlevini bloke etmek için antisens inhibitör

kullanmak iyi bir örnek sayılabilir. Bu yöntemde yapay antisens RNA hücresel mRNA'larla miRNA'ya bağlanabilmek için rekabete girer. Antisens RNA, miRNA'larla bir araya gelir ve miRNA'nın fonksiyonunu inhibe ederler. Bu durum iki bağımsız araştırma grubu tarafından dizi spesifik baskılama ve siRNA ile indüklenmiş RNA susturulması (silencing) olarak başarıyla kullanılmıştır (Hutvagner ve ark 2004, Meister ve ark 2004). Bu çalışmaların ardından bu yöntem araştırmalarda sıkça kullanılabilir hale gelmiştir.

miRNA'lardaki ya da hedeflerindeki nokta mutasyonları aynı zamanda miRNA'ların kanserdeki fonksiyonunu belirlemede kullanılmaktadır. Nokta mutasyonlarındaki bir bariz avantaj da miRNA'ların ve hedef genlerin direkt etkileşimlerinin bu yöntemle belirlenebiliyor oluşudur. Yapılan çalışmalarda "çekirdek dizisi" miRNA'ların hedeflerini tanımalarında önemli bir faktör ve çekirdek dizilerindeki hatalı eşleme oranının artması miRNA'ların gen düzenlenmesindeki işlevini de dikkat çekici bir biçimde düşürür (Lewis ve ark 2005). Bu teknik miRNA'lar ve hedeflerinde nokta mutasyonları tasarlamakta kullanılmaktadır. Bölgeye has bir miRNA adayı için "çekirdek bölge"deki bir ya da iki nükleotidlik değişimler miRNA'nın hedefine bağlanması olasılığını önemli ölçüde azaltacak, bu miRNA'ların hedef bölgelerinde (overexpression) çoğalmasıyla sonuçlanacaktır. Eğer bu miRNA'lar ya da hedefleri kanser oluşumunda yer alıyorlarsa, bu nokta mutasyonlar kanser oluşumunu etkileyecektir.

1.4. Mikroçip

Mikroçip (microarray) yöntemi, aynı anda binlerce nükleik asit diziliminin tamamlayıcı dizileri ile olan etkileşimini analiz etme esasına dayanmaktadır. Bugüne kadar ticari olarak farklı yöntemler kullanılarak çeşitli mikroçipler üretilmiştir. Yapılan çalışmalarda mikroçip yöntemi kullanılarak doku oluşumu, gelişimi ve kanserin de dahil olduğu birçok durumun ve gen ekspresyon profilinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Bignell ve ark 2004). Mikroçip'lerden

elde edilen yüksek miktardaki bilgilerin analizi için yeni yazılımlar ve bu tarz bilgilerin analiz edilmesi için biyoinformatik denilen bilim dalı ortaya çıkmıştır.

Gen ekspresyonu için kullanılan mikroçip'te haberci RNA'lar tarafından hazırlanan floresanslı problar, üzerinde belli genlere özgü binlerce DNA dizisinin bulunduğu yüksek yoğunluklu matrikse hibridize edilir. Bir RNA örneğindeki transkripte olmuş genler arasındaki ifade seviyeleri ise hibridizasyon yoğunluğuna göre sayısal olarak kıyaslanır.

Tamamlayıcı DNA mikroçipleri; DNA'nın tamamlayıcı zincirleri arasındaki karşılıklı afinite esasına dayanan bir mikroçip yöntemidir. Çipin büyüklüğü 500 gen ile 30000 gen arasında değişebilmektedir. Arzu edilen genler seçildiğinde her bir gen için bir klon seçilir ve bu klonları tanıyacak evrensel primerler elde edilir. Bun genler polimeraz zincir reaksiyonu sayesinde çoğaltılarak agaroz jel elektoforezinde görüntülenir ve bir sonraki adım olan saflaştırma işlemine hazır hale getirilirler. Saflaştırılmış örnekler hazırlandıktan sonra çiftler halinde önceden belirlenmiş cam lamlar üzerine konumlandırılır (Liu ve ark 2010). Basılı lamın üzerinde her bir gene tekabül edecek iki nokta bulunmaktadır. Baskı üç yoldan biriyle yapılabilir: fotolitografi, mekanik, ya da mürekkep jeti'dir.(Lee ve ark 2002a). Fotolitografi yöntemi DNA'yı kovalent olarak lama bağlamak için ultraviyole ışık kullanır, mekanik noktalama DNA taşınması için kılcal eylem ve iğneler kullanmaktadır ve mürekkep jeti uygun miktarda DNA'yı dağıtmak için elektrik akımını kullanır. Lamlara konumlandırma yapıldıktan sonra ultraviyole çapraz bağlama DNA'yı denatüre eder ve sonra DNA'nın bu cam yüzey üzerinde sabit kalmasını sağlar.(Arslan ve Laurenzi 2009)

Mikroçipler, gen ekspresyon farklılıkları için kullanılır. Bu farklılıkları vurgulamak amacıyla, uygun kontrollerin kullanılması hayati önem taşımaktadır. mRNA'lar kontrolün yanı sıra deney örneklerinden elde edilmeli ve dizi deney kullanım için saflaştırılmalıdır. Bu RNA, birçok kaynaktan elde edilebilir; örneğin hayvan modellerinden, klinik hastalarından ve histoloji olarak arşivlenmiş doku

örneklerinden hazırlanabilmektedir mRNA'nın çıkarılmasının ardından, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle mRNA'ya uygun tamamlayıcı DNA'lar sentezlenir (Foglieni ve ark 2010). Aktif olarak transkripte edilecek genlerin kopyalarının olması gerekir ve daha sonrasında bu mRNA'ların tamamlayıcı DNA'lara (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. Kontrol ve deney mRNA için ters transkripsiyon olayı birebir aynı olup tek fark kontrol ve örnek RNA farklı floresans boya ile işaretlenmesidir. Yeşil floresan veren boya olan Cy3 ile etiketlenmiş nükleotidler kontrol tamamlayıcı DNA'ya yapıştırılırken, kırmızı floresan veren boya olan Cy5 ile etiketlenmiş nükleotidler deneysel DNA'ya yapıştırılmıştır (Borden ve ark 2005). Bundan sonra her iki prob karıştırılır ve cam lama melezleme (hibridizasyon) yöntemiyle bağlanır. Hibridizasyon tamponuyla iyice yıkanan lamlar bir gece boyunca inkübasyona bırakılır ve tarama için hazır hale getirilir.

Lam üzerinde tek zincirli tamamlayıcı DNA probları eşlenik tek zincirli tamamlayıcı DNA'larına denk gelirse iki prob arasında bir bağ oluşmaktadır. Lazer tarama, yapıştırılmış olan floresan boyaları etkinleştirir ve melezleşmiş problu lamların üzerindeki alanlar, kırmızı veya yeşil lekeler olarak taranarak görüntülenir. Problanmamış gen noktaları karanlık olarak görünmektedir. Kırmızı noktalar Cy5 ile işaretlenmiş deneysel örnekte ifade edilen gene karşılık gelirken, yeşil noktalar Cy3 ile işaretlenmiş kontrol örnekte ifade edilen gene karşılık gelirler. Eğer bir gen iki koşul altında da ifade ediliyorsa, her iki prob da melez olarak bağlanır ve o nokta sarı olarak görünür. Gelişmiş lazer tarama donanımları ışık yoğunluğu temeline göre sayılabilen verileri bilgisayara almak için kullanılır. Oranları karşılaştırarak Cy5 ve Cy3 şiddetleri, kantitatif gen ekspresyonu değerlendirmek için kullanılabilir. Farklı koşullar altında, bireysel genler yukarı veya aşağı düzenlenmiş olarak düzenlenebilir ve bu değişiklikleri belirteçlerin floresan sinyalleri yansıtır. Örneğin Cy5'in Cy3' e oranı bir ise bu bir değişiklik olmadığını, birden az bir değerse azalan (kontrol olan Cy3'de daha büyük bir yoğunluk olduğunu gösteren) ve bu değer birden daha fazla ise bir artan (deneysel olan Cy5'de daha fazla yoğunluk gösteren) miktarlarda olduğunu göstermektedir.

Bir mikroçip deneyinin en karmaşık kısmı verilerin değerlendirilmesidir. Çip formatı genom etkileşimlerini incelemek için uygun formatta dizayn edilmiştir. Fakat bu durum karmaşıklığı basitleştirememektedir. Örneğin 10.000-gen dizisi için 10.000'den fazla veri noktası mevcuttur ve sonuçların geçerliliği replikasyon yoluyla mümkün kılınmıştır. Tipik bir mikroçip deneyi, on, yirmi hatta otuz tane lamın kullanılmasıyla ortaya çok büyük miktarlarda veri üretilmesini ve analizi sayesinde bir sistemi en geniş haliyle resmedilmesini sağlamaktadır. Veriler çeşitli şekillerde analiz edilebilmektedir. Analizin ilk aşaması olan normalizasyon hayati öneme sahiptir. Normalizasyon sayesinde mikroçip'teki ışımalar daha anlamlı hale getirilir. Biyoteknoloji endüstrisi, deneyleri karşılaştırmak ve istatistikî değerlendirmeye dayalı küme diyagramları oluşturmak için yazılım paketler geliştirmiştir (Cunningham 2000). Bu gelişimler genel kalıpları tespit etmede yararlı olup başka deneyleri yönlendirmek adına kullanılabilir.

Ham sayısal verilerin analizi ifade düzeylerinde anlamlı değişim gösteren belirli genleri tanımlamak için yararlıdır. Anlamlılık sınırları çeşitli matematiksel testler tarafından belirlenir. Faydalı veri analizi deney odağının doğru anlaşılması üzerine bağlıdır. Bir mikroçipten geliştirilen muazzam hacmi başarıyla kullanmak için, deneyin özgün amaçlarını belirlemek önemlidir.

Mikroçip tekniği kapsamında çok çeşitli deneysel durumlar uygulanabilir hale getirilmiştir. Temel olarak bilinir ki gen ifadesindeki değişiklikler neticesinde gelişim ve hastalıklar meydana gelir. Mikroçip sayesinde normal ve anormal doku arasındaki ifade farklılıkları karşılaştırılmaktadır ve birinin neden gerçekten normal diğerinin ise anormal olduğu belirlenebilir.

1.5. Mikroçip, miRNA ve Kordoma

Mikroçip teknolojisi geliştikçe kanser çalışmaları için kullanım potansiyeli de artmıştır. Kanserli ve normal hücrelerdeki bilinen tüm mRNA ve miRNA'ların ekspresyon modellerinin karşılaştırılabilmesi önemlidir. Bu sebeple ekspresyon

profilini tek bir zamanda tespit edecek bir metot olarak mikroçip teknolojisi kullanılır. İki renkli floresana dayalı mikroçip teknolojisi (DNA mikroçip) anlık gen ekspresyonunu saptamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birkaç laboratuar DNA mikroçip teknolojisini kullanarak miRNA mikroçip teknolojisini oluşturmuştur (Babak ve ark 2004, Barad ve ark 2004, Liang ve ark 2005, Liu ve ark 2004, Nelson ve ark 2004a, Nelson ve ark 2004b, Thomson ve ark 2004). Thomson ve arkadaşları (2004), ısmarlanabilir iki kanallı bir miRNA mikroçip platformu geliştirmiş ve 124 memeli miRNA'sının ekspresyon seviyelerini görüntüleyebilmek için kullanmıştır (Thomson ve ark 2004).

miRNA mikro dizi analizleri kanser dokuları ve normal dokular arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasında kapsamlı bir teknoloji haline gelmiştir (Liang ve ark 2005, Liu ve ark 2004). Buna ek olarak, birkaç miRNA onkogen ve ya tümör baskılayıcı genin belirlenmesiyle miRNA'ların kanserlerdeki rolünü araştırmada, sıklıkla miRNA mikroçip kullanılmıştır (Calin ve ark 2005, Iorio ve ark 2005, Lu ve ark 2005).

Mikroçip teknolojisi kordomalarda ilk olarak 2005 yılında kullanılmıştır. Bu çalışmada klasik mikroçipler yerine doku çipleri kullanılmıştır (Oakley ve ark 2008). İlerleyen dönemlerde klasik mikroçip yöntemi kullanılarak karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çipleri kullanılarak kordomalarda moleküler karyotipleme yapılmıştır (Brandal ve ark 2005, Hallor ve ark 2008, Yang ve ark 2009). 2006 yılına gelindiğinde ise Londra'da bir ekip ilk defa kordomalarda mikroçip teknolojisini kullanılarak mRNA ekspresyon analizini yapmıştır (Vujovic ve ark 2006). Son olarak bu tez çalışmasının yapıldığı esnada 2009 yılında 2 doku üzerinde yapılan miRNA ekspresyon profil çalışması yayınlanmıştır (Duan ve ark 2010).

Bu tez çalışmasında insan kordomalarındaki miRNA profili nükleus pulposus dokusuyla kıyaslanarak belirleneceği için kordomanın moleküler patogenezinin belirlenmesinde önemli bir katkı yapacağını ayrıca kordomanın moleküler tabanlı

tedavisinde potansiyel ajanların belirlenmesinde etkin bir çalışma olacağını düşünülmüştür.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Beyin Cerrahisi Anabilim Dallarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik kurul onamı Yeditepe Üniversitesi Kurulundan alınmıştır (Bkz. EK-A). Çalışma kapsamında kullanılacak doku örneklerinin alındığı gönüllülerden bilgilendirilmiş (Bkz. EK-B) ve aydınlatılmış (Bkz. EK-C) onamları alınmıştır.

Çalışma kapsamına iki gönüllü grup alınmıştır. Birinci grup Beyin Cerrahisi Anabilim dalında ameliyat edilen kordoma tanısı konmuş 12 hasta ve ikinci grup olarak disk hernisi tanısı konmuş 12 hastadan oluşmaktadır. Kordoma hastalarından ameliyatla alınan tümör dokusu ve disk hernisi hastalarından ise alınan nükleus pulposus dokusu kullanılmıştır

Çalışmada kordoma hücre hattı olarak UCH-I hücre hattı kullanılmıştır ve bu hücre kültürü Amerikan Kordoma Derneği tarafından hediye edilmiştir (Scheil ve ark 2001).

2.1. Dokudan RNA İzolasyonu

Kordoma ve nükleus pulposus dokularındaki miRNA ekspresyon profili için bu dokulardan trizol yöntemi kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

Ameliyat sonrası temin edilen kordoma dokuları yeterli miktarda olanlar steril ortamda bistüri ile kesilerek 4 parçaya ayrıldı. Birinci parça hücre kültüründe kullanıldı. İkinci parçadan RNA izolasyonu gerçekleştirildi (bkz. Protokol 1). Diğer iki parça ise -80ºC'de uzun süreli muhafaza edilmek üzere saklandı.

Disk hernisi hastalarından alınan nükleus pulposus dokularından primerler hücre kültürleri hazırlandı (Bkz. Protokol 2). Hazırlanan hücre kültürlerinden her biri

için 3 adet kriyo tüp dondurulduu ve ayrıca bu hücrelerin primer kültürlerinden trizol metodu kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

Protokol 1. Trizol yöntemi kullanılarak doku ve hücre kültürlerinden RNA izolasyonu

- 50-100 mg ağırlığındaki doku örnekleri steril bisturi kullanılarak laminar flov içerisinde küçük parçalara ayrılır.

- Nükleus pulposus hücreleri için; T25 hücre flaskı (nunc kat no: 136196) %80-90 yoğunluğa geldiğinde (yaklaşık olarak $1x10^6$ hücre) tripsin-EDTA (Gibco kat no:25200-056) ile muamele edilerek hücreler kaldırılır. Kaldırılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere (BD kat no:352097) aktarılarak 2000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üst faz atılarak hücre pelleti üzeri 3 ml PBS (fosfat tampon solüsyonu- Gibco kat no:10010-015) solüsyonu eklenerek hücreler yıkandı. Tekrar 2000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra üst faz atılarak dokularla birlikte aynı protokol uygulandı.

- Trizol uygulaması için hazırlanan ve 1,5 ml'lik tüplere (Axygen kat no: MCT-150) konan örnekler üzerine 1 ml trizol solüsyonu (Invitrogen kat no: 15596-026) eklendi. 30-45 sn şiddetli ve darbeli vorteks yapıldıktan sonra örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.

- Beklemenin ardından her bir örneğe 0,2 ml kloroform (sigma kat no:25690) eklenir ve yine 30-45 sn vorteks veya pipetaj yapıldı.

- Bu aşamanın ardında hücreler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra daha önceden +4° C'ye kadar soğutulmuş 12.000 g'de 20 dk santrifüj edildi.

- Santrifüjün ardından üst faz çok dikkatli bir şekilde alınarak bir başka 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı ve her bir örnek için 0,5 ml izopropil (sigma kat no: I9516) alkol eklendi.

- Bu aşamadan sonra örnekler 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten (problem olduğunda ise bütün bir gece -20 ° C'de bekletilebilir) sonra yine soğultulmuş santrifüjde 12.000 g'de 15 dk santrifüj edildi ve üst faz dikkatli bir şekilde atıldı.

- Pellet % 75'lik etanol (Sigma kat no: 51976) ile yıkandı ve tekrar soğutulmuş santrifüj'de 5 dk santrifüj edildi.

- Üst faz dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra pellet kurumaya bırakıldı.

- Pellet kuruduktan sonra distile suyla pelletin büyüklüğüne bağlı olarak distile suyla sulandırıldı

RNA izolasyonundan sonra her bir örnek için UV. Spektrofotometre (Implen NanoPhotometer™ UV/Vis spectrophotometer) ile RNA miktarı ve ürün saflığı ölçüldü. Miktar tayini yapılan RNA'lar MOPS solüsyonu kullanılarak agaroz jelde yürütüldü (Bkz. Protokol 3).

Protokol 3. MOPS Tamponu Agaroz Gel Hazırlanması

- %1'lik agaroz jel için 100 ml 1X MOPS (sigma kat no: M5755) tamponunun içine 1 gr agaroz (sigma kat no: A4718) kondu.

- Agaroz tamamen çözülünceye kadar mikrodalga'da kaynatıldı

- Kaynatıldıktan sonra içine 4µl Etidyum bromid (sigma kat no:E1510) eklendi

- Jel tablasına döküldükten sonra uygun taraklar takılarak soğumaya bırakıldı.

- Jel polimerizasyonu gerçekleştikten sonra 1X MOPS tampon solüsyonu ile dolu olan jel tankına kondu.

- Jelin her bir kuyucuğuna 300-500 ng RNA yüklenerek 80 V 45 dk yürütüldü

- Yürütmeden sonra jel U.V. transliminatör'de görüntülendi.

2.2. Primer ve UCH-I Hücrelerinin Kültürü

Çalışma kapsamında kordoma ve nükleus pulposus dokusundan direkt olarak RNA izolasyonu yapılmaya çalışıldı. Kordoma dokularından sağlıklı RNA izole edilmesine rağmen nükleus pulposus dokularından yeteri miktarda ve sağlık RNA izolasyonu yapılamadı. Yapılan literatür araştırmalarında nükleus pulposus dokularındaki hücre dışı matriksin çok ve yoğun olmasından dolayı dokulardaki birim hacim başına düşen hücre sayısının çok az olduğu bildirilmektedir (Ahn ve ark 2002, Miyamoto ve ark 2002, Oguz ve ark 2007, Seguin ve ark 2006). Bu aşamadan sonra, nükleus pulposus dokularından sağlıklı RNA izolasyonu için elde edilen dokunun enzimatik parçalanmaya maruz bırakıldıktan sonra hücre kültürünün yapılmasının gerekliliğine karar verildi (Bkz. Protokol 2).

Protokol 2. Dokulardan primer hücre kültürü hazırlanması

- Hastalardan ameliyat esnasında alınan doku örnekleri daha önceden içine 5 ml; %89 DMEM (Gibco kat no:31966-021), %10 FBS (Fetal Bovine Serum-Gibco kat no: 10500-064) ve %1 penisilin streptomisin solüsyonu (Gibco kat no:15070-063) içeren büyüme besiyeri konulmuş 15 ml'lik tüpler içine konularak en geç 1 saat içerisinde laboratuara ulaştırıldı.

- Laboratuvara gelen doku örneği PBS solüsyonu ile yıkandıktan sonra daha önceden kollojenaz enzimlerinin olduğu solüsyona konularak çalkalayıcılı etüv'de 37°C'de inkübe edilir. İnkübasyon süresi en az 4 saat olmak üzere doku büyüklüğüne ve türüne göre bütün bir geceye kadar uzatılabildi

Kollojenaz Solüsyonun Hazırlanışı: 200ml DMEM/F12 (Gibco kat no: 31331-028) besiyeri içine 0,05'er gr kollojenaz tip I, tip II, tip IV ve tip V kondu. Kollojenazlar besiyerinde çözüldükten sonra 0.22 µm'lik enjektör filtrelerinden (millipore millex Gp kat no:SLGP033RS) geçirildikten sonra belirli hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

- İnkübasyonun ardından tüpler 2000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra çoğaltma besi yeri eklendi. Hücre kültür flaskına aktarıldı ve %5 CO_2 hücre kültürü için uygun etüve kültüre bırakıldı.

- İlk besi yeri hücrelerin flask yüzeyine tutunmasına bağlı olarak 3-7 gün sonra değiştirildi.

Hücre kültürleri elde edildikten sonra daha sonra kullanılmak üzere sıvı azota konuldu (Bkz. Protokol 4).

Protokol 4. Hücre Dondurulması

- Kültüre edilen hücreler hücre flask yoğunluğu %80-90'a ulaştığında tripsin EDTA ile kaldırılarak 15 ml'lik tüplere kondu.

- 2000 RPM'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atıldı.

- Kalan hücre pelleti üzerine 1 ml hücre dondurma besiyeri (Gibco kat no: 12648-010) eklenir ve 500 µl'lik hacimlerde kriyo tüplere (Corning kat no:430499) aktarıldı.

- Kriyo tüpler mr frosty (nalgene kat no:5100-0001) konularak -80°C'ye kaldırıldı

- -80°C'ye konulduktan 48 saat sonra sıvı azota aktarıldı.

Protokol 5. UCH-I Hücre Hattının Kültüre Edilmesi

UCH-I hücre hattı için yüzeyi % 0.1 jelatinle (Sigma kat no:G1393) kaplanmış T75 hücre flaskı kullanılmıştır.

- %2'lik jelatin solüsyonu oda sıcaklığına varıncaya kadar ısıtıldı.

- Her bir T75 hücre flaskı için PBS ile seyreltilmiş 3ml %0.1'lik jelatin solüsyonu hazırlandı ve T75 hücre flaskının iç yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde kondu. Bu şekilde T75 hücre flaskı 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.

- İnkübasyonun ardından %0.1'lik jelatin solüsyonu çekilerek T75 hücre flaskı iki defa PBS ile yıkandıktan sonra yine oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

- Hazırlanan bu T75 hücre flasklarına $4x10^5$ kordoma hücresi 12ml'lik besiyeri içerisinde eklenerek %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

- Hücre yoğunluğu T75 flaskın %80'ni kaplayacak duruma gelene kadar her 3 günde 1 besiyeri değişimi yapıldı.

- UCH-I hücre besiyeri: %70 IMDM (Gibco kat no:31980-022), %19 RPMI (Gibco kat no:11875-093), %10 FBS ve %1 PSA solüsyonları karıştırılarak hazırlandı.

- UCH-I hücreleri %0,05'lik tripsin-EDTA solüsyonu(Gibco kat no:25200-056) kullanılarak pasajlandı.

2.3. Klasik PCR Çalışması

Sağlıklı RNA'sı elde edilen her bir kordoma ve nükleus pulposus örneği için klinik bilgilerin haricinde literatür taramalarında kordoma ve nükleus pulposus dokularının doğrulanması için belirlenen bu genlerin klasik PCR (Polymerase Chain Reaction) ile ekspresyonuna kalitatif olarak bakıldı (Bkz. Protokol 6). PCR'da kullanılan gen ve primer bilgileri çizelge 2.1'de verilmiştir.

Protokol 6. cDNA sentezi (Qiagen kat no: 205311) ve Klasik PCR protokolü

cDNA sentezi:

Her bir örnek için, aşağıdaki verildiği gibi karışım-A hazırlandı.

Miks A	
Solüsyon	Miktar (µl)
gDNA uzaklaştırıcı tampon	2
RNA (500ng- 50ng/µl)	10
dH_2O	2
Toplam hacim	14.0

- Bu 14 µl karışım hazırlandıktan sonra örnekler ısı bloğunda 42°C'de 2 dk bekletildi.
- Isı bloğundan alınan örnekler bir an önce buz içerisine konularak burada da 2 dk bekletildi.

Miks B	
Solüsyon	Miktar (µl)
Quantiscript reverse transcriptase	1
Quantiscript RT Buffer 5X	4
RT Primer Miks	1
Toplam hacim	6.0

❖ Karışım A ve B birleştirilerek 42°C'de 30 dk bekletildi

❖ En son olarak enzim inaktivasyonu için 95°C'de 3 dk tutuldu.

Klasik PCR Karışımı hazırlanması: Her bir örnek için son hacim 20 µl

Miks	
Solüsyon	Miktar (µl)
2X PCR solüsyonu (fermentas kat no: K1071)	10
Örnek cDNA'sı (1/30 sulandırılmış cDNA'dan)	4
Primer F/R (10µM)	0.3
dH_2O	5.7
Toplam	20

Karışımlar hazırlandıktan sonra örnekler PCR cihazına yerleştirilerek PCR programı uygulandı. Kullanılan gen ve primer listesi çizelge 2.1'de verilmiştir.

❖ **PCR Programı**

95°C 5dk 1 döngü

95°C 45 sn
68°C-1 30 sn } 15 döngü
95°C 30 sn

95°C 45 sn
52°C 30 sn } 30 döngü
72°C 30 sn

72°C 5 dk 1 döngü

Kullanılan PCR cihazı Bio-Rad MyCycler

Çizelge 2.1. Kordoma ve Nükleus pulposus dokularının doğrulanması için kullanılan genlere özel primer dizilimleri. (Kısaltmalar CH: Kordoma dokusu, NP: Nükleus pulposus dokusu)

Gen İsmi mRNA kodu	Primer Dizilimi	Ürün Büyüklüğü	Primer Tasarımı	Doku
EMA	F 5' CTCAGACGTCAGCGTGAGTG 3'	277bç	Tez sahibi	CH/NP
	R 5' GGGGCTACGATCGGTACTGC 3'			
Galektin-3	F 5' TCTTCTGGACAGCCAAGTGC 3'	204bç	Tez sahibi	CH
	R 5' GTGGAAGGCAACATCATTCC 3'			
E-kaderin	F 5' GTCACGCTGAATACAGTGGG 3'	251bç	Tez sahibi	CH
	R 5' GCTCCTTGGCCAGTGATGCT 3'			
Vimentin	F 5' CTCTACGAGGAGGAGATGCG 3'	220bç	Tez Sahibi	CH/NP
	R 5' GTTCAAGGTCAAGACGTGCC 3'			
CD24	F 5' GCCAGTCTCTTCGTGGTCTC 3'	142bç	Tez Sahibi	CH/NP
	R 5' CCTGTTTTTCCTTGCCACAT 3'			
CD44	F 5' ACTGCAGCCAACTTCCGAGG 3'	260	Tez Sahibi	CH
	R 5'GGAATACACCTGCAAAGCGG			
Sitokeratin-19	F 5' CTGGTACCAGAAGCAGGGGC 3'	190bç	Tez Sahibi	CH/NP
	R 5' CATGCGCAGAGCCTGTTCCG 3'			
c-met	F 5' GGCTGGTGCCACGACAAATG 3'	276bç	Tez Sahibi	CH
	R 5' CATGGCAGGACCAACTGTGC 3'			
Brachyury	F 5' TGCTTCCCTGAGACCCAGTT 3'	121bç	Tez Sahibi	CH
	R 5' GATCACTTCTTTCCTTTGCATCAA 3'			
GAPD	F 5' CCATCTTCCAGGAGCGAGATC 3	227bç	Tez Sahibi	CH/NP
	R 5' GGCATTGCTGATGATCTTGAGG 3'			

2.4. Mikroçip Çalışması

Kordoma ve nükleus pulposus dokularındaki miRNA ekspresyon profilinin belirlenmesi için agilent marka mikroçipler (Agilent Human miRNA Microarray Kit Ver. 3.0, 8x15K, 3 slides/kit kat no: AGT-G4470C) kullanıldı. Mikroçiplere örneklerin hibridizasyonları için yine üretici firmanın sarf malzemeleri (Agilent miRNA Complete Labeling Reagent and Hybridization kat no:AGT-5190-0456) kullanıldı (Bkz. Protokol 7).

Çalışma kapsamında Agilent firması tarafından oldukça hassas bir teknoloji kullanılarak hazırlanan mikroçipler kullanılmış olup bu mikroçipler 962 insan ve 69 insan viral miRNA'larını içermektedir. Bu mikroçiplerde 40-60 mer oligonükleotit problar SurePrint teknolojisi ile özel olarak kodlanmış cam lamlar üzerine hassas bir şekilde basılmıştır. Ayrıca probların 5' ucuna G ve hibridizasyon sırasının 3' ucuna da C residüsü işaretleme sırasında ilave edilerek doğru miRNA ya bağlanma özelliği artırılmıştır. Bu durum 1 nükleotidden fazla değişiklik gösteren miRNA'larda yanlış pozitif bağlanma ihtimalini anlamlı olarak azaltmıştır (<1%). Üstelik her probdan birden fazla basılı olması ve kontrol problarının varlığı tek nükleotid değişiklik gösteren miRNA'ların bile ayrımını analiz sırasında yapabilme yeteneği vermiştir. Kontrol probları sayesinde veri normalizasyonu ve deneyler arasındaki sonuçları karşılaştırmada kolaylık sağlanmıştır. Çift kanallı Axon lazer tarayıcı ile işaretlenen ve hibridize olan mikroçipler tarandıktan sonra her noktadaki sinyal yoğunluğu GenePix (Axon GenePix 2010) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Veri analizi: Veriler elde edildikten sonra, mikroçipler normalize edilmiştir. Bu sayede örnekler arasında kantitatif bir karşılaştırma olanağı olmuştur. Veri analizi için mikroçipler üzerindeki kontrol noktalarından alınan veriler normalize edilmiştir. Mikro için verileri için arka plan sinyal yoğunluk ortalamaları LOWESS normalizasyon metodu ile GeneSpring yazılım programı (Agilent technologies, CA) kullanılarak analiz edilmiştir (Agilent GeneSpringGX10 2010).

Protokol 7. Mikroçip hazırlanması ve okutulması

- 2 µl örnek RNA'sı (50 ng/µl) 1.5 ml'lik tüplere konuldu.

- Miks A her bir örnek için hazırlandı ve 1.5 ml'lik örnek RNA'ların olduğu tüpe eklendi.

Karışım A	
Solüsyon	Miktar (µl)
10X Calf Intestinal Fosfataz Buffer	0.4
Labeling Spike In	1.1
10X Calf Intestinal Fosfataz	0.5
Toplam hacim	2.0

- Karışım narin bir şekilde pipetlendi ve 37°C'de30 dk ısı bloğunda bekletildi.

- İnkübasyonun ardından örnek üzerine 2.8 µl %100 DMSO eklendi ve 100°C'de 7 dk bekletildi.

- Bu İnkübasyonun ardından örnekler hemen buz içerisine alındı ve 4.5 µl Miks B eklendi.

Karışım B	
Solüsyon	Miktar (µl)
10X T4 RNA Ligaz Tampon	1
Cy3	3
T4 RNA ligaz	0.5
Toplam hacim	4.5

- Toplam 11.3 µl olan bu karışım narin bir şekilde pipetlenerek 16°C'de 2 saat inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından örnekler vakum kurutma cihazında (eppendorf vakum konsantratör) 55°C'de 3-6 saat kurumaya bırakıldı.

- Örnekler tamamen kuruduktan sonra 18 µl dH_2O ile sulandırıldı.

- Sulandırılan örnekler üzerine 4.5 µl 10X GE Bloklama Solüsyonu ve 22.5 µl 2X Hi-RPM hibridizasyon tamponu eklendi. Karşım dikkatli bir şekilde pipetlendi.

- 45 µl'lik bu karışım 100°C'de 5 dk inkübe edildi ve süre sonunda örnekler hemen buz üzerine alındı. Hızlı bir şekilde santrifüj edilerek buharlaşarak kapakta kalan solüsyonun indirilmesi sağlandı.

- Buz içinde bekletilen örnekler chamber slide (Agilent Microarray Hybridization Chamber kat no: G2534A) içine yerleştirilmiş gasket lam (Agilent Pack of 5 Backings, 8 arrays/slide kat no: AGTG2534-60014) üzerine dikkatli bir şeklide pipetlendikten sonra yine çok dikkatli bir şekilde mikroçipler üzerine kapatıldı ve chamber slide kilitlendi.

- Chamber Slide hibridizasyon için Hibridizasyon fırınına (Agilent Hybridization Owen) konarak 55°C'de 20 saat inkübasyona bırakıldı.

- Hibridizasyon süresinin sonunda chamber slide açıldı.

- Gasket slide ve mikroçip yıkama solüsyonu I (Agilent Gene Expression Wash Pack kat no: AGT-5188-5327) içinde dikkatli bir şekilde ayrıldı.

- Mikroçip başka bir yıkama solüsyonu I içinde 5 dk bekletildi.

- Yıkama solüsyonu I'den çıkarılan mikroçip öncede 37°C'de ısıtılmış yıkama solüsyonu II içine konularak 5 dk 37°C'de düşük hızda çalkalanarak inkübe .

- İkinci yıkamanın ardından mikroçip çok yavaş bir şekilde yıkama solüsyonu II içinden penset yardımıyla çıkarıldı. Bu şekilde mikroçip, mikroçip okuyucu cihazda taranmaya hazırdı.

2.5. Real time PCR çalışması

Mikroçipten elde edilen verilerin analizinden sonra bu verilerin doğruluğunu belirlemek için analiz sonrası kordoma dokuları ile nükleus pulposus dokuları arasında ekspresyon farkı olduğu bulunan 4 adet miRNA'nın ekspresyon seviyesine bağıl kantitasyon ve Sybr yeşili yöntemi kullanılarak incelendi (Bkz. Protokol 8).

Protokol 8. Real-time PCR

A) cDNA Eldesi

CDNA eldesi için ticari kit (Exiqon kat no: 203300) kullanıldı. Bunun için**;**

- Karışım-A solüsyonu hazırlandı.

Karışım A		
Solüsyon	**Hacim (µl)**	**Son Konsantrasyon**
5X Reaksiyon Tamponu	4	1X
Enzim Miksi	2	1X
RNA	14	25 ng- 1786 ng/ µl
Toplam	20	

- Isı bloğunda 42°C'de 60 dk inkübasyon edildi.
- İnkübasyonun ardından karışım ısı bloğunda 95°C'de enzim inaktivasyonu için bekletildi.

Real-Time PCR Protokolü

Karışım-B solüsyonu hazırlandı.

Karışım-A		
Solüsyon	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
2X Sybr Yeşili Reaksiyon Tamponu	10	1X
Primer Miksi	2	1X
cDNA (1/200 sulandırılmış)	8	
Toplam	20	

- Hazırlanan bu karışım narin bir şekilde pipetlenerek 96 kuyucuklu PCR pleytine (Roche kat no: 04729692001) yerleştirilerek PCR programı (Roche 480) başlatıldı.

Real-Time PCR Programı

95°C 10dk 1 döngü

95°C 45 sn
60°C 60 sn } 45 döngü (her döngüde optikal okuma)

60°C'den 95°C'ye 1 döngü (erime ısısı döngüsü her 0.5 derecede optikal okuma)

Real-time PCR için kullanılan primer bilgileri

- Kat no: 203300 Universal cDNA Synthesis Kit, 16-32 rxns (miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit)

- Kat no: 203450 SYBR® Green master mix (Universal RT, 2.5ml miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, SYBR® Green master mix, 250 rxns)

- Kat no: 204551 hsa-miR-222, LNA PCR primer set, (UniRT miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set, 100 rxns)

- Kat no: 204304 hsa-miR-140-3p, LNA PCR primer set, (UniRT miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set, 100 rxns)

- Kat no: 204121 hsa-miR-148a, LNA PCR primer set, (UniRT miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set, 100 rxns)

- Kat no: 203906 5S rRNA (hsa) PCR primer set,

Elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak analiz edildi. Real-time PCR işlemi sırasında PCR işleminin verimliliğinin test edilmesi için spike kontrolü ve primeri kullanılmıştır. Normalizasyon içinse hsa-miR-5S kontrol olarak eklenmiştir.

2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan mikroçip ve real-time PCR analizleri sonrası elde edilen veriler t-test parametrelerine göre değerlendirilmiştir ve bu değerlendirmelerde GeneSpring yazılım programından faydalanılmıştır (Agilent GeneSpringGX10 2010) .

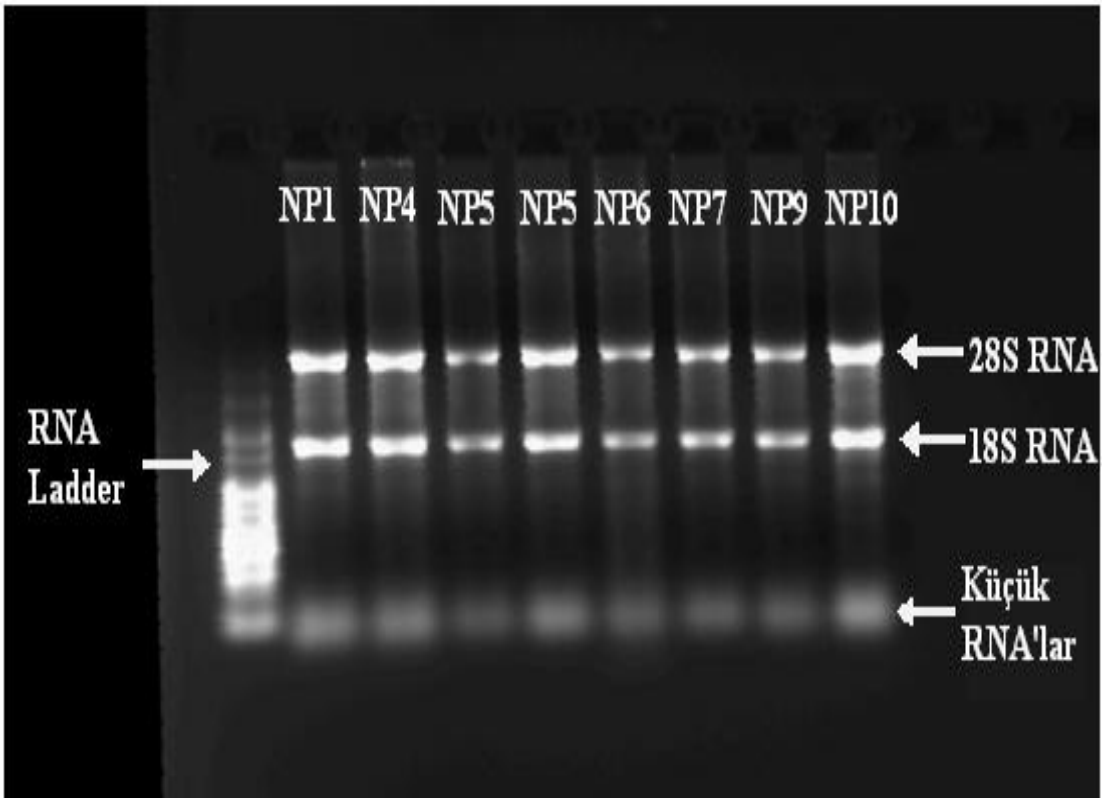
3. BULGULAR

3.1. RNA izolasyon Bulguları

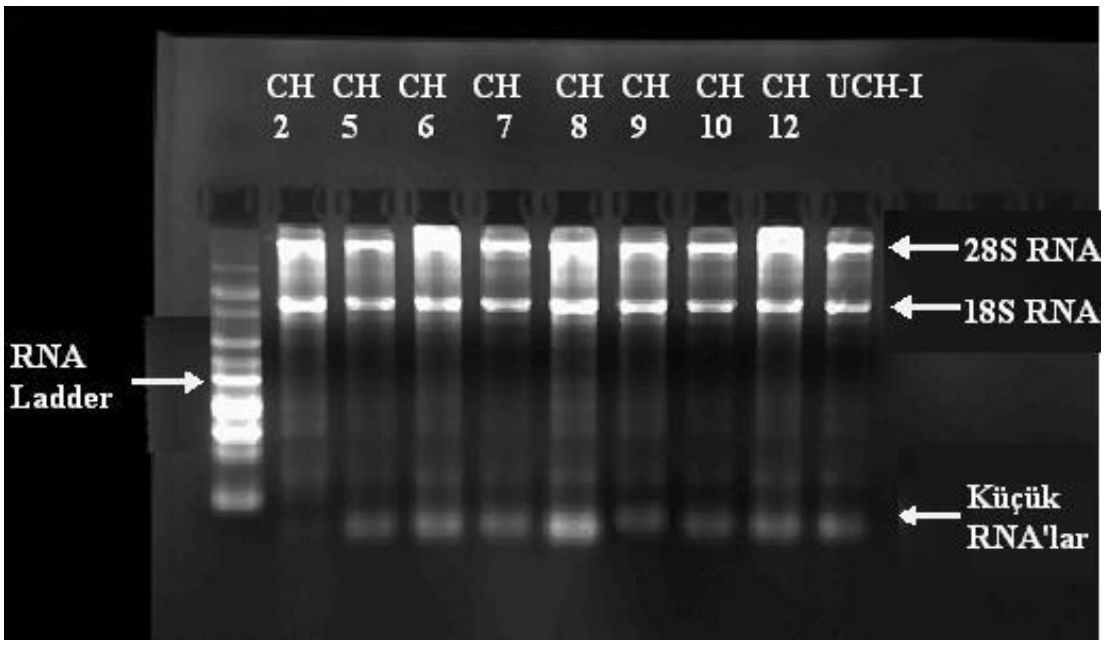
Doku ve hücre kültürlerinden trizol yöntemi kullanılarak izole edilen RNA'ların UV. Spektrofotometre (Implen NanoPhotometer™ UV/Vis spectrophotometer) kullanılarak RNA miktarı ve RNA saflığı ölçülmüştür. Miktar tayini yapılan RNA'lar MOPS solüsyonu kullanılarak agaroz jelde yürütülmüştür. Yapılan bu deney sonuçları Çizelge 3.1 ve Resim 3.1 ve Resim 3.2'de sunulmuştur. Deney sonuçlarına göre; RNA saflığı, protein kontaminasyon oranı ve jelde miRNA'nın sağlıklı olarak görüntülenmesi gibi parametreler göz önüne alınarak 8 kordoma dokusu ve 8 nükleus pulposus örneği ve UCH-I hücre hattına ait RNA bir sonraki deney olan mikroçip deneyi için kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan dokular ve RNA'larına ait bilgiler.

Doku Çeşidi	İsim	Cinsiyet	Yaş	Doku Menşei	Primer/ Rekürens	RNA miktarı ng/µl	A260/A280 oranı	A260/A230 oranı
Kordoma	CH2	Erkek	27	Klivus	Primer	132	1,9	1,9
Kordoma	CH5	Kadın	28	Klivus	Primer	157	1,9	1,7
Kordoma	CH6	Kadın	63	C2	Primer	175	1,8	1,8
Kordoma	CH7	Kadın	15	Klivus	Primer	169	1,9	1,9
Kordoma	CH8	Kadın	50	C1	Primer	167	1,7	1,6
Kordoma	CH9	Kadın	21	Klivus	Primer	321	1,8	1,9
Kordoma	CH10	Kadın	28	C3	Primer	463	1,7	1,7
Kordoma	CH12	Erkek	32	C2	Primer	160	1,9	1,8
Kordoma hücre hattı	UCH-I					193	1,9	1,9
Nükleus Pulposus	NP1	Kadın	67	L1		146	1,7	1,9
Nükleus Pulposus	NP4	Kadın	46	L4		52	1,7	1,9
Nükleus Pulposus	NP5	Erkek	56	L2		56	1,9	1,8
Nükleus Pulposus	NP6	Erkek	30	L4		246	1,7	1,7
Nükleus Pulposus	NP7	Erkek	42	L2		379	1,9	1,8
Nükleus Pulposus	NP9	Kadın	82	L2		147	1,8	1,8
Nükleus Pulposus	NP10	Erkek	28	L4		60	1,9	1,7
Nükleus Pulposus	NP14	Erkek	69	L1		53	1,9	1,7



Resim 3.1. MOPS tampon ile agaroz jelde yürütülmüş nükleus pulposus RNA örnekleri.

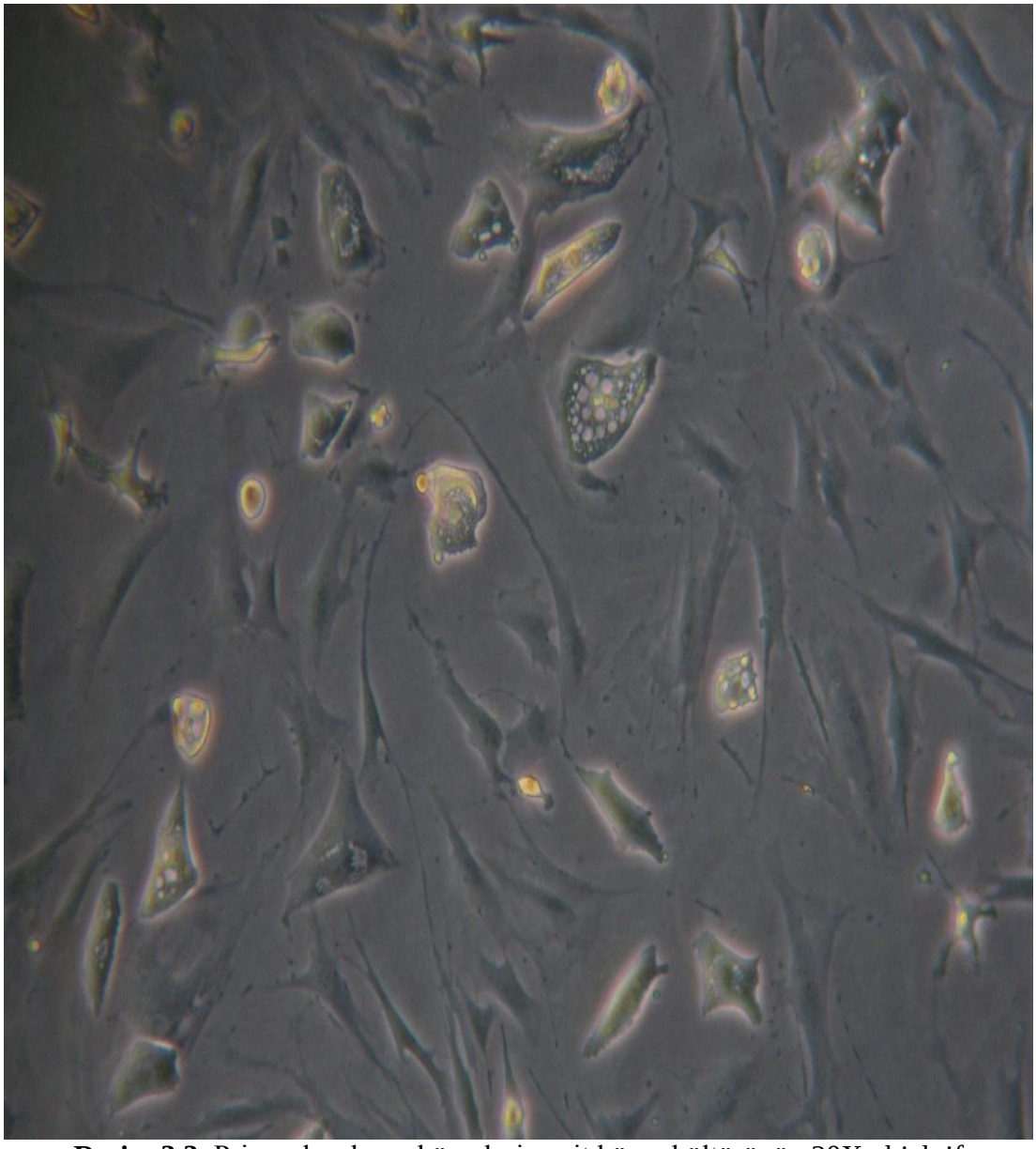


Resim 3.2. MOPS tampon ile agaroz jelde yürütülmüş kordoma RNA örnekleri.

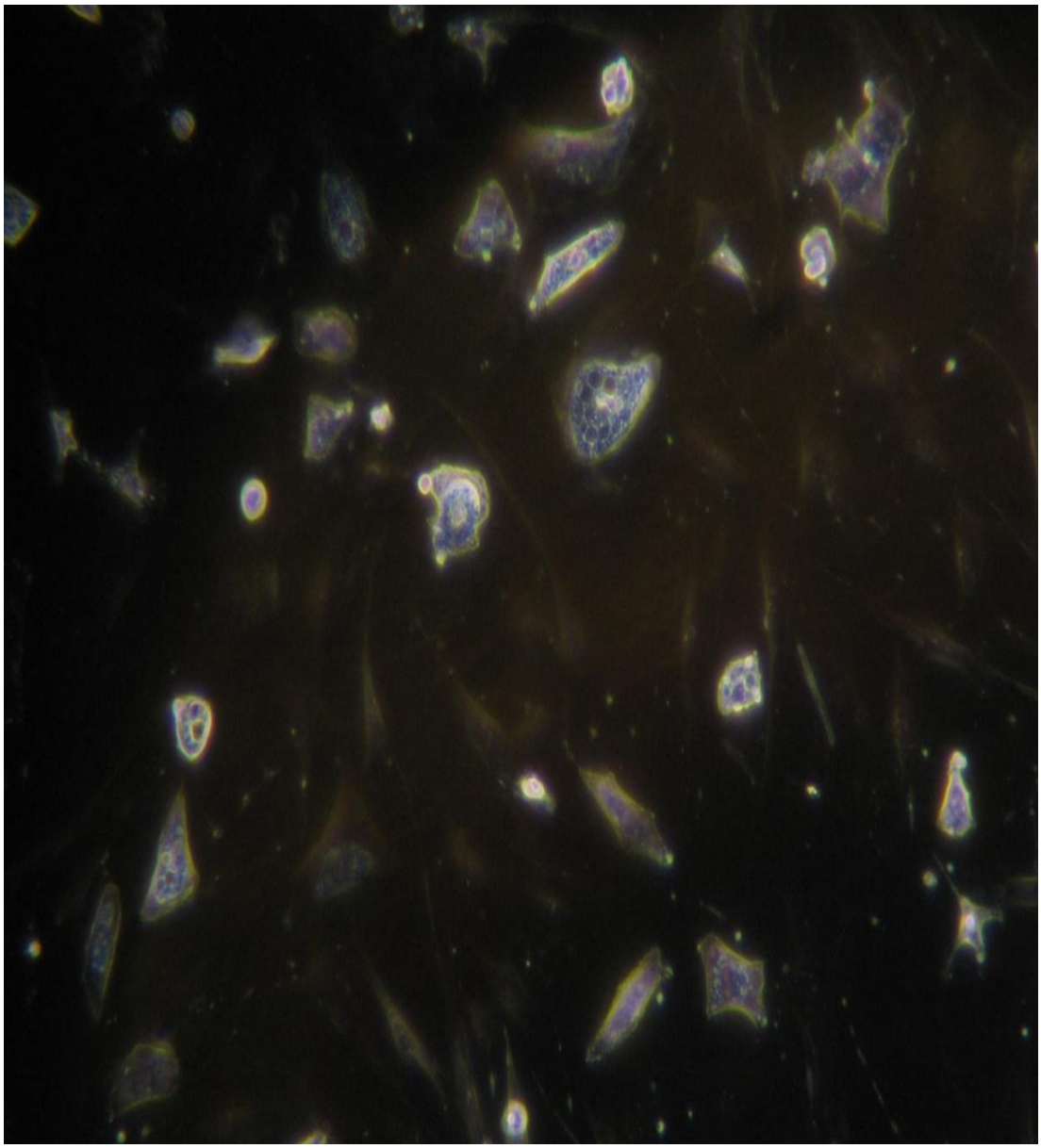
3.2. Hücre Kültür Bulguları

Yapılan hücre izolasyonu yönetimi ardından hücre kültür flasklarında büyütülen kordoma hücreleri primer kültür olarak başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Primer kültürlerdeki fizaliferöz hücre yapısı mikroskopla gözlenmiştir (Resim 3.3-Resim 3.4). Primer hücre kültürüne devam edilmesinin ardından mikroskobik olarak fizaliferöz hücre yapısı 4. pasajla birlikte ortadan kalktığı gözlemlenmiştir ve devam ettirilememiştir (Resim 3.5). Primer kültür izolasyonlarında kordoma hücrelerinin yanı sıra tümör dokusundaki fibroblast hücrelerininde dokudan izole edilmesi nedeniyle in-vitro ortamda fibroblast hücrelerin baskın hale gelmesiyle kordoma hücre hattı oluşturulamamıştır.

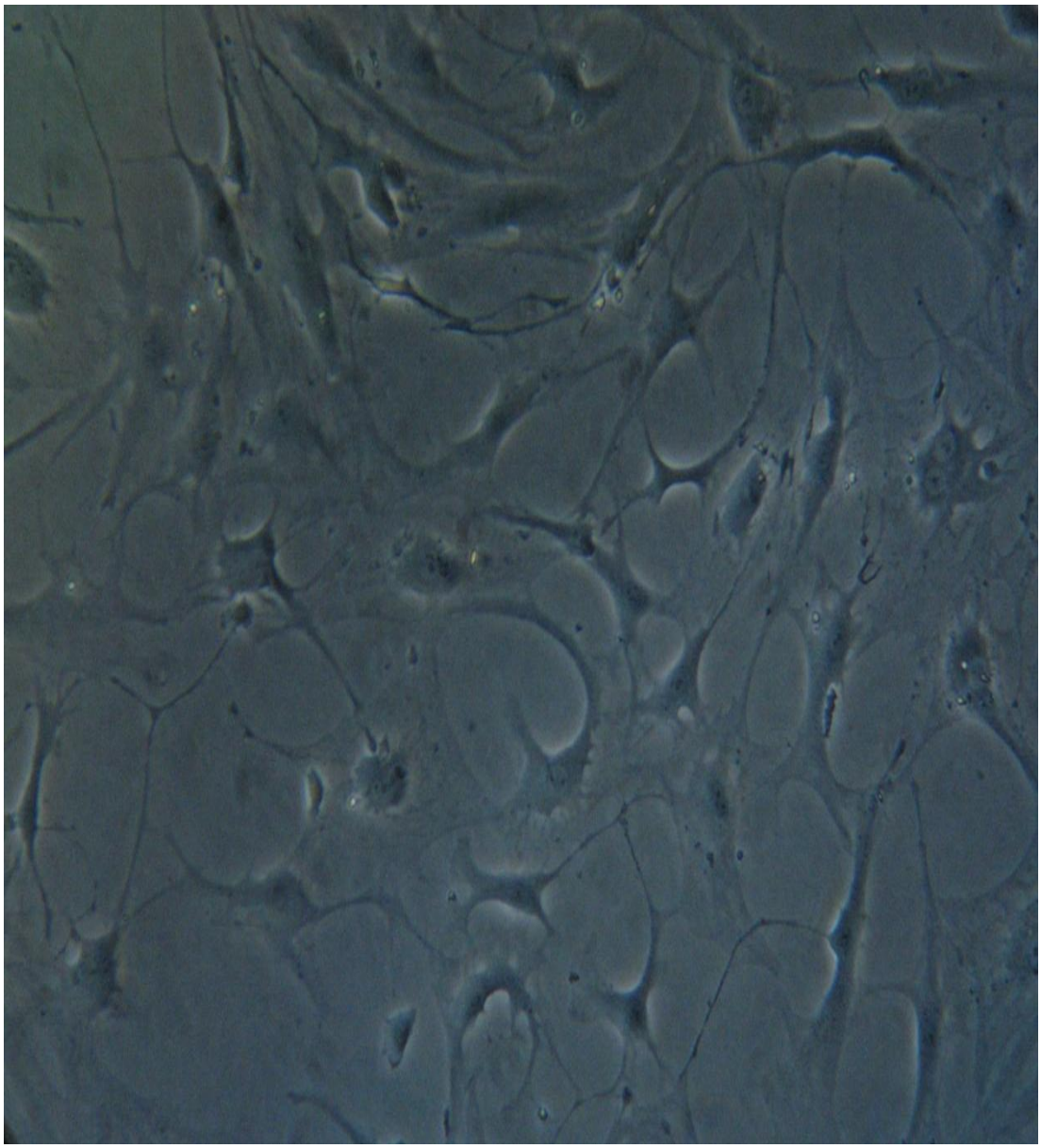
Nükleus pulposus dokularından izole edilen uygulamış olduğumuz primer kültürlerde oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu kültürlerden ilk pasajın ardından hücrelerden RNA izolasyonu yapılmış ve başarılı bir şekilde RNA'lar izole edilmiştir (Resim 3.6).



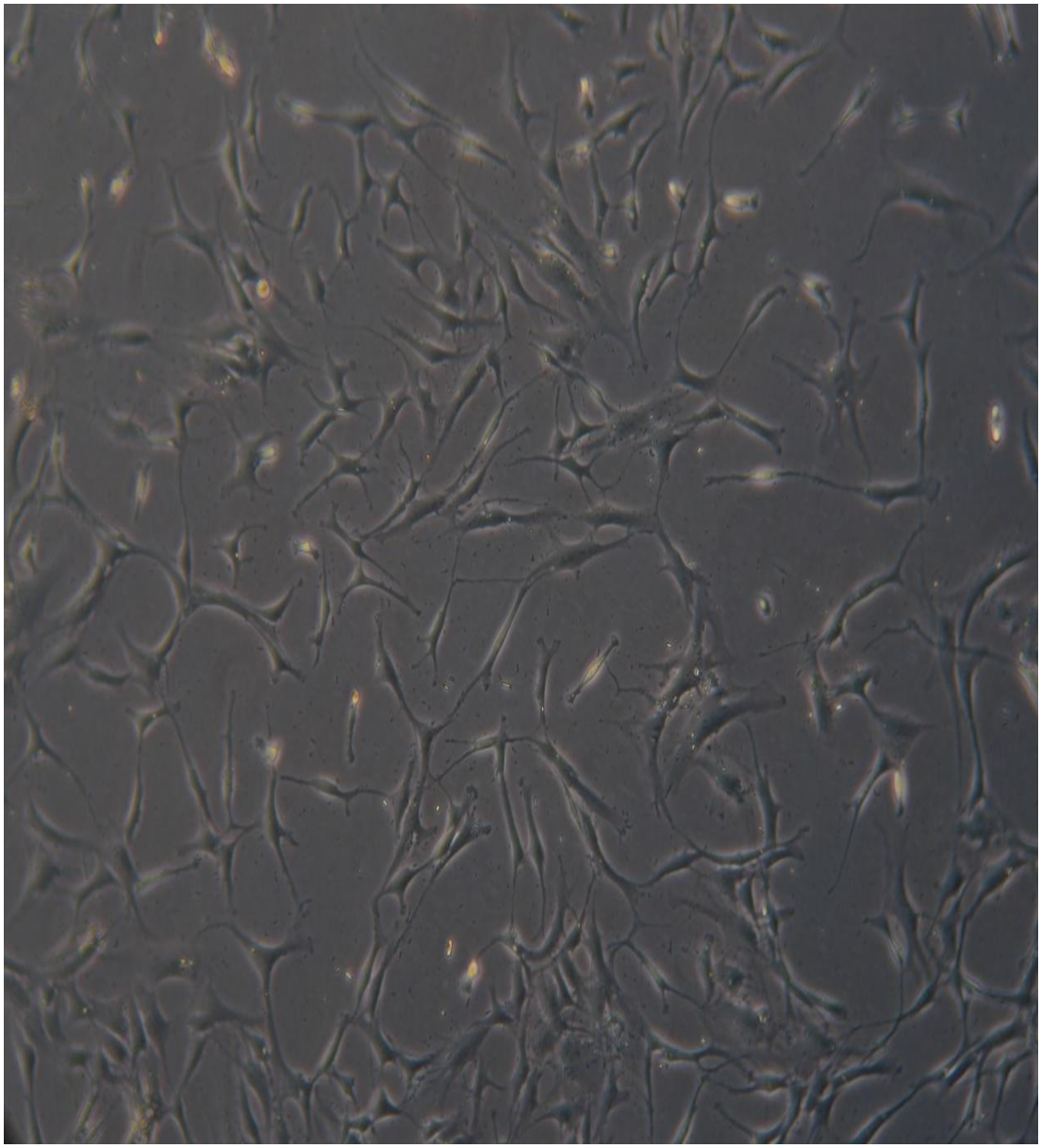
Resim 3.3. Primer kordoma hücrelerine ait hücre kültürünün 20X objektif kullanılarak çekilmiş fotoğrafı (200X büyütme).



Resim 3.4. Primer kordoma hücrelerine ait hücre kültürünün mikroskobun faz-kontrast filtresiyle 20X objektif kullanılarak çekilmiş fotoğrafı (200X büyütme).



Resim 3.5. Kordoma hücrelerine ait 4. pasaj (20X objektif kullanılarak 200X büyütme yapılmıştır.).

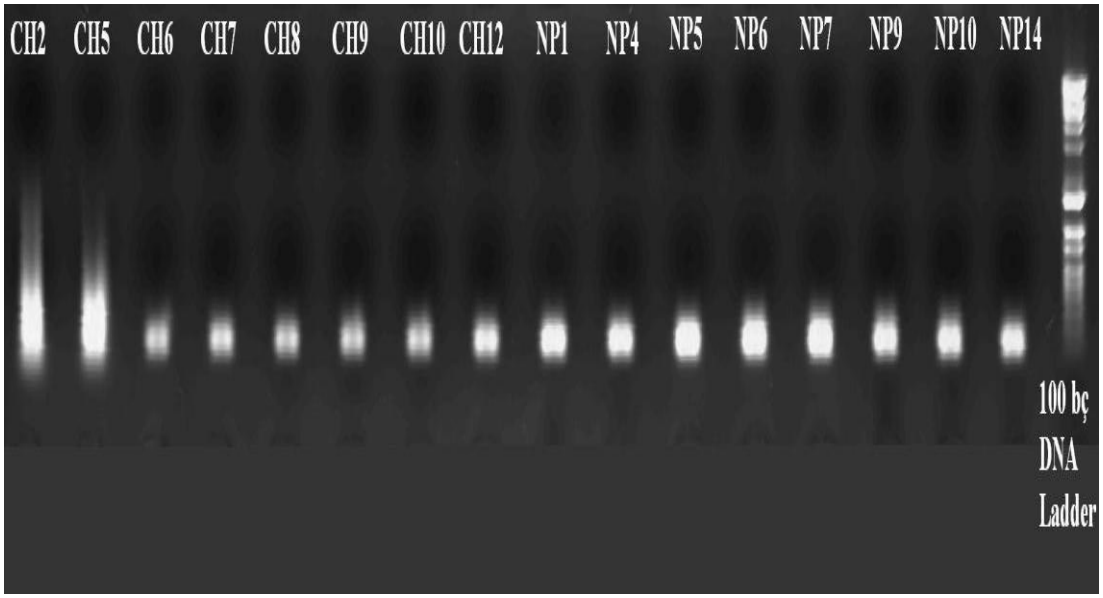


Resim 3.6. Primer nükleus pulposus hücre fotoğrafı (10X objektif kullanılarak 100X büyütme yapılmıştır.).

3.3. Klasik PCR Bulguları

Klasik PCR yöntemi ile yapılan kalitatif gen ekspresyon analizi bulguları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Yapılan PCR işleminde kontrol gen olarak GAPDH (Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz) geni kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre literatürde kordomalarda yüksek miktarda ekspresyonu gösterilen bütün genler ilk defa bu çalışma kapsamında aynı anda gösterilmiştir. Klasik PCR ile yapılan çalışmada kontrol olarak kullanılan GAPDH geni ekspresyonu bütün dokularda gösterilmiştir (Resim 3.7).

Literatür çalışması sonucu belirlenen genlerin kalitatif analizi bütün kordoma ve nükleus pulposus dokuları için aynı gen ekspresyon profilini vermiştir.



Resim 3.7. Kalitatif gen ekspresyonu için kullanılan cDNA'lar (GAPDH primerleri ile PCR'da çoğaltıldıktan sonra %2 agaroz jelde yüklenmiş 100V 45 dk yürüterek U.V. translüminatör'de görüntülenmiştir).

Çizelge 3.2. Klasik PCR tabanlı yapılan çalışmalarda gen ekspresyonları kalitatif olarak analiz sonuçları (Ç.Y. çalışma yapılmadı).

İsim	EMA	Galektin-3	E-kaderin	Vimentin	CD24	CD44	Sitokeratin -19	c-met	Brachyury
CH2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UCH-I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NP1	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP4	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP5	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP6	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP7	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP9	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP10	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-
NP14	+	+	Ç.Y.	+	+	Ç.Y.	Ç.Y.	Ç.Y.	-

3.4. Mikroçip Deney Bulguları

Cy3 floresans boyası ile işaretlenip hibridize edilen mikroçipler çift LASER'li mikroçip okuyucu (axon 4100FA) cihazda taranmıştır. İşaretli prob uçlarındaki Cy3 boya yoğunluğuna bağlı olarak elde edilen TIFF görüntüsü mikroçip okuyucu cihazın yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analiz esnasında arka plan sinyal yoğunluğu baz alınarak sinyal normalizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir noktaya ait sinyal haritası Agilent firması tarafından sağlanan veri vasıtasıyla GenePix yazılımına yüklenerek sinyal anlamlandırmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu analiz ardından sinyal temizlenmesi yapılmış ve anlamsız sinyaller daha sonra analiz edilmemek üzere çıkarılmıştır. Bu işlemler sonrası GPS formatında elde edilen veri yine GenePix yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve bu analiz sonucu olarak her bir nokta için Cy3 floresans boyasına bağlı olarak anlamlandırılmış noktalardaki sinyal yoğunlukları belirlenerek GPR dosyaları elde edilmiştir. Bu GPR dosyaları biyoinformatik yazılım olan ve mikroçip verilerinin analizi için kullanılan agilent firması tarafından geliştirilen GeneSpringGX programı kullanılmış ve belirli istatistik değerler kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yazılım için öncelikle GPR dataları yazılıma tanıtıldı. Yazılımın GPR dosyalarını tanıması için mikroçipin hangi noktasında hangi proba ait sinyal bilgisinin olduğunu gösteren ve yine Agilent firması tarafından sağlanan gal formatlı dosya yazılama yüklendi. Tüm bu işlemler ardından her bir örneğe ait GPR formatında olan dosyalar nükleus pulposus (kontrol dokusu-np) ve kordoma dokusu (karşılaştıracak doku-ch) olarak gruplandırıldı. Yapılan gruplandırmalar ardından her bir GPR verisinde bulunan kontrol noktalarındaki Cy3 floresans sinyal yoğunluğu kullanılarak örnekler arası normalizasyonlar LOWESS yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu sayede her bir örnek diğer örneklerle göreceli olarak kıyaslanabilme imkânı sağlanmıştır.

GeneSpring analiz yazılımı; veri analizi için kullanılırken örnek gruplandırmasının ardından yüzdelik örtüşme özelliği ve örnek sinyal noktası (treshold) en az bir seçilerek yapıldı. Örnek analizleri gerçekleştirilirken mikroçip üzerine yazılmış problardaki tekrar noktaları göz önüne alınarak her prob için ortalama değer analiz için kullanıldı. Yapılan bu analizlerde kontrol dokularındaki

bütün değerlerin ortalaması alınarak kordoma dokularındaki ortalama değerlerden çıkarılarak sonuçlar elde edildi. Elde edilen bu sonuçlar kordoma dokularının bir grup olarak nükleus pulposus doku grubuna karşı ekspresyon analizi yapılmıştır. Yapılan bu analizde dokular arasında ki ekspresyon kat farkı olarak 2 belirlenmiştir. Bu şekilde yapılan analizde kordoma ve nükleus pulposus dokuları arasında 2 kat üzerinde ekspresyon seviyesi farklılığı gösteren 91 adet miRNA tespit edildi (Çizelge 3.3) (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3).

GeneSpring veri analiz programından elde edilen sonuçlar, Baylor Üniversitesi öğretim görevlisi biyoistatistikçi Yrd. Doç. Dr. Chad Creighton tarafından yapılan analizlerde doğrulanmıştır.

Çizelge 3.3. GeneSpring yazılımında kat farkı 2 seçildiğinde belirlenen 91 adet miRNA'ya ait kat farkını gösteren sonuçlar.

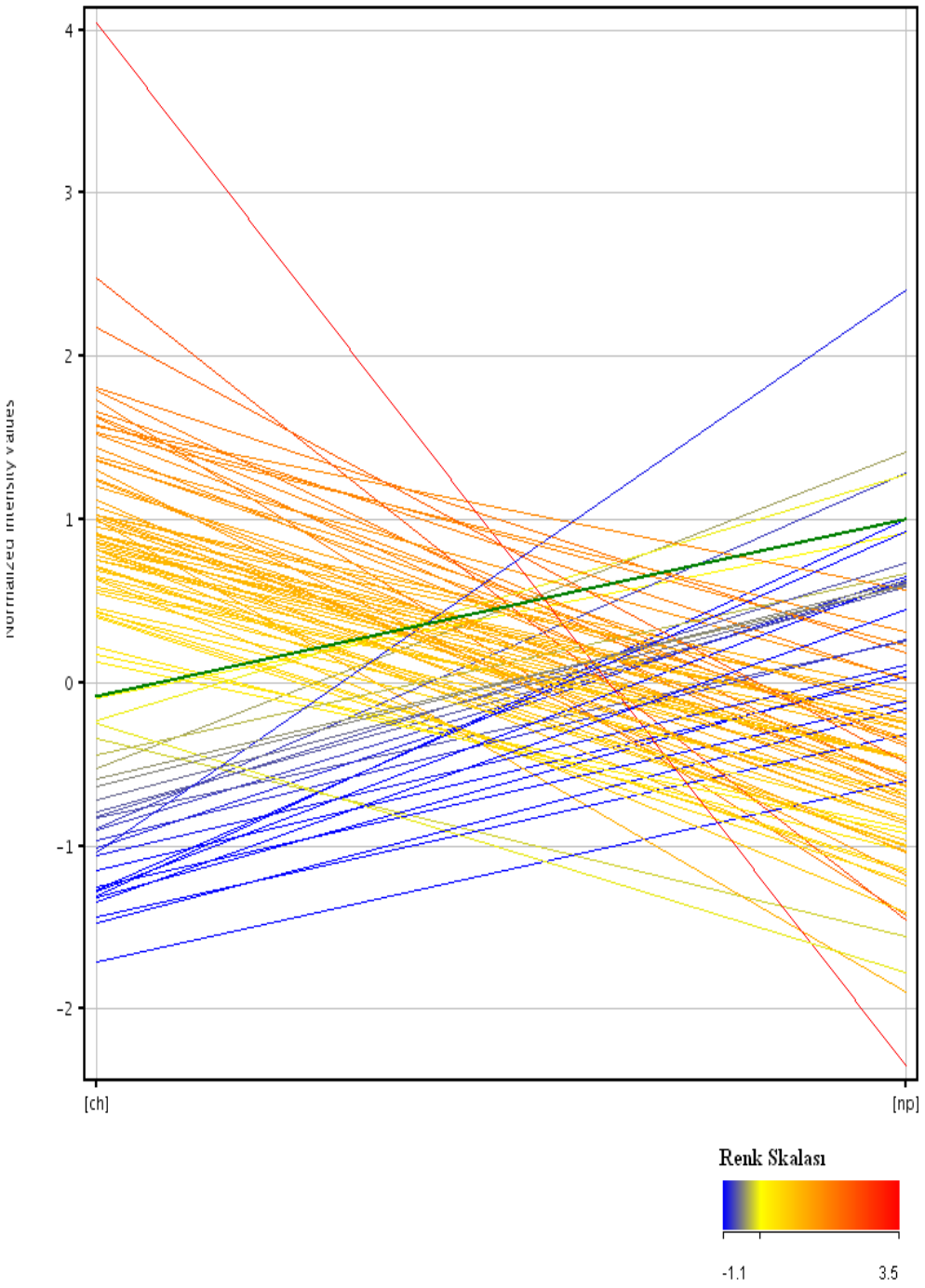
miRNA İsmi	Kat Değişim değeri([ch]/[np])	Kordomalardaki Miktarı
hsa-miR-222	-46	düşük
hsa-miR-31*	-38	düşük
hsa-miR-376a	-35	düşük
hsa-miR-127-3p	-32	düşük
hsa-miR-136	-29	düşük
hsa-miR-381	-29	düşük
hsa-miR-196a	-28	düşük
hsa-miR-377	-26	düşük
hur_1	-26	düşük
hsa-miR-654-3p	-25	düşük
hsa-miR-720	-25	düşük
hsa-miR-409-3p	-23	düşük
hsa-miR-100	-23	düşük
hsa-miR-1274b	-22	düşük
hsa-miR-1274a	-22	düşük
hsa-miR-1260	-22	düşük
hsa-miR-379	-21	düşük
hsa-miR-513c	-20	düşük
hsa-miR-31	-11	düşük
hsa-miR-221	-5	düşük
hsa-miR-138	-5	düşük
hsa-miR-376c	-4	düşük
hsa-miR-431*	-2	düşük
hsa-miR-21*	-2	düşük
hsa-miR-196b	-2	düşük
hsa-miR-25	238	Yüksek
hsa-miR-424	74	Yüksek
hsa-miR-126	53	Yüksek
hsa-miR-1207-5p	50	Yüksek
hsa-miR-148a	45	Yüksek
hsa-miR-16	42	Yüksek
hsa-miR-630	41	Yüksek
hsa-miR-142-3p	40	Yüksek
hsa-miR-365	39	Yüksek
hsa-miR-26b	38	Yüksek
hsa-miR-150	37	Yüksek
hsa-miR-30b	37	Yüksek

Çizelge 3.3 (devam). GeneSpring yazılımında kat farkı 2 seçildiğinde belirlenen 91 adet miRNA'ya ait kat farkını gösteren sonuçlar verilmiştir.

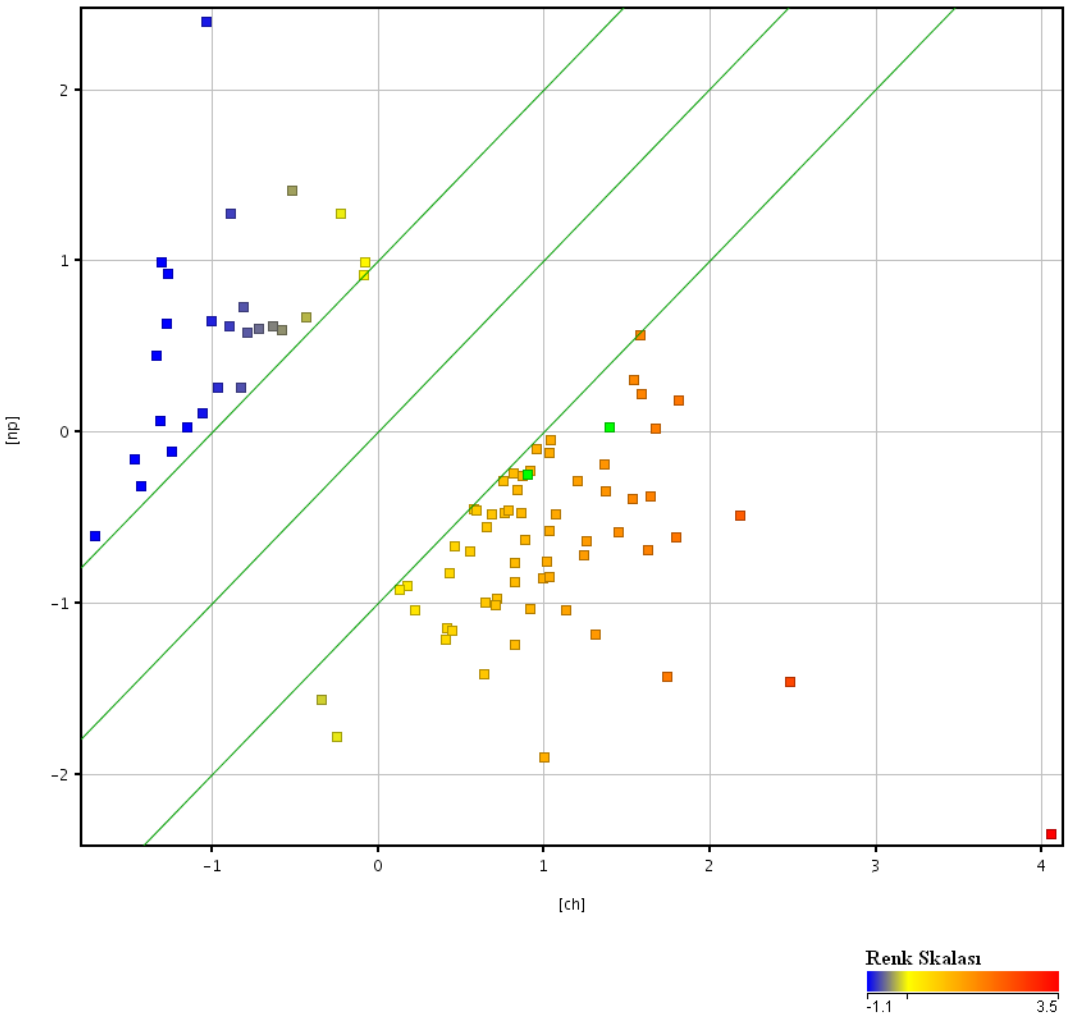
miRNA İsmi	Kat Değişim değeri([ch]/[np])	Kordomalardaki Miktarı
hsa-miR-483-5p	33	Yüksek
hsa-miR-1225-5p	32	Yüksek
hsa-miR-107	32	Yüksek
hsa-let-7d	31	Yüksek
hsa-miR-1202	31	Yüksek
hsa-miR-320c	31	Yüksek
hsa-let-7i	30	Yüksek
hsa-miR-1268	30	Yüksek
hsa-miR-134	29	Yüksek
hsa-miR-210	29	Yüksek
hsa-let-7f	29	Yüksek
hsa-miR-1246	28	Yüksek
hsa-miR-638	26	Yüksek
hsa-miR-26a	24	Yüksek
hsa-miR-148b	24	Yüksek
hsa-miR-181b	24	Yüksek
kshv-miR-K12-3	23	Yüksek
hsa-miR-342-3p	23	Yüksek
hsa-miR-34a	23	Yüksek
hsa-miR-363	23	Yüksek
hsa-miR-516a-5p	22	Yüksek
hsa-miR-1224-5p	22	Yüksek
hsa-miR-96	22	Yüksek
hsa-miR-142-5p	22	Yüksek
hsa-miR-204	22	Yüksek
hsa-miR-151-5p	21	Yüksek
hsa-miR-887	21	Yüksek
hsa-miR-765	21	Yüksek
hsa-miR-193b	20	Yüksek
hsa-miR-103	20	Yüksek
hsa-miR-1915	20	Yüksek
hsa-miR-140-3p	15	Yüksek
hsa-miR-140-5p	9	Yüksek
hsa-miR-451	8	Yüksek
hsa-miR-144	6	Yüksek
hsa-miR-181a	6	Yüksek
hsa-miR-195	4	Yüksek

Çizelge 3.3 (Devam). GeneSpring yazılımında kat farkı 2 seçildiğinde belirlenen 91 adet miRNA'ya ait kat farkını gösteren sonuçlar verilmiştir.

miRNA İsmi	Kat Değişim değeri([ch]/[np])	Kordomalardaki Miktarı
hsa-miR-486-5p	4	Yüksek
hsa-miR-99a	4	Yüksek
hsa-miR-497	3	Yüksek
hsa-miR-223	3	Yüksek
hcmv-miR-UL70-3p	3	Yüksek
hsa-miR-30c	3	Yüksek
hsa-let-7g	3	Yüksek
hsa-miR-15b	3	Yüksek
hsa-miR-671-5p	3	Yüksek
hsa-miR-340	3	Yüksek
hsa-let-7a	2	Yüksek
hsa-miR-331-3p	2	Yüksek
hsa-miR-320d	2	Yüksek
hsa-miR-29c	2	Yüksek
hsa-miR-374b	2	Yüksek



Şekil 3.1. GeneSpring yazılımından 2 kat değişimine göre analiz edildikten sonra ortaya çıkan 91 adet miRNA'nın çizgisel doğrular halinde düzenlenmiş olarak gösterilen şekil (Renk skalası kordomalardaki ekspresyon miktarını göstermektedir- ch: kordoma, np: nükleus pulposus).

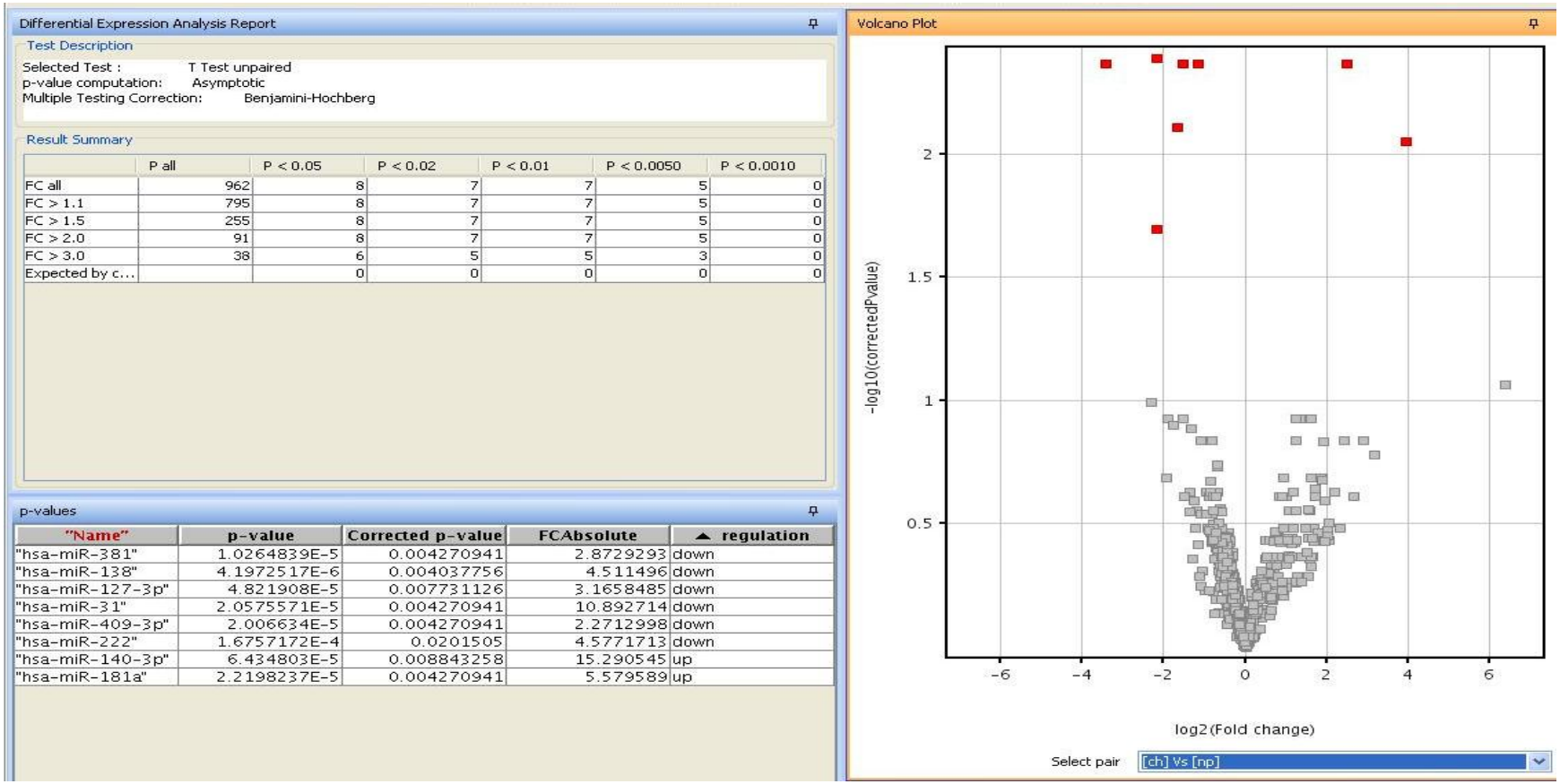


Şekil 3.2. GeneSpring yazılımından 2 kat değişimine göre analiz edildikten sonra ortaya çıkan 91 adet miRNA'nın verilerin noktalar halinde gösterimi (Renk skalası kordomalardaki ekspresyon miktarını göstermektedir- ch: kordoma, np: nükleus pulposus).

GeneSpring veri analiz yazılımı ile gerçekleştirilen verilerin istatistiksel anlamlılığın ortaya konması amacıyla elde edilen 2 kat üstü değerlerleri T Test yöntemi ile tekrar analizi yapıldı. Yapılan bu analizde veriler P 0.05 değerine göre sınıflandırılmış bu sınıflandırma ardından 8 miRNA belirlendi (Şekil 3.3).

Şekil 3.3'te gösterilen veriler P>0.05 aralığından P>0,001 aralığına kadar verilmiş olup bu sonuçlar elde edilen verilen güvenilirlik aralığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca şekil 3.3'te sol üst köşede verilen çizelgede kat değerleri 1.1'de başlayıp 3'e kadar devam etmektedir. Burada dikkat edilecek nokta mikroçip üstüne yazılan 962 miRNA verisi kordomalar ve nükleus pulposus dokuları arasındaki miRNA ekspresyon katları belirlendikçe düşmüştür.

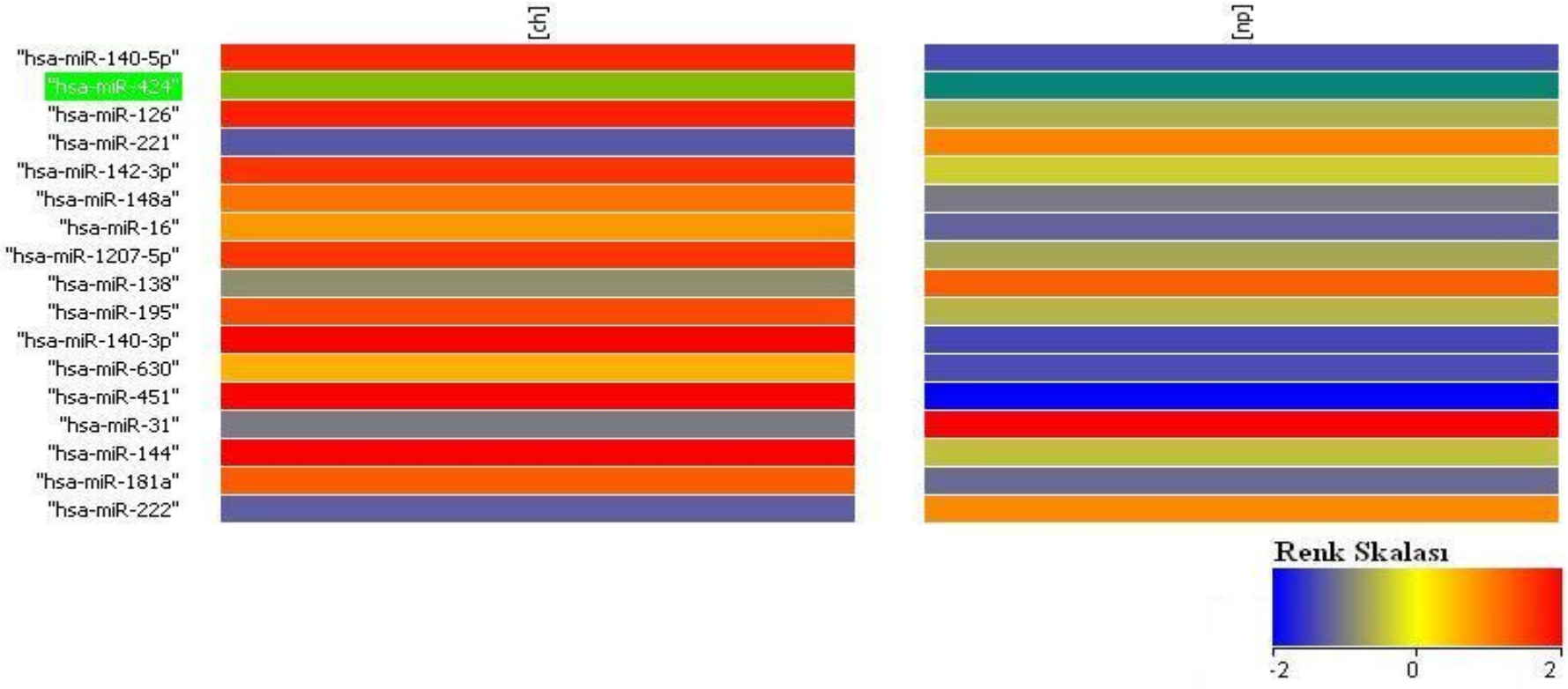
Yapılan analizlerin sadeleştirmesi ve mikroçip verilerinin doğrulanması amacıyla yapılacak olan real-time PCR için miRNA'ların belirlenmesi için GeneSpring'le yapılan analizlerde kordoma dokuları ile nükleus pulposus dokuları arasındaki miRNA ekspresyon kat farkı 4 olarak kullanılmıştır. Buna göre elde edilen veriler çizelge 3.4 ve şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Ekspresyon farklılığı istatistiksel analiz raporu (T test analizine bağlı olarak yapılan analizde şekil içinde FC olarak gösterilen değerler kat değişimini [fold change] göstermektedir. Kırmızı ile belirtilen noktalarda belirlenen 8 miRNA'yı göstermektedir.).

Çizelge 3.4. Mikroçip verisi (GeneSpring GX yazılımında ve miRNA ekspresyonun da kordomalar ile nükleus pulposus dokuları arasında 4 kat ve üzerinde ekspresyon farkı nükleus pulposus dokuları ortalamalarına göre değerlendirildikten sonra her bir doku için belirlenen verilere yer verilmiştir. Tabloda gösterilen çift kalın çizginin üzerindeki veriler kordomalarda yüksek miktarda sentezlenen miRNA'lar çift çizginin altında ise düşük miktarda sentezlenen miRNA'lar verilmiştir.).

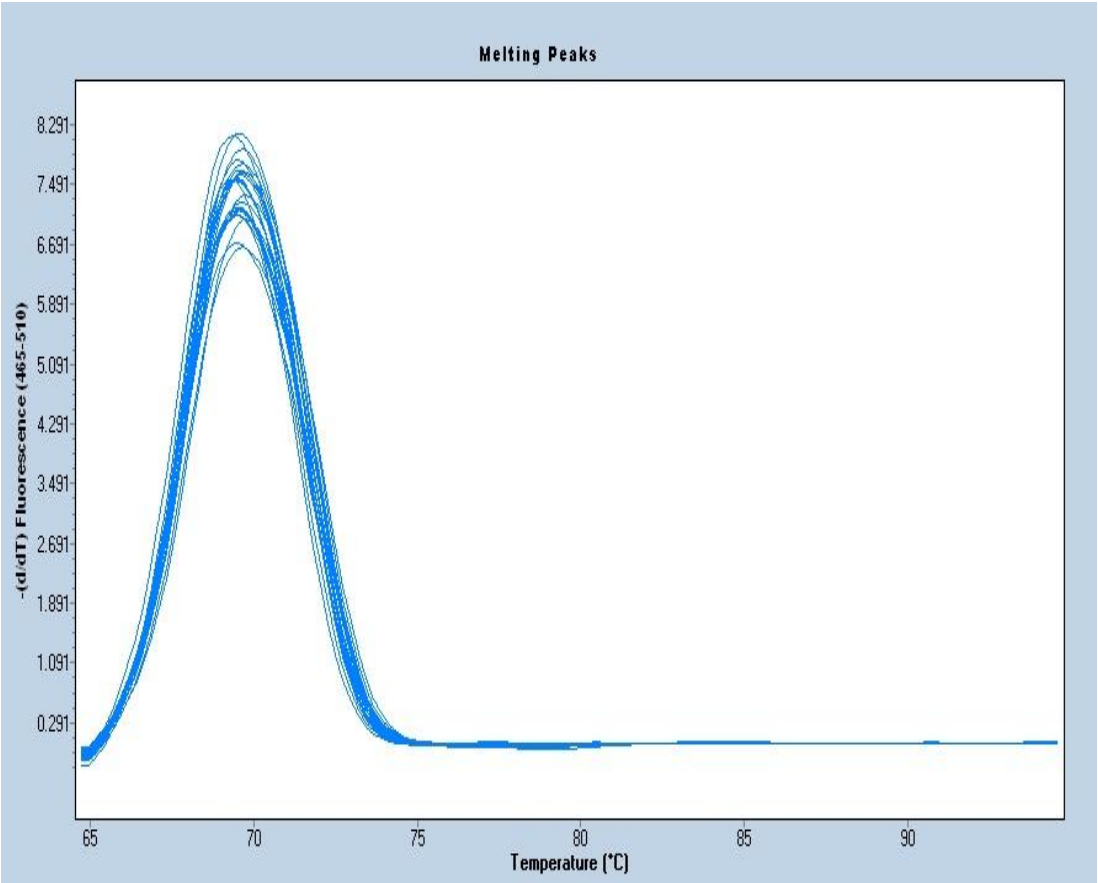
İsim	NP1	NP4	NP5	NP6	NP7	NP9	NP10	NP14	U-CHI	CH2	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10	CH12
hsa-miR-140-5p	0.0	-46,05	-0,24	-0,66	-28,91	-22,97	-0,23	-0,46	0,26	-31,84	32,23	37,22	28,71	20,21	3,21	18,84	16,02
hsa-miR-424	0,00	-4,39	-12,42	0,01	-27,28	-22,13	-30,23	-15,79	0,36	-1,77	32,22	15,50	18,98	17,85	18,65	222,37	-21,44
hsa-miR-126	0,31	0,04	-0,90	-0,65	-19,34	-0,87	-0,42	-0,49	0,00	-0,35	29,29	29,64	48,65	34,87	11,78	10,55	-0,02
hsa-miR-142-3p	1,43	-0,72	-0,10	-10,35	0,22	-0,10	-18,24	-0,86	0,00	-20,29	48,17	32,22	38,46	19,06	169,38	14,52	-0,19
hsa-miR-148a	0,28	-22,51	-0,25	-0,57	-2,58	-2,13	-0,83	0,00	0,71	-29,43	25,44	20,48	2,15	25,36	19,53	-0,07	11,84
hsa-miR-1207-5p	-10,23	12,99	-17,19	-1,30	-13,92	-19,28	27,18	-21,51	-11,90	35,02	18,43	0,67	41,74	0,00	-0,63	20,04	42,35
hsa-miR-140-3p	-0,27	-35,87	-0,47	-16,76	-25,97	-27,13	0,61	-0,93	0,00	-0,07	3,02	37,65	24,47	4,10	35,11	28,49	270,61
hsa-miR-630	-20,98	19,83	-25,18	-22,06	-2,80	-24,46	16,10	-27,95	-12,11	3,08	0,13	0,65	16,17	0,11	-0,10	14,48	0,00
hsa-miR-451	29,09	-33,73	-19,92	-2,43	-49,71	-25,96	-3,53	-27,50	-3,04	0,00	63,96	679,07	7,54	70,83	611,37	38,55	16,93
hsa-miR-144	13,02	-0,52	0,00	-0,96	-0,66	-15,85	-13,32	-0,13	0,01	-0,94	44,93	41,04	56,14	29,82	30,88	11,46	-0,90
hsa-miR-181a	-0,83	-1,00	-15,87	-1,12	-19,42	-14,12	-0,44	-1,07	0,00	0,05	16,46	22,65	1,99	22,73	26,16	0,09	0,82
hsa-miR-16	0,56	-45,68	0,56	-0,11	-365,82	-13,70	-14,65	0,14	-13,56	-27,81	2,01	297,44	29,51	27,48	17,29	0.0	-0,91
hsa-miR-195	0,45	-14,41	-0,22	0,24	-20,87	-14,21	-0,19	0.0	-0,10	-29,42	34,07	2,43	37,64	2,78	3,37	10,42	-0,78
hsa-miR-138	16,57	0,06	16,79	13,46	19,34	0,98	0,75	18,40	-0,48	-0,73	-0,98	-12,45	0,00	-0,89	-0,43	-22,56	-10,10
hsa-miR-221	20,57	-17,83	20,89	14,59	11,55	0,81	0,28	19,02	-0,88	-3,18	-11,67	-18,74	-10,23	-13,81	0,00	0,10	-2,37
hsa-miR-31	30,78	0,00	30,27	2,94	25,35	19,97	20,52	3,61	-1,00	-21,76	13,87	-0,47	-21,74	-0,56	-0,30	-18,65	-2,22
hsa-miR-222	0,46	0,00	0,59	15,16	16,02	0,96	11,54	11,24	-13,24	-25,50	-0,82	-13,89	-15,68	-0,67	0,36	-0,16	-32,95



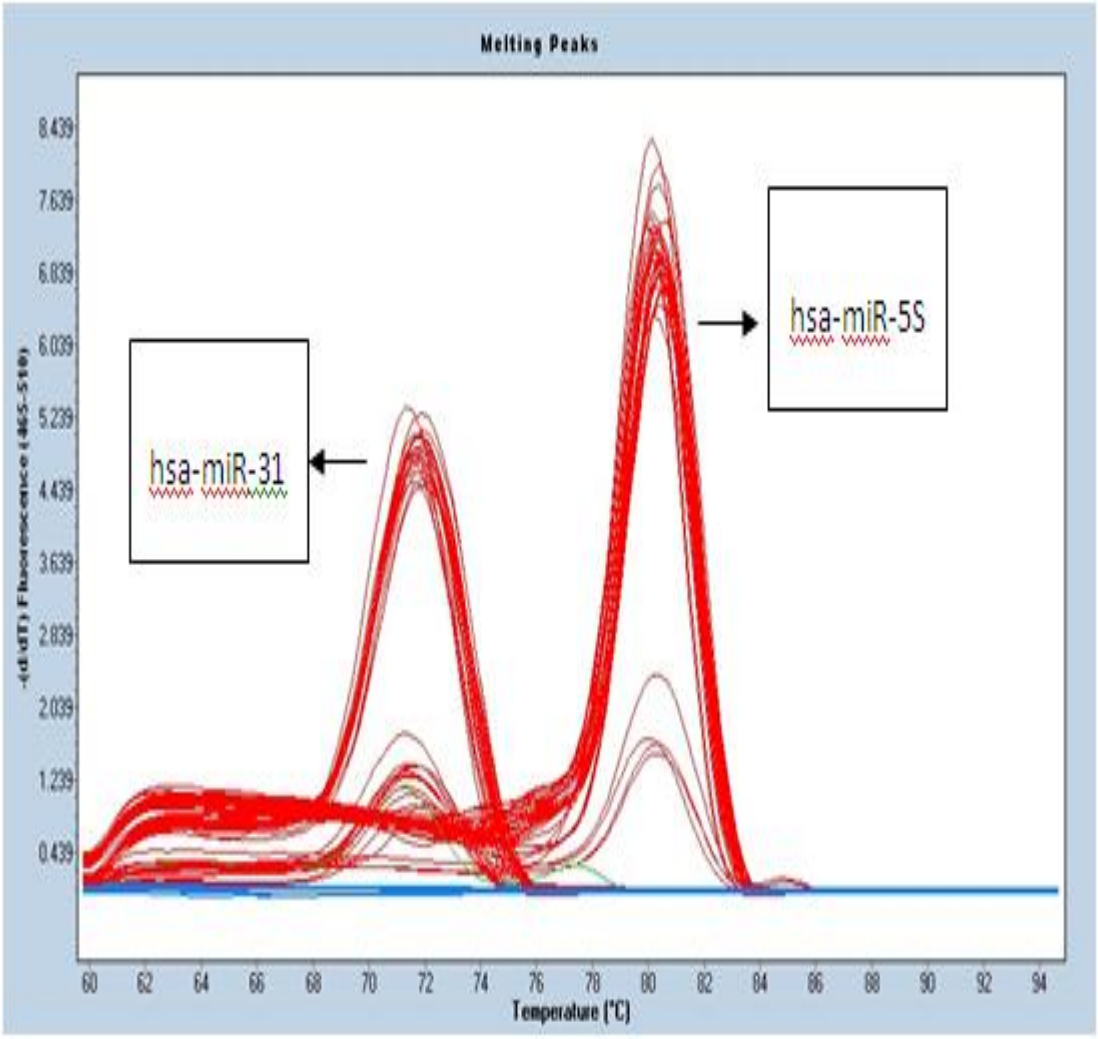
Şekil 3.4. Şekilde kordoma(ch) ve nükleus pulposus dokuları (np) sınıflandırılarak ve GeneSpring veri analiz yazılımında miRNA ekspresyon miktarı 4 kat ve üzeri olan miRNA'ların renk skalasında verilen değerlere bağlı olarak düzenlenmiş şekili (Renk skalası miRNA ekspresyon seviyesinin kat değişimini göstermektedir.).

3.5. Real-Time PCR bulguları

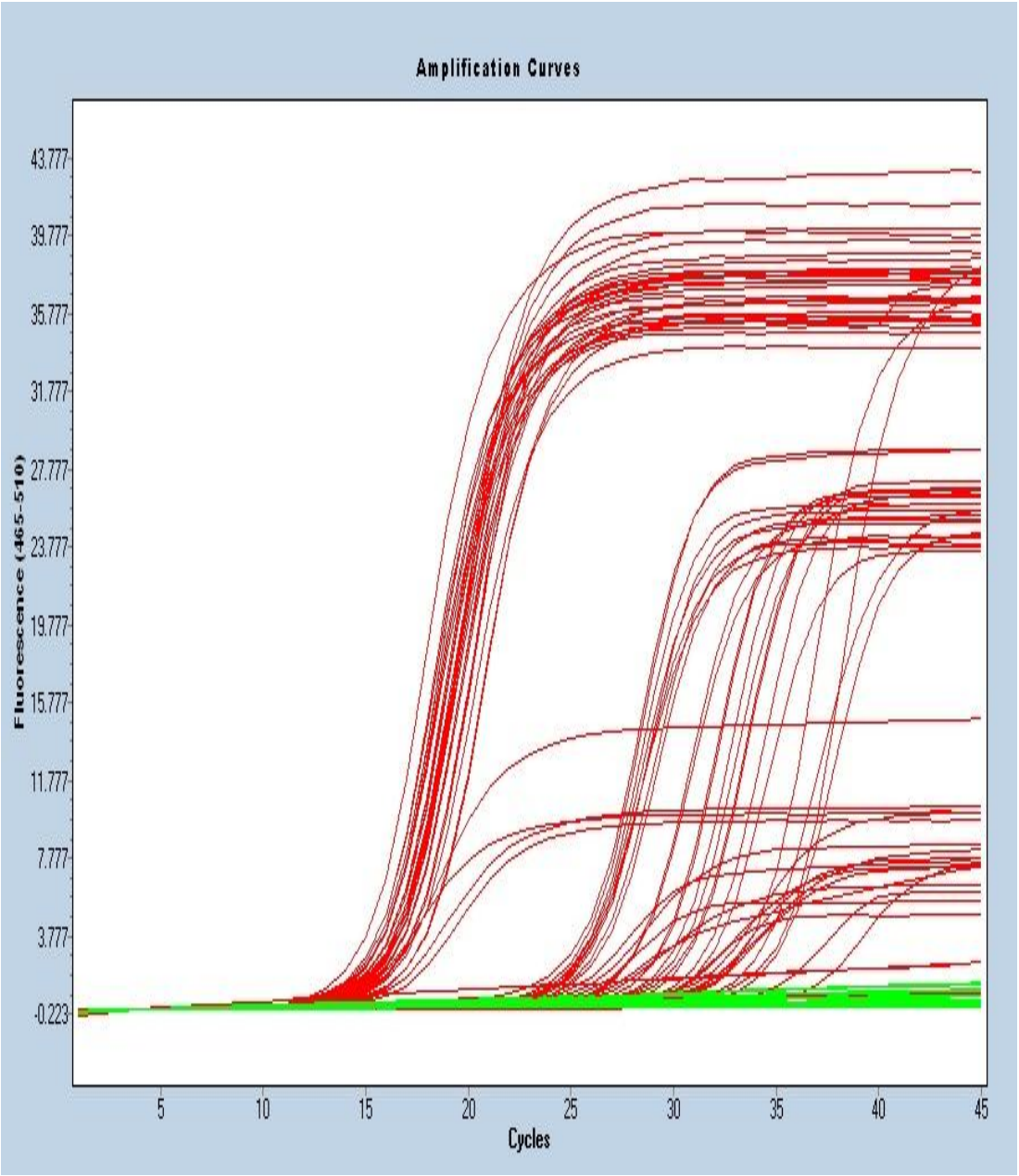
Mikroçip verilerinin doğrulanması için mikroçiplerden elde edilen verilerin kordoma dokuları ile nükleus pulposus dokuları arasındaki ekspresyon seviyesi 4 katı ve üzerinde olan miRNA'lar arasından seçildi. Örnek dokulardaki miRNA ekspresyon seviyesi doku gruplarındaki örneklerde homojen olduğu belirlenen miRNA'lar kullanıldı. Buna göre kordoma dokularında ekspresyon seviyesi yükselen hsa-miR-140-3p ve hsa-miR-148a, ayrıca kordoma dokularında ekspresyonu düşen hsa-miR-31 ve hsa-miR-222 toplam dört miRNA mikroçip verilerinin real-time PCR ile doğrulanması için belirlendi. Yapılan real-time PCR işlemi sonucunda ekspresyon seviyesi sybr-yeşili yöntemi kullanılarak yapılan erime sıcaklığı analizine bağlı olarak her bir miRNA için spesifik ürün elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7).



Şekil 3.5. Spike kontrol ait real-time PCR'dan elde edilen tm grafiği.



Şekil 3.6. hsa-miR-31 ve hsa-miR-5S ait real-time PCR'dan elde edilen tm grafiği.



Şekil 3.7. hsa-miR-31 ve hsa-miR-5S ait real-time PCR'dan elde edilen amplifikasyon eğrisi.

Real-time PCR sonrası yapılan analizlerde ekspresyon miktarları belirlenirken bağıl kantitasyon yöntemi (relative expression) kullanıldığından sonuçlar mikroçip verilerinde olduğu gibi kat farkı olarak verilmiştir. Real-time PCR işleminin normalizasyonu için öncelikle cDNA'lar içine eklenen spike kontrol kalıplarının kendi primerleriyle verdiği sonuçlar değerlendirildi (Çizelge 3.5). Burada elde edilen CP değerinin tüm dokular için ortalaması alınarak standart sapması hesaplandı. Hesaplanan bu standart sapma değeri daha sonra elde edilen bütün miRNA değerlerinden çıkarılarak PCR verimliğini normalizasyon değerlerine ulaşıldı. Bu aşamadan sonra konulan cDNA miktarlarının normalizasyonuna geçildi. Bu normalizasyon için 5S miRNA miktarları kullanılarak diğer miRNA oranları belirlendi.

Çizelge 3.5. Yapılan real-time PCR deneyinde PCR verimliğini normalize etmek amacıyla kullanılan spike kontrol cp değerleri.

	Spike Kontrol
Doku	Ortalama Cp
CH1	23,71
CH5	23,9
CH6	24
CH7	23,61
CH8	23,64
CH9	23,56
CH10	23,94
CH12	23,83
U-CHI	23,53
NP1	23,67
NP4	23,71
NP5	23,62
NP6	23,88
NP7	23,59
NP9	24,22
NP10	23,5
NP14	23,39

Belirlenen miRNA'ların ekspresyon miktarlarının bulunması için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanıldı. Sonuçların istatistiki anlamlılıklarını değerlendirmek için $P<0,05$ değer aralığı alınmıştır. Dokular gruplandırıldıktan sonra elde edilen veriler mikroçip verilerine yakın sonuçlar vermiştir (Çizelge 3.6).

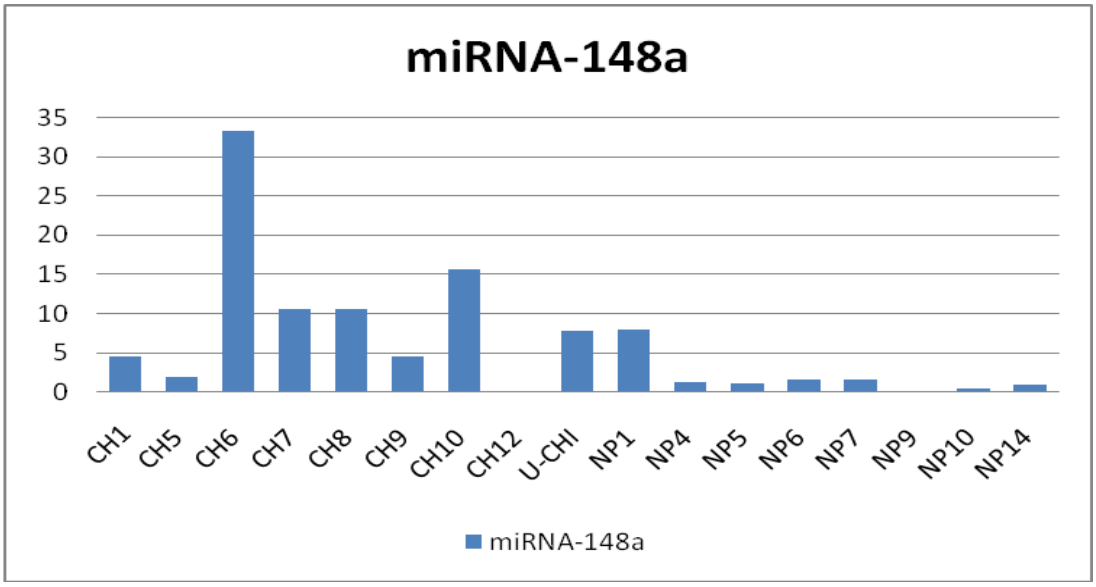
Real-time PCR sonucu elde edilen kordoma dokuları ile nükleus pulposus dokularına dair her birinin ekspresyon miktarlarındaki kat farkı da ayrıca hesaplanarak değerler elde edildi (Çizelge 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11)

Çizelge 3.6. Real-time PCR sonuçlarının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile analiz edildikten sonra P<0,05 güvenlik aralığında değerleri. Sonuçlar kordomalardaki miRNA ekspresyonlarının nükleus pulposus'a göre kat farkını ifade etmektedir.

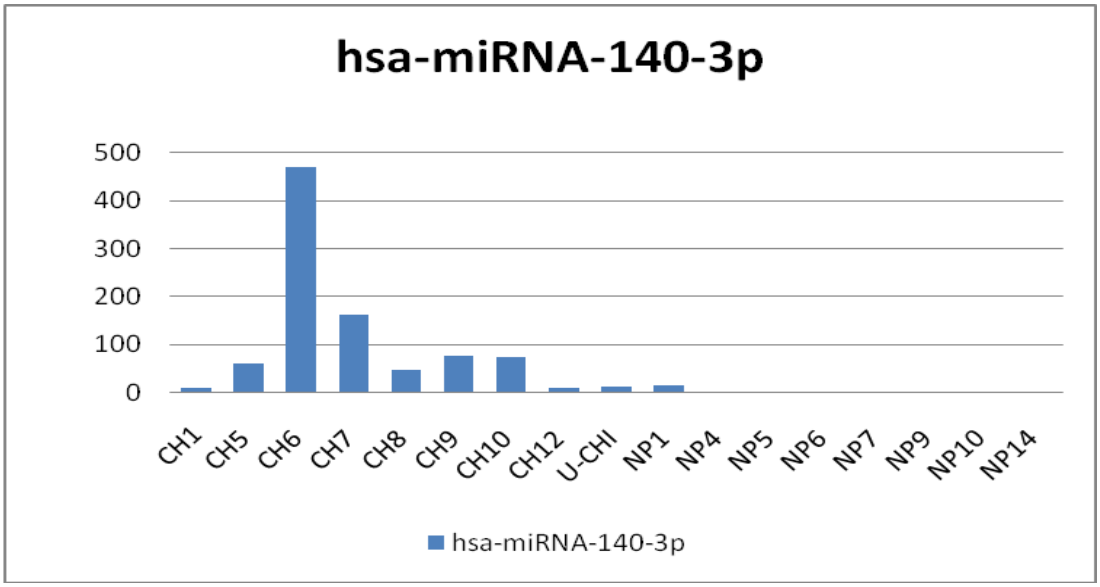
	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-148a	hsa-miR-31	hsa-miR-222
Kordoma dokuları	48,18	5,01	0,07	0,40

Çizelge 3.7. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak elde edilen sonuçların P<0,05 güvenilirlik değerine göre dokulardaki miRNA ekspresyon kat değerleri.

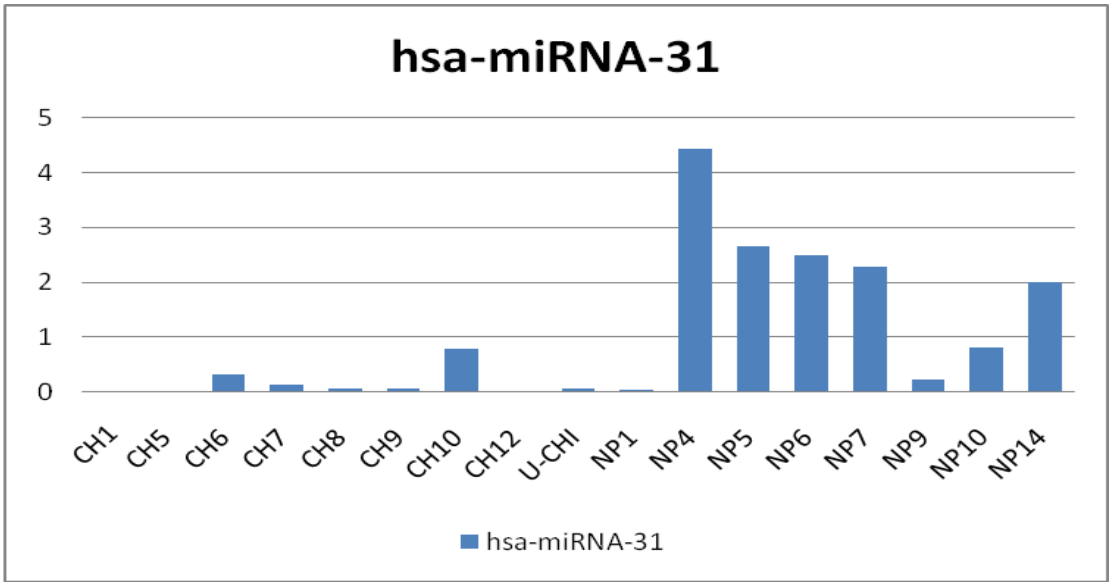
	hsa-miRNA 5S	hsa-miRNA-140-3p	miRNA-148a	hsa-miRNA-31	hsa-miRNA-222
Doku	Ortalama Cp	Kat değişimi(ch/np)	Kat değişimi	Kat değişimi	Kat değişimi
CH1	14,73	9,71	4,51	0	0,03
CH5	15,91	60,9	1,83	0,02	0,94
CH6	17,65	469,92	33,3	0,31	7,67
CH7	15,96	161,74	10,5	0,14	0,58
CH8	16,63	47,67	10,59	0,06	0,59
CH9	15,53	75,83	4,45	0,05	0,24
CH10	15,55	73,34	15,64	0,79	0,56
CH12	16,03	8,71	0,12	0	0,07
U-CHI	16,37	13,48	7,8	0,05	0,46
NP1	16,41	14,6	8,01	0,04	0,49
NP4	17,13	2,33	1,26	4,44	1,76
NP5	16,62	0,93	1,03	2,66	1,7
NP6	17	1,86	1,63	2,49	3,29
NP7	16,49	1,09	1,59	2,27	1,8
NP9	15,54	0,08	0,1	0,23	0,27
NP10	15,22	0,3	0,42	0,8	0,48
NP14	16,15	0,61	0,91	1,99	0,89



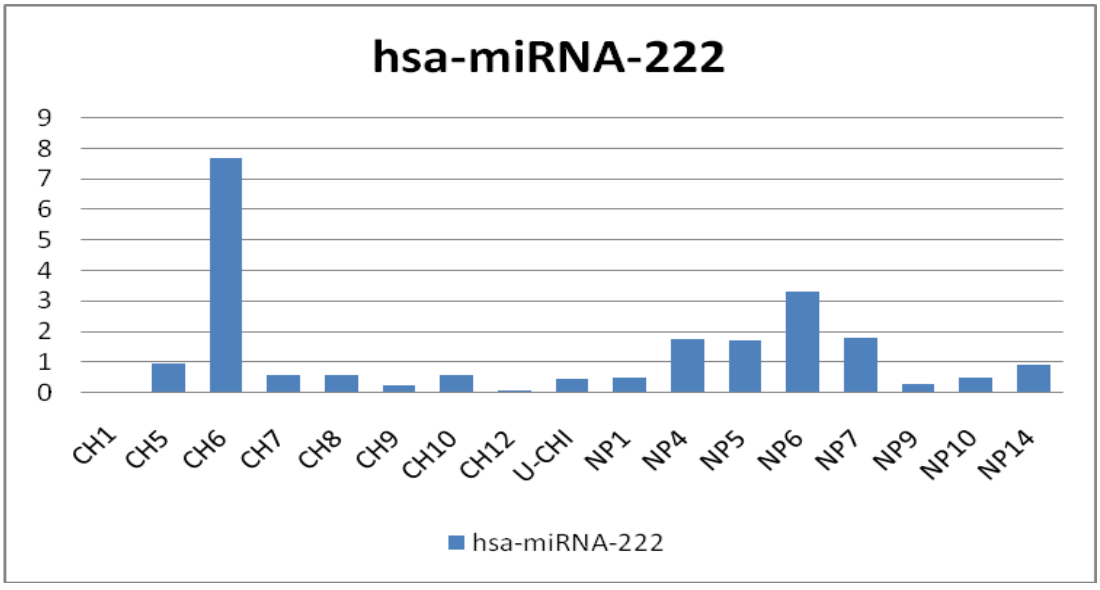
Şekil 3.8. Kordoma ve nükleus pulposus dokularındaki miRNA-148a ekspresyon miktarları. X ekseni ekspresyon kat miktarını belirtmektedir.



Şekil 3.9. Kordoma ve nükleus pulposus dokularındaki miRNA-140-3p ekspresyon miktarları. X ekseni ekspresyon kat miktarını belirtmektedir.



Şekil 3.10. Kordoma ve nükleus pulposus dokularındaki miRNA-31 ekspresyon miktarları. X ekseni ekspresyon kat miktarını belirtmektedir.



Şekil 3.11. Kordoma ve nükleus pulposus dokularındaki miRNA-222 ekspresyon miktarları. X ekseni ekspresyon kat miktarını belirtmektedir.

4. TARTIŞMA

Kordomalar oldukça ender karşılaşılan aksiyel iskelet üzerinde oluşan düşük-orta dereceli malin kemik tümörüdür. Kordoma'ların %32'si kranial %32,8'i spinal ve % 29,2'si oranında sakrumda oluştuğu bildirilmiştir (Papagelopoulos et al., 2004). Bütün intrakranial tümörler arasında görülme oranı % 0,1–0,2 arasında değişmektedir (Mirra JM, 2002). Mikroskobik olarak fizaliferöz (sitoplazmik vakuollere sahip) hücre yapısına sahip olmasının yanı sıra makroskobik olarak çok lobüllü mavi-gri renkte ve jelatin yapılıdır (Romeo and Hogendoorn, 2006).

Kordomalar kemoterapiye ve radyoterapiye karşı oldukça dirençlidir (Carrabba et al., 2008; Dehdashti et al., 2008; Foweraker et al., 2007; Hasegawa et al., 2007b; Igaki et al., 2004; Karger et al., 2006; Rhomberg et al., 2006). Bu yüzden kordomaların tedavisinde radikal cerrahi yöntemlerinin çok daha etkili ve tedavi edici olduğu düşünülmektedir (Bailey ve ark 2006, Cho ve ark 2008b, Fatemi ve ark 2008, Hasegawa ve ark 2007a, Hasegawa ve ark 2007b, Henderson ve ark 2009, Jiang ve ark 2009; Krishnan ve ark 2005, Liu ve ark 2008, Noel ve ark 2004)

Kordomanın moleküler biyolojisini açıklamak için yapılan çalışmaların varlığına rağmen kordomanın altında yatan moleküler mekanizma henüz net olarak ortaya konmamıştır. *In-vitro* olarak kültüre edilebilen hücre hatlarının sayısının çok az olması kordoma üzerinde yapılan araştırmaları önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. Kordoma hücre hatlarının üretilmesi ve karakterize edilmesi kordomanın moleküler alt yapısının aydınlatılmasında oldukça önemli sonuçlar doğuracaktır. Bu çalışmada kordomaların *in-vitro* olarak incelenmesi amacıyla mevcut UCH-I hücre hattının yanı sıra yeni bir hücre hattı üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Primer hücre kültürleri yapılan tüm kordoma dokuları için primer hücre kültürleri başarılı bir şekilde yapılmıştır. Buna karşın bu hücrelerin pasajlanması sonucu kordoma hücrelerine özgü fizaliferöz hücre yapılarının 4. pasajdan sonra kaybolduğu gözlemlenmiştir. Literatürde kanser hücre hatları için yapılan çalışmalarda da bildirildiği üzere kanser dokuları heterojen dağılım göstermekte ve tümör dokuları

içerisinde fibroblast hücreleri de yoğun bir şekilde yer almaktadır (Tsunenari ve ark 2000, Welch ve ark 1995). Kordoma hücreleri sitoplazmalarında barındırdıkları vakuoller sayesinde ışığı yansıtırken fibroblastik hücreler ışığı yansıtmadığı yapılan faz kontras mikroskop taramalarında gösterilmiştir. Kordoma hücrelerinin bölüme döngüsünün yavaş olduğu ve fibroblastların bölünmesinin *in-vitro* şartlarda daha hızlı olduğu göz önüne alındığında ilerleyen pasajlarda fibroblast hücrelerinin kültür ortamında daha baskın bir hale geldiği görülmüştür (Rajarajan ve ark 2008, Scheil ve ark 2001). Benzer şekilde çalışmamızda da fibroblast hücreleri kültür ortamını primer olarak kapladığı ve kordoma hücrelerinin ise çok az sayıda oldukları gözlenmiştir. *Brachyury* geni ekspresyonu kordomalardaki en önemli belirteç olarak görülmektedir (Oakley ve ark 2008, Romeo ve Hogendoorn 2006, Tirabosco ve ark 2008, Vujovic ve ark 2006).

Kordomalar genel itibarıyla düşük dereceli tümörler olmasına rağmen bazı hastalarda agresif olabildikleri gibi düşük oranda metastaz yapabilmektedirler. Literatürde akciğere, kemiğe ve karaciğere metastaz yaptıklarını gösteren çalışmalar bildirilmiştir (Guedes ve ark 2009, Auger ve ark 1994, McPherson ve ark 2006, Perasole ve ark 1991).

Genel olarak kordomaların patolojik tayinlerinde; vimentin, sitokeratin-19 ve s-100 gibi antikorlarla pozitif, GFAP antikoruyla ise negatif boyanma özellikleri ve morfolojik özellikleri mikroskobik olarak değerlendirilir. Literatürde kordomalarda spesifik ekspresyonu gösterilen EMA, galektin-3, vimentin, brachyury, CD24, CD44, sitokeratin-19, c-met ve e-kaderin genleri bildirilmiştir. (Walker ve ark 1991, Gotz ve ark 1997, Naka ve ark 2001, Niwa ve ark 1994, Oakley ve ark 2008, Saad ve Collins 2005, Walker ve ark 1991, Naka ve ark 1997, Romeo ve Hogendoorn 2006). Bu çalışmada ise bahsi geçen genlerin ekspresyonuna ilk defa bir arada bakıldı ve bu genler kordomanın tanı değerlendirilmesinde kullanıldı. Bu amaçla, çalışma kapsamında toplanan dokuların kordoma tanısının net olarak konulması için belirlenen bu 9 genin ekspresyonu açısından pozitif oldukları gösterildi.

Kordoma oluşumunda önemli roller üstlenen genlerin düzenlenmesinde rol alan miRNA ekspresyon profilinin belirlenmesi kordomanın moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında temel çalışma niteliğinde olacaktır. Bu amaçla yapılan kordoma dokularında miRNA ekspresyon profilinin belirlenmesi ve bu ekspresyon profilinin nükleus pulposus dokularıyla kıyaslanarak ekspresyon farkı 4 katın üzerinde olan 17, 2 katın üzerinde olan 91 miRNA tespit edilmiştir. Belirlenen bu miRNA'lar arasında ekspresyonları doku gruplarına göre homojen dağılım gösteren hsa-miR-140-3p, hsa-miR-148a, miR-31 ve hsa-miR-222 miRNA'ların ekspresyon seviyesi real-time PCR ile doğrulanmıştır. Real-time PCR sonrası elde edilen bulgulara göre hsa-miR-140-3p, hsa-miR-148a'in kordoma dokularında ekspresyonunun arttığı, miR-31 ve hsa-miR-222 miRNA'ların ekspresyonların azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgu, bu miRNA'ların kordomalar için spesifik olduğu göstermektedir. Bu miRNA'ların daha fazla kordoma dokusunda bakılarak istatistiki öneminin ortaya konması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda UCH-I hücre hattına ait miRNA ekspresyon sonuçları da kordoma dokularına paralellik göstermektedir.

Kordomalar üzerinde bugüne kadar yapılan sadece bir adet miRNA çalışması mevcuttur. Bu çalışmada 2 kordoma dokusu ve UCH-I hücre hattı kullanılmıştır. Kontrol doku olarak ise iskelet kas hücreleri kullanılmıştır (Duan ve ark 2010). Bu çalışmada; miR-1'in kas hücrelerine kıyasla kordoma dokularında daha çok eksprese edildiği sonucuna varılmıştır. Fakat yapılan bu çalışmada göz ardı edilen nokta kordoma dokularının sağlıklı dokusu olarak kabul edilen nükleus pulposus yerine kas hücrelerinin kullanılmasıdır. Mevcut çalışmamızda ise sekiz kordoma dokusu ve 8 nükleus pulposus dokusu kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar kıyaslanınca miR-1'in kordoma dokularında nükleus pulposusa oranla daha farklı bir miktarda eksprese edilmediği görülmüştür.

Bu araştırmada ayrıca kordoma dokusunda rol aldığı ortaya konan hsa-miR-222 ve miR- 31 prostat karsinomlarında incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre hsa-miR-222 ve miR-31'in normal prostat dokularına nazaran daha düşük miktarda eksprese edildiği bildirilmiştir. Diğer taraftan papiller tiroit kanserlerinde ise bu

miRNA'ların çok düşük oranda sentezlendiği gösterilmiştir (Schaefer ve ark 2010, Tetzlaff ve ark 2007). Lenfomalar üzerine yapılan bir çalışmada ise hsa-miR-31'in bulunduğu kromozomal bölgenin bazı hastalarda delesyona uğradığı ve hsa-miR-31 ekspresyonunun düştüğü gösterilmiştir (Schwaenen ve ark 2009). Diğer taraftan lenf düğümlerinde metastaz yapan meme kanserleri üzerinde yapılan miRNA ekspresyon profili çalışmasında hsa-mir-31 düşük miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Schmittgen 2010). Ayrıca VSMC (vasküler düz kas hücreleri)'nde ise hsa-miR-31'ni yüksek miktarda sentezlendiği de gösterilmiştir (Suarez ve ark 2007, Suarez ve Sessa 2009). hsa-mir-31'in sağlıklı börek dokularında polikistik böbrek dokuları ile kıyaslandığında daha yüksek miktarda olduğunu gösterilmiştir (Pandey ve ark 2008). Kolon kanseri hücre hatları ve kolon kanseri dokuları kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise hsa-miR-31 miktarının sağlıklı doku ve hücre hatlarına nazaran çok düşük miktarda olduğu gösterilmiştir (Bandres ve ark 2006).. Gliomalar üzerinde yapılan araştırmada ise astrositlerle kıyaslandığında hsa-miR-31'in gliomalarda çok düşük miktarda olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark 2009).

hsa-miR-31 çeşitli hücre hatlarına transfekte edilerek hücreler üzerindeki etkileri araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre hsa-miR-31 p53 biyokimyasal yolağı bozulmuş olan OVCAR8, OVCA433, SKOV39 (ovaryum kanseri hücre hatları) ve PC3 (prostat kanseri hücre hattı) hücrelerinde proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (Creighton ve ark 2010). Malin mezenteliyoma'larda yapılan çalışmalarda hsa-miR-31 ekspresyonunun çok düşük olduğu ve bu kansere ait hücre hatlarına hsa-miR-31 transfeksiyonu yapıldığında hücre proliferasyonun azatlığı gösterilmiştir (Ivanov ve ark 2010). hsa-miR-31 ekspresyonu fludarabin'e dirençli ve tekrarlayan kronik miyeloid lösemilerde (KML) fludarabin'e hassas olan KLM'lere nazaran daha düşük olduğu bunu sonucu olarak fludarabin direncinde bir belirleyici olabileceği öne sürülmüştür (Ferracin ve ark 2010). Diğer taraftan akut miyeloid lösemilerde de hsa-miR-31'in ekspresyonunun düştüğü gösterilmiştir (Cammarata ve ark 2010). Literatürdeki bu bulgular ve mevcut bulgularımız ışığında hsa-miR-31 kordomalarda da ekspresyon miktarının düşük olması, hsa-miR-31'in fonksiyonel olarak bir çeşit tümör baskılayıcı miRNA olma ihtimalini artırmaktadır.

hsa-miR-222'nin ise KIT (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) ekspresyonunu hedefleyerek engellendiği ve böylelikle eritrolösemik hücrelerin gelişiminin durduğu gösterilmiştir (Felicetti ve ark 2008, Felli ve ark 2005). hsa-miR-222'nin PC3 (prostat kanseri hücre hattı)'na transfeksiyonu sonucunda bu hücrelerdeki P27 yolağını bozarak hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Literatürde hsa-miR-222 ve hsa-miR-221 birlikte birçok kanserde yüksek miktarda sentezlendiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bu araştırmalarda; bir tümör baskılayıcı gen olan P27 mRNA'sının 3'-UTR bölgesinde bağlanma bölgesinde hsa-miR-222 ve hsa-miR-221 miRNA'larının bağlanma bölgesi içerdiği ve bu miRNA'ların P27 yolağını baskılayarak hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Galardi ve ark 2007, Medina ve ark 2008, Mercatelli ve ark 2008, Miller ve ark 2008, Sun ve ark 2009, Veerla ve ark 2009, Visone ve ark 2007, Zhang ve ark 2010a). Bu çalışmada ise hsa-miR-222 ve hsa-miR-221'in her ikisininde kordomalardaki miktarının nükleus pulposus dokularına kıyasla daha düşük oranda ifade edildiği gösterilmiştir. Diğer taraftan real time PCR ile hsa-miR-222'nin belirlenen ve doğrulanmış sonuçlara göre KIT yolağını hedef alarak baskılaması ve buna bağlı olarak hücre proliferasinonu azaltmasında rol olduğu düşünülmektedir (He ve ark 2005a). Çalışma sonucu elde edilen miR-222 verilerinin literatürdeki verilerle çelişmesi bu konuda yapılacak araştırmaların artmasıyla aydınlatılacaktır.

Kordomalarda belirlenen miRNA ekspresyon profillerine bağlı olarak hsa-miR-31'in düşük miktarda sentezlenmesinin kordomalardaki E2F biyokimyasal yolağın daha aktif olmasını ve bu sayede kordoma hücrelerinin apoptozdan kaçma ve sürekli olarak S fazına girme döngüsünü kolaylaştırdığı düşünülebilir. Hsa-miR-31 haricinde hsa-miR-222'de düşük miktarda sentezlenmesi hedeflediği bir onkogen olan c-KIT ve kanserlerde miktarının oldukça arttığı gösterilen ARF4 geninin yüksek miktarda üretilmesine sebep olacağı için kordomaların patogenezinde oldukça önemli olduğu düşünülebilir (Creighton ve ark 2010).

Kanser hücrelerine çeşitli kemoterapötik ajanlar verilerek telomer bölgelerinin kısalması sağlanmaktadır. Uziel ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada kemoterapötiklerin verilmediği grupla verilen grup arasında miRNA ekspresyon farkları belirlemiş ve sonuçlara göre telomer bölgesinde kısalma olan hücrelerde hsa-miR-148a'nın yüksek miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir (Uziel ve ark 2010). Diğer taraftan, kolon kanseri hücre hatları ve kolon kanseri dokuları kullanılarak yapılan bir çalışmada hsa-miR-148a miktarının sağlıklı doku ve hücre hatlarına nazaran çok yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir (Bandres ve ark 2006). AML hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada normal karyotipe sahip AML hastalarında hsa-miR-148a'nın yüksek miktar sentezlendiği gösterilmiştir (Cammarata ve ark 2010). Diğer taraftan hepatoselüler karsinomlarda yapılan bir araştırmada metastatik karsinomlarla olmayanlar arasındaki miRNA ekspresyon seviyesinin kıyaslanması sonucu hsa-miR-148a'nin metastatik olmayan karsinomlardaki ekspresyon seviyesi yüksek çıkmıştır. Mevcut çalışmamızda ise hsa-miR-148a'nın ekspresyon seviyesi yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, kordomalarda metastaz oranın düşük olduğu düşünüldüğünde literatürdeki verilerle uyumludur.

Çalışmamızda kordoma dokusunda rol aldığı ortaya konan hsa-miR-181a'nın prostat kanseri miRNA ekspresyon profil çalışmasında normal dokularla kıyaslandığında daha yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca hsa-miR-181a'nın multipl miyelomlarda, pankreas kanserinde, lösemilerde, retinoblastomlarda ve B hücreli kronik lenfositik lösemilerde yüksek miktarda sentezlendiği bildirilmiştir (Lee ve ark 2007, Pichiorri ve ark 2008, Wang ve ark 2008a, Yu ve ark 2006, Zhao ve ark 2009).

miR-140-5p'nin damak oluşumunda görev aldığı ortaya konmuştur (Eberhart ve ark 2008). Bu çalışmanın ardından sendromik olmayan yarık damak hasta gruplarında yapılan bir araştırmada mir-140-5p'de bulunan bir polimorfizmin hastalığın ortaya çıkmasında etken olduğu gösterilmiştir (Li ve ark 2010). 2010 yılında yayınlanan bir çalışmada ise hipofarinks skuamöz hücre karsinomunda mir-140-5p'nin sağlıklı dokularla kıyaslandığında daha düşük miktarda sentezlendiği

gösterilmiştir (Kikkawa ve ark 2010). miRNA'ların ekspresyon profili yapılan diğer bir çalışmada ise endometriyal karsinomlarda miR-140-5p'nin miktarının normal dokulara kıyasla daha az olduğu bildirilmiştir(Hiroki ve ark 2010). Bulgularımıza göre kordomalarda miR-140-5p miktarının nükleus pulposuslarla kıyaslandığında yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir. Fakat literatürde bu bulgumuzu destekleyecek miR-140-5p'nin kordomada ve diğer kanserlerde farklı miktarlarda sentezlendiğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bulgu bizim çalışmamız ile literatürde ilk bulgudur.

Literatüre bakıldığında, miR-16 ve kanserlerdeki ekspresyon profiline dair yapılan çalışmalar, miR-16'nın kanserlerde ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu göstermiştir (Calin ve ark 2002, Iorio ve ark 2005). miR-16'nın belirlenen hedefleri arasında BCL2'yi olması ve bu yönde yapılan çalışmalarda miR-16'nın apoptozu uyardığını gösterilmiştir (Cimmino ve ark 2005). Literatürde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler çoğunlukla kanserlerde miR-16'nın daha düşük miktarda sentezlendiği gösterilmiş, fakat mevcut çalışmamızda ise artığı gözlenmiştir. Benzer şekilde literatürde bazı tümörlerde miR-16'nın miktarının artığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Wang ve ark 2008c). Bu çelişkili sonuçlara, miRNA'ların keşfinin yeni olması, deney sistemlerinin belli standartta optimize edilmemiş olması ve henüz bu miRNA'ların etkilediği yolakların net olarak bilinmemesi yol açmaktadır. Mevcut çalışmada da olduğu gibi elde edilen verilerin hepsi beraber değerlendirildiğinde mevcut veriler üzerinden yapılacak sonraki çalışmalar ilerleyen zamanlarda bu alandaki soru işaretlerinin azalmasına ve mekanizmaların aydınlatılmasına neden olacaktır.

Literatürde miR-126 ile mikroçip çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan göğüs kanserinde miR-126'nın göğüs kanser hücrelerinin proliferasyonunu azatlığı gösterilmiştir (Tavazoie ve ark 2008). Akciğer ve prostat kanserleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise tümör dokularında normal dokulara nazaran daha düşük miktarda miR-126'nın sentezlendiği gösterilmiştir (Ambs ve ark 2008, Yanaihara ve ark 2006). Ayrıca miR-126'nın vasküler gelişim üzerinde olumlu etkiler yaptığını

gösteren çalışmalar da mevcuttur (Fish ve ark 2008, Wang ve ark 2008b). Buna ilave olarak son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada ise miR-126'nın mesane tümör dokularında normallerine kıyasla yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Baffa ve ark 2009). Kolorektal kanserde ise miR-126 ile birlikte miR-451'in yüksek miktarda sentezlendiği grubun survisinin daha uzun olduğu gösterilmiştir (Valeri ve ark 2009). Mevcut çalışmamızda hastaların survisi ile miRNA arasındaki ilişki çalışılmamıştır. Bununla birlikte, kordoma vakalarının diğer kanserli vakalar ile kıyas edildiğinde survisinin daha uzun olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, miR-126 ve miR-16'nın kordomalarda yüksek miktarda sentezlenmesinin kordomaların oldukça yavaş büyüyen tümörler olmasındaki kordoma hücre hattı olan UCH-I'nin hücre sayısının ikiye katlanma süresinin 14 gün olması beraber değerlendirildiğinde bu miRNA'ların kordomanın düşük dereceli bir tümör olmasında etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

miR-424'ün pankreas kanserlerinde, AML'lerde, metastatik olmayan karaciğer ve özefagus skuamöz hücre karsinomlarında yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Guo ve ark 2008, Langer ve ark 2009, Lee ve ark 2007, Li ve ark 2008). Ayrıca prostat kanseri hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada miR-424 hormona bağımlı olmayan prostat kanseri hücrelerinde androjen bağımlı hücrelere nazaran daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir (Lin ve ark 2008). Ovaryum ve göğüs kanserlerinde de düşük miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Camps ve ark 2008, Yang ve ark 2008). Bu sonuçlar; diğer kanserlerde olduğu kordomalarda da artan miR-424 miktarını anlamlı kılmakla beraber hormon bağımlı olan kanserler için ortak bir yol göstermektedir. Bu verilerden yola çıkılarak kordomalarda mir-424'ün yüksek miktarda sentezlenmesi kordomaların hormon bağımlı olmadığını gösteren bir veri olarak da düşünülebilir.

miR-142-3p'nin KLL'lerde, kolorektal ve skuamöz hücre karsinomlarında yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Chang ve ark 2008, Chen ve ark 2009, Fulci ve ark 2007, Mascaux ve ark 2009, Zanette ve ark 2007). Bununla birlikte, miR-142-3p'nin T lenfositlerinde de yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir

(Merkerova ve ark 2008). Mevcut çalışmamızda ise kordomalarda nükleus pulposus dokusuna nazaran miR–142-3p'nin daha yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu bulgu literatürde diğer kanser dokularından elde edilen veriler ile uyumluluk göstermektedir.

miR-195 kardiyak hipertrofilerinde yüksek miktarda sentezlendiğinin gösterilmiştir (van ve ark 2006). Bununla birlikte KLL'lerde yüksek miktarda sentezlendiğinin gösterilmesine karşın hepatoselüler karsinomlarda, gastrik ve mesane kanserlerinde düşük miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Guo ve ark 2009, Ichimi ve ark 2009, Murakami ve ark 2006, Zanette ve ark 2007). Mevcut çalışmamızda, kordomalarda ise miR-195 nükleus pulposus dokusundan daha yüksek sentezlendiği gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgu literatürdeki diğer kanserlerde gözlenen düşük miktarda sentezi uyumlu olmakla beraber literatürle çelişen sonuçlarda görülmektedir buradaki farklılık çeşitli kanserlerde farklı sinyal yolaklarının aktive olmasıyla ilgili olabilir.

miR-138'in tiroid kanserlerinde düşük miktarda sentezlendiği ve bunun sonucu olarak telomeraz enziminin miktarının artığı gösterilmiştir (Mitomo ve ark 2008). miR-138'in akciğer ve kolon kanserleri gibi daha birçok kanserde düşük miktarda sentezlendiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Baffa ve ark 2009, Liu ve ark 2009, Lu ve ark 2005). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar literatürle uyumluluk göstermektedir.

miR-140-3p, miR-1207-5p, miR-630 ve miR-144 ile alakalı literatür bilgileri oldukça kısıtlı olmakla beraber herhangi bir kanserde farklı miktarlarda ekspresyona uğradığını gösteren net veriler şu ana kadar gösterilmemiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda ise miR-140-3p, miR-1207-5p, miR-630 ve miR-144 miktarlarının kordomalarda nükleus pulposus dokusuyla kıyaslandığında daha yüksek miktarda olduğunu gösterilmiştir.

Kordoma dokularında belirlenen miRNA ekspresyon profili nükleus pulposus dokularıyla kıyaslandığında kordomalarda belirlenen bazı miRNA'ların düşük bazılarının ise yüksek miktarda sentezlenmesi literatürdeki diğer kanserlerde de benzer sonuçların görülmesi kordomaların oluşumundaki biyokimyasal yolaklara ait miRNA ekspresyon profillerine benzemektedir.

Yapılan deneyler sonucunda ortaya çıkan miRNA ekspresyon profili arasındaki farkların kordomaların patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir.

miRNA ekspresyon profilleri genel olarak epitelyum kaynaklı tümörler ve onların sağlıklı dokularının kıyaslanması ile oluşan veriler olması ve nükleus pulposus dokusuna dair daha önce hiç miRNA ekspresyon verisinin olmaması çalışmamızda elde edilen verilerin sağlıklı bir şekilde literatür verileri ile kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır. Kordomaların patolojik olarak kemik tümörleri olduğu ve kemik tümörlerine dair miRNA ekspresyon profilerininde kısıtlı olması bir başka dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kordoma vakalarının nadir karşılaşılan vakalar olması çalışılan vakaların az olması nedeni ile kordomalar üzerinde yapılan çalışmaların istatistiksel anlamlılığını düşürmektedir.

Mevcut çalışma ile belirlenen miRNA'lar, kordoma patogenezindeki rollerini fonksiyonel olarak araştıracak daha kapsamlı çalışmalara öncülük edecektir. Daha ileri çalışmalar ile ilgili miRNA'ların kordomanın tanı ve tedavisindeki rollerinin belirlenmesi ve sonraki yapılacak çalışmalara yön verecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nükleus pulposus dokularından sağlıklı hücre izolasyonu başarılmış ve yapılan primer hücre kültürleri daha sonra RNA izolasyonları için kullanılmıştır. Buradan hareketle nükleus pulposus dokularından direkt olarak RNA izolasyonun çok sağlıklı olmadığı bu dokulardan RNA izolasyonu için bu dokulardan izole edilen hücre kültürlerinden RNA izolasyonunun daha sağlıklı olduğu görülmüştür.

Kordoma'nın patogenezinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi için mevcut çalışma yapılmıştır. Mikroçip kullanılarak elde edilen verilerden 4 kat ve üzerinde ekspresyon kat farkı olan 17 miRNA tespit edilmiştir. Bunlardan 13 miRNA kordomalarda arttığı belirlenmiştir. Bu miRNA'lar; hsa-miR-140-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-126, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-148a, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-630, hsa-miR-451, hsa-miR-144, hsa-miR-181a, hsa-miR-16, hsa-mir-195'dir. Ayrıca kordomalarda ekspresyonu azaldığı gösterilen 4 miRNA tespit edilmiştir. Ekspresyonu azalan bu miRNA'lar; hsa-miR-138, hsa-miR-221, hsa-miR-31, hsa-miR-222'dir. Elde edilen bu primer bulguların istatistiki anlamlılığını güçlendirmek için daha geniş hasta ve kontrol serilerine ihtiyaç vardır.

Mikroçip ile elde edilen bulguların real-time PCR ile doğrulanması yapılan ve kordomalarda düşük miktarda bulunan hsa-miR-31 ile hsa-miR-222 kordoma hücrelerine transfekte edilerek bu miRNA'ların yokluğu ile regülasyonu bozulan biyokimyasal yolaklar aktif hale getirilerek kordoma hücrelerinin proliferasyonun azaltılması söz konusu olabilir. Diğer taraftan, kordomalarda hsa-miR-140-3p ve hsa-miR-148a gibi yüksek miktarda sentezlendiği tespit edilen miRNA'ların anti-miRNA'ları kordoma hücrelerine transfekte edilerek kordomalarda bu yüksek miktardaki miRNA'ların fonksiyonlarını kaybetmeleri sağlanabilir. Bu sayede miRNA'ların degradasyonunda rol oynadığı genler aktif hale getirilerek kordoma hücrelerinde bozuk olan apoptoz yolaklarını tekrar fonksiyonel hale getirilebilir. Yapılan bu çalışma sayesinde kordomalarda bozuk olan biyokimyasal yolakların

belirlenmesi farklı miktarlarda sentezlenen miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesiyle de mümkün olabilir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İnsan Kordomalarında Ekspresyon Farklılıkları olan mikroRNA'ların ve İlgili Transkriptlerin incelenmesi ve Bunların Kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi

Ömer Faruk Bayrak

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

Kanserin ortaya çıkmasında rol oynayan proteinlerin ve onların görev aldığı biyokimyasal yolakların nasıl ve hangi şekilde değiştiğini göstermek kanser moleküler biyolojisinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Hücre ve dokulardaki biyokimyasal yolakların değişimini gözlemlemek için gen ekspresyonun belirlenmesi son derece önemli olmakla beraber gen ekspresyonunu düzenlediği son yıllarda gösterilen ve gen düzenleyici olarak önemli rolü olduğu bildirilen mikroRNA'ların kanserli hücrelerdeki seviyelerinin normal hücrelerle kıyaslanarak araştırılması kanserin tanı, takip ve tedavisinde son derece önemlidir. MikroRNA'lar tümör baskılayıcı genleri yıkımına sebep olabilecekleri gibi onkogenlerin de yıkımından sorumlu olabilirler.

Kordomalar embriyonal notokord kalıntılarından kaynaklanan, genellikle düşük dereceli, nadiren karşılaşılan ve kalsifiye olmuş ve lobüllerden meydana gelmiş bir kemik tümör türüdür. Bölünme hızları düşük olmakla birlikte metastaz yapabildikleri ve bölgesel yıkım gücünün oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Kemoterapi ve radyoterapiye karşı oldukça dirençli olmalarının yanı sıra tümörün tekrarlanma oranının da çok yüksek olması kordomayı ölümcül kılmaktadır.

Bu çalışmada kordomalardaki miRNA ekspresyon profili mikroçip kullanılarak belirlendikten sonra sağlıklı kontrol olarak kullanılan nükleus pulposus dokusundaki miRNA ekspresyon profili ile kıyaslandı. miRNA ekspresyon analizi için kullanılan dokularda toplam 962 miRNA'nın ekspresyonlarına bakıldı. Mikroçip kullanılarak elde edilen verilerden 4 kat ve üzerinde ekspresyon kat farkı olan ve kordomalarda arttığı belirlenen 13 miRNA (hsa-miR-140-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-126, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-148a, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-630, hsa-miR-451, hsa-miR-144, hsa-miR-181a, hsa-miR-16, hsa-miR-195) ayrıca kordomalarda azaldığı gösterilen 4 miRNA (hsa-miR-138, hsa-miR-221, hsa-miR-31, hsa-miR-222) tespit edildi. Elde edilen mikroçip verilerinin doğrulanması için kordomalarda ekspresyonu artan hsa-miR-140-3p ve hsa-miR-148a ayrıca kordomalarda ekspresyonu düşen hsa-miR-31 ve hsa-miR-222'nin ekspresyonları real-time PCR ile konfirme edildi. Sonuç olarak tespit edilen bu miRNA'ların kordomanın patogenezinde önemli biyokimyasal yolaklarda rol oynadıkları düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: miRNA; kordoma; mikroçip.

7. SUMMARY

Evaluation of Differentially Expressed miRNAs, and Their Related Transcripts in Human Chordomas and Detection of the Role of miRNAs in Chordoma Pathogenesis

Showing the way where the proteins play a role in cancer occurrence and the biochemical pathways they take part in, is very important in understanding the molecular biology of cancer. In order to determine gene expression levels, monitoring the changes in biochemical pathways in cells and tissues is equally important by comparing the level of microRNAs, which have been recently shown to be gene expression regulators, in tumor and in normal cells, in order to diagnose, monitor and cure cancer. MicroRNAs can down-regulate tumor suppressor genes as well as oncogenes.

Chordomas are a rare type of bone tumor originating from remnants of embryonic notochord; they are generally low degree tumors, which are, rare, calcified and made up of lobules. Their proliferation rate is low, but has proven to be metastatic and highly destructive locally. Their high resistance to chemotherapy and radiotherapy, in addition to as well as, their high recurrence rate makes these chordomas lethal.

In this study, the miRNA expression profile of chordomas has been compared to that of the healthy control cells (nucleus pulposus cells) by using microarray technique. In the tissues used for this expression analysis, a total of 962 miRNAs have been analyzed for their expression levels. In the data obtained by using microarray, 13 miRNAs that have been to have a four fold or above up-regulated in chordomas (hsa-miR-140-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-126, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-148a, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-630, hsa-miR-451, hsa-miR-144, hsa-miR-181a, hsa-miR-16, hsa-miR-195) and 4 miRNAs that showed down-regulated in chordomas (hsa-miR-138, hsa-miR-221, hsa-miR-31, hsa-miR-222) were detected. To validate the data obtained from the microarray experiment, the expression levels of the over-expressed hsa-miR-140-3p and hsa-miR-148a and the down-regulated hsa-miR-31 and hsa-miR-222 miRNAs were confirmed by real-time PCR assay. As a result, the detected miRNAs are thought to be playing important roles in the biochemical pathways of chordoma pathogenesis.

Key Words: miRNA; chordoma; microarray.

KAYNAKLAR

1. Abboudi Z, Patel K, Naresh KN. Cyclin D1 expression in typical chronic lymphocytic leukaemia. European Journal of Haematology 2009;83:203-7.

2. Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, *ve ark*. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. Science 2005;310:317-20.

3. Agilent GeneSpringGX10. In: 2010.

4. Ahlhelm F, Nabhan A, Naumann N, Grunwald I, Shariat K, Reith W. Skull base tumors. Radiologe 2005;45:807-15.

5. Ahn SH, Cho YW, Ahn MW, Jang SH, Sohn YK, Kim HS. mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs. Spine 2002;27:911-7.

6. Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. Bioinformatics 2009;25:3049-55.

7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, *ve ark*. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000;403:503-11.

8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Sabet H, Tran T, *ve ark*. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1999;64:71-8.

9. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. J Pathol 2001;195:41-52.

10. Almefty KK, Pravdenkova S, Sawyer JR, Al-Mefty O. Impact of cytogenetic abnormalities on the management of skull base chordomas Clinical article. Journal of Neurosurgery 2009;110:715-24.

11. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. Development 2005;132:4653-62.

12. Ambros V. microRNAs: Tiny regulators with great potential. Cell 2001;107:823-6.

13. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004;431:350-5.

14. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, *ve ark*. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. Cancer Res 2008;68:6162-70.

15. Andersson BS, Mroue M, Britten RA, Murray D. The Role of Dna-Damage in the Resistance of Human Chronic Myeloid-Leukemia Cells to Cyclophosphamide Analogs. Cancer Research 1994;54:5394-400.

16. Andrechek ER, Muller WJ. Tyrosine kinase signalling in breast cancer - Tyrosine kinase-mediated signal transduction in transgenic mouse models of human breast cancer. Breast Cancer Research 2000;2:211-6.

17. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. Science 2007;318:761-4.

18. Arola J, Salmenkivi K, Liu J, Kahri AI, Heikkila P. p53 and Ki67 in adrenocortical tumors. Endocrine Research 2000;26:861-5.

19. Arslan E, Laurenzi IJ. An efficient algorithm for the stochastic simulation of the hybridization of DNA to microarrays. BMC Bioinformatics 2009;10:411.

20. Auer RL, Riaz S, Cotter FE. The 13q and 11q B-cell chronic lymphocytic leukaemia-associated regions derive from a common ancestral region in the zebrafish. Br J Haematol 2007;137:443-53.

21. Auger M, Raney B, Callender D, Eifel P, Ordonez NG. Metastatic Intracranial Chordoma in A Child with Massive Pulmonary Tumor Emboli. Pediatric Pathology 1994;14:763-70.

22. Axon GenePix 4200A. In: 2010.

23. Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: Tissue specificity and functional inference. Rna-A Publication of the Rna Society 2004;10:1813-9.

24. Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu CG, Palazzo JP, *ve ark*. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. J Pathol 2009;219:214-21.

25. Bailey CS, Fisher CG, Boyd MC, Dvorak MFS. En bloc marginal excision of a multilevel cervical chordoma - Case report. Journal of Neurosurgery-Spine 2006;4:409-14.

26. Bailey SG, Sanchez-Elsner T, Stephanou A, Cragg MS, Townsend PA. Regulating the genome surveillance system: miRNAs and the p53 super family. Apoptosis 2010;15:541-52.

27. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, *ve ark*. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. Mol Cancer 2006;5:29.

28. Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, *ve ark*. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. Genome Research 2004;14:2486-94.

29. Barnabas N, Moraes R, Calaf G, Estrada S, Russo J. Role of P53 in Mcf-10F Cell Immortalization and Chemically-Induced Neoplastic Transformation. International Journal of Oncology 1995;7:1289-96.

30. Barnes L. Pathobiology of Selected Tumors of the Base of the Skull. Skull Base Surgery 1991;1:207-16.

31. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from Cell, vol 116, pg 281-297, 2004). Cell 2007;131:11-29.

32. Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, *ve ark*. The p16-cyclin D Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. Cancer Research 1996;56:5475-83.

33. Bayrakli F, Guney I, Kilic T, Ozek M, Pamir MN. New candidate chromosomal regions for chordoma development. Surgical Neurology 2007;68:425-30.

34. Beatson GT. On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma - Suggestions for A New Method of Treatment, with Illustrative Cases. Ca-A Cancer Journal for Clinicians 1983;33:108-21.

35. Beddington RSP, Rashbass P, Wilson V. Brachyury - A Gene Affecting Mouse Gastrulation and Early Organogenesis. Development 1992:157-65.

36. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RHA, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell 2005;120:21-4.

37. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. Nucleic Acids Research 2008;36:D149-D153.

38. Bhadra AK, Casey ATH. Familial chordoma - A report of two cases. Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume 2006;88B:634-6.

39. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2006;71:513-21.

40. Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, *ve ark*. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. Genome Res 2004;14:287-95.

41. Bisceglia M, D'Angelo VA, Guglielmi G, Ben Dor D, Pasquinelli G. Dedifferentiated chordoma of the thoracic spine with rhabdomyosarcomatous differentiation. Report of a case and review of the literature. Annals of Diagnostic Pathology 2007;11:262-73.

42. Bishop JAN, Bishop DT. The genetics of susceptibility to cutaneous melanoma. Drugs of Today 2005;41:193-203.

43. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. Rna-A Publication of the Rna Society 2004;10:185-91.

44. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Mussi A, Fontanini G. CDC25B: relationship with angiogenesis and prognosis in non-small cell lung carcinoma. Human Pathology 2007;38:1563-8.

45. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, *ve ark*. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. Curr Biol 2007;17:1298-307.

46. Boominathan L. The Tumor Suppressors p53, p63, and p73 Are Regulators of MicroRNA Processing Complex. Plos One 2010;5.

47. Borden JR, Paredes CJ, Papoutsakis ET. Diffusion, mixing, and associated dye effects in DNA-microarray hybridizations. Biophys J 2005;89:3277-84.

48. Boulikas T. The Phosphorylation Connection to Cancer (Review). International Journal of Oncology 1995;6:271-8.

49. Bova F, Spiegelmann R, Friedman WA. A Device for Experimental Radiosurgery. Stereotactic and Functional Neurosurgery 1991;56:213-9.

50. Brackmann DE, Teufert KB. Chondrosarcoma of the skull base: Long-term follow-up. Otology & Neurotology 2006;27:981-91.

51. Brandal P, Bjerkehagen B, Danielsen H, Heim S. Chromosome 7 abnormalities are common in chordomas. Cancer Genetics and Cytogenetics 2005;160:15-21.

52. Brown JR, Sanseau P. A computational view of microRNAs and their targets. Drug Discovery Today 2005;10:595-601.

53. Brunelleschi S, Penengo L, Santoro MM, Gaudino G. Receptor tyrosine kinases as target for anti-cancer therapy. Current Pharmaceutical Design 2002;8:1959-72.

54. Buhring HJ, Sures I, Jallal B, Weiss FU, Busch FW, Ludwig WD, *ve ark*. The Receptor Tyrosine Kinase P185(Her2) Is Expressed on A Subset of B-Lymphoid Blasts from Patients with Acute Lymphoblastic-Leukemia and Chronic Myelogenous Leukemia. Blood 1995;86:1916-23.

55. Burnworth B, Popp S, Stark HJ, Steinkraus V, Broecker EB, Hartschuh W, *ve ark*. Gain of 11q/cyclin D1 overexpression is an essential early step in skin cancer development and causes abnormal tissue organization and differentiation. Oncogene 2006;25:4399-412.

56. Cai XZ, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna-A Publication of the Rna Society 2004;10:1957-66.

57. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *ve ark*. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:15524-9.

58. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, *ve ark*. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine 2005;353:1793-801.

59. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, *ve ark*. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004a;101:11755-60.

60. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, *ve ark*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A 2004b;101:2999-3004.

61. Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La RM, Dagnino L, *ve ark*. Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. Am J Hematol 2010;85:331-9.

62. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, *ve ark*. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. Clin Cancer Res 2008;14:1340-8.

63. Carlomagno F, Santoro M. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer therapeutics. Current Medicinal Chemistry 2005;12:1773-81.

64. Carrabba G, Dehdashti AR, Gentili F. Surgery for clival lesions: open resection versus the expanded endoscopic endonasal approach. Neurosurgical Focus 2008;25.

65. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. Science 2003;301:336-8.

66. Casali PG, Messina A, Stacchiotti S, Tamborini E, Crippa F, Gronchi A, *ve ark*. Imatinib mesylate in chordoma. Cancer 2004;101:2086-97.

67. Casali PG, Stacchiotti S, Messina A, Tamborini E, Martini C, Ripamonti C, *ve ark*. Imatinib mesylate in 18 advanced chordoma patients. Journal of Clinical Oncology 2005;23:819S.

68. Casali PG, Stacchiotti S, Sangalli C, Olmi P, Gronchi A. Chordoma. Current Opinion in Oncology 2007;19:367-70.

69. Castellone MD, Carlomagno F, Salvatore G, Santoro M. Receptor tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2008;22:1023-38.

70. Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, *ve ark*. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer 2008;123:2791-7.

71. Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, *ve ark*. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. Cancer Cell 2009a;16:309-23.

72. Chauhan P, Sodhi A, Shrivastava A. Cisplatin primes murine peritoneal macrophages for enhanced expression of nitric oxide, proinflammatory cytokines, TLRs, transcription factors and activation of MAP kinases upon co-incubation with L929 cells. Immunobiology 2009b;214:197-209.

73. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, *ve ark*. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. Oncogene 2009;28:1385-92.

74. Chen XM. microRNA biogenesis and function in plants. Febs Letters 2005;579:5923-31.

75. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res 2005a;33:1290-7.

76. Cheng LC, Tavazoie M, Doetsch F. Stem cells: From epigenetics to microRNAs. Neuron 2005b;46:363-7.

77. Cho RW, Wang XH, Diehn M, Shedden K, Chen GY, Sherlock G, *ve ark*. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. Stem Cells 2008a;26:364-71.

78. Cho YH, Kim JH, Khang SK, Lee JK, Kim CJ. Chordomas and chondrosarcomas of the skull base: comparative analysis of clinical results in 30 patients. Neurosurgical Review 2008b;31:35-43.

79. Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of Nucleus Pulposus Precursor Cells and Notochordal Remnants in the Mouse: Implications for Disk Degeneration and Chordoma Formation. Developmental Dynamics 2008;237:3953-8.

80. Christoforou N, Miller RA, Hill CM, Jie CC, McCallion AS, Gearhart JD. Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. Journal of Clinical Investigation 2008;118:894-903.

81. Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: Biogenesis, function and applications. Current Opinion in Molecular Therapeutics 2009;11:189-99.

82. Chugh R, Tawbi H, Lucas DR, Biermann JS, Schuetze SM, Baker LH. Chordoma: The nonsarcoma primary bone tumor. Oncologist 2007;12:1344-50.

83. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *ve ark*. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:13944-9.

84. Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. Oncogene 1999;18:2916-24.

85. Colombo S, Peri F, Tisi R, Nicotra F, Martegani E. Design and characterization of a new class of inhibitors of Ras activation. Signal Transduction Pathways, Chromatin Structure, and Gene Expression Mechanisms As Therapeutic Targets 2004;1030:52-61.

86. Combs SE, Nikoghosyan A, Jaekel O, Karger CP, Haberer T, Munter MW, *ve ark*. Carbon Ion Radiotherapy for Pediatric Patients and Young Adults Treated for Tumors of the Skull Base. Cancer 2009;115:1348-55.

87. Couzin J. Cancer biology. A new cancer player takes the stage. Science 2005;310:766-7.

88. Creighton CJ, Fountain MD, Yu ZF, Nagaraja AK, Zhu HF, Khan M, *ve ark*. Molecular Profiling Uncovers a p53-Associated Role for MicroRNA-31 in Inhibiting the Proliferation of Serous Ovarian Carcinomas and Other Cancers. Cancer Research 2010;70:1906-15.

89. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med 2008;358:502-11.

90. Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. J Pharmacol Toxicol Methods 2000;44:291-300.

91. Dalpra L, Malgara R, Miozzo M, Riva P, Volonte M, Larizza L, *ve ark*. First cytogenetic study of a recurrent familial chordoma of the clivus. International Journal of Cancer 1999;81:24-30.

92. Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. Cell Communication and Signaling 2009;7.

93. de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3 ' UTR in development and differentiation. Seminars in Cell & Developmental Biology 2005;16:49-58.

94. Dehdashti AR, Karabatsou K, Ganna A, Witterick I, Gentili F, Cappabianca P, *ve ark*. Expanded endoscopic endonasal approach for treatment of clival chordomas: Early results in 12 patients. Neurosurgery 2008;63:299-309.

95. Della Torre G, Pasini B, Frigerio S, Donghi R, Rovini D, Delia D, *ve ark*. CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. British Journal of Cancer 2001;85:836-44.

96. Deodhar SD, James K, Chiang T, Edinger M, Barna BP. Inhibition of lung metastases in mice bearing a malignant fibrosarcoma by treatment with liposomes containing human C-reactive protein. Cancer Res 1982;42:5084-8.

97. Descamps S, Prigent C. Protein kinases aurora, centrosome amplification, aneuploidy, and cancers. M S-Medecine Sciences 2002;18:474-80.

98. Dobashi Y, Suzuki S, Sato E, Hamada Y, Yanagawa T, Ooi A. EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. Modern Pathology 2009;22:1328-40.

99. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes & Development 2004;18:504-11.

100. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, *ve ark*. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine 2000;343:1910-6.

101. Duan ZF, Choy E, Nielsen GP, Rosenberg A, Iafrate J, Yang C, *ve ark*. Differential Expression of microRNA (miRNA) in Chordoma Reveals a Role for miRNA-1 in Met Expression. Journal of Orthopaedic Research 2010;28:746-52.

102. Eberhart JK, He X, Swartz ME, Yan YL, Song H, Boling TC, *ve ark*. MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. Nat Genet 2008;40:290-8.

103. Eisenberg MB, Woloschak M, Sen C, Wolfe D. Loss of heterozygosity in the retinoblastoma tumor suppressor gene in skull base chordomas and chondrosarcomas. Surgical Neurology 1997;47:156-60.

104. ElBayoumi TA, Torchilin VP. Tumor-specific antibody-mediated targeted delivery of Doxil reduces the manifestation of auricular erythema side effect in mice. Int J Pharm 2008;357:272-9.

105. Eshkoor SA, Ismail P, Rahman SA, Mirinargesi M, Oshkour SA. Increased protein expression of p16 and cyclin D1 in squamous cell carcinoma tissues. Biosci Trends 2009;3:105-9.

106. Evan GI, di Fagagna FD. Cellular senescence: hot or what? Current Opinion in Genetics & Development 2009;19:25-31.

107. Fatemi N, Dusick JR, Gorgulho AA, Mattozo CA, Moftakhar P, de Salles AAF, *ve ark*. Endonasal microscopic removal of clival chordomas. Surgical Neurology 2008;69:331-8.

108. Fegers I, Kob R, Eckey M, Schmidt O, Goeman F, Papaioannou M, *ve ark*. The tumor suppressors p331NG1 and p331NG2 interact with alien in vivo and enhance alien-mediated gene silencing. Journal of Proteome Research 2007;6:4182-8.

109. Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, *ve ark*. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. Development 2003;130:4217-27.

110. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, *ve ark*. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. Cancer Res 2008;68:2745-54.

111. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, *ve ark*. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:18081-6.

112. Felton JS. The heritage of Bernardino Ramazzini. Occup Med (Lond) 1997;47:167-79.

113. Feng W, Brown RE, Trung CD, Li W, Wang L, Khoury T, *ve ark*. Morphoproteomic profile of mTOR, Ras/Raf kinase/ERK, and NF-kappaB pathways in human gastric adenocarcinoma. Ann Clin Lab Sci 2008;38:195-209.

114. Fernandez PC, Frank SR, Wang LQ, Schroeder M, Liu SX, Greene J, *ve ark*. Genomic targets of the human c-Myc protein. Genes & Development 2003;17:1115-29.

115. Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, Cavazzini F, Veronese A, Ciccone M, *ve ark*. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. Mol Cancer 2010;9:123.

116. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 1998;391:806-11.

117. Fischer GA. Detective transport of amethopterin (methotrexate) as a mechanism of resistance to the antimetabolite in L5178Y leukemic cells. Biochem Pharmacol 1962;11:1233-4.

118. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, *ve ark*. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. Dev Cell 2008;15:272-84.

119. Fleming GF, Heimann PS, Stephens JK, Simon MA, Ferguson MK, Benjamin RS, *ve ark*. Dedifferentiated Chordoma - Response to Aggressive Chemotherapy in 2 Cases. Cancer 1993;72:714-8.

120. Flores JF, Pollock PM, Walker GJ, Glendening JM, Lin AHT, Palmer JM, *ve ark*. Analysis of the CDKN2A, CDKN2B and CDK4 genes in 48 Australian melanoma kindreds. Oncogene 1997;15:2999-3005.

121. Floyd SK, Bowman JL. Gene regulation: Ancient microRNA target sequences in plants. Nature 2004;428:485-6.

122. Foglieni B, Brisci A, San BF, Di PP, Petralia S, Conoci S, *ve ark*. Integrated PCR amplification and detection processes on a Lab-on-Chip platform: a new advanced solution for molecular diagnostics. Clin Chem Lab Med 2010;48:329-36.

123. Forman JJ, Coller HA. The code within the code: MicroRNAs target coding regions. Cell Cycle 2010;9.

124. Forssen EA, Tokes ZA. Improved therapeutic benefits of doxorubicin by entrapment in anionic liposomes. Cancer Res 1983;43:546-50.

125. Foweraker KL, Burton KE, Maynard SE, Jena R, Jefferies SJ, Laing RJC, *ve ark*. High-dose radiotherapy in the management of chordoma chondrosarcoma of the skull base and cervical spine: Part 1 - Clinical outcomes. Clinical Oncology 2007;19:509-16.

126. Fraczek M, Wozniak Z, Ramsey D, Krecicki T. Expression patterns of cyclin E, cyclin A and CDC25 phosphatases in laryngeal carcinogenesis. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 2007;264:923-8.

127. Fraser R, White JC, . Monocytic leukaemia in an adult treated with aminopterin. Postgrad Med J 1950;26:85-90, illust.

128. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, *ve ark*. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. Oncogene 2004;23:7436-40.

129. Fujita N, Miyamoto T, Imai JI, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, *ve ark*. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005;338:1890-6.

130. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, *ve ark*. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. Blood 2007;109:4944-51.

131. Gabizon A, Dagan A, Goren D, Barenholz Y, Fuks Z. Liposomes as in vivo carriers of adriamycin: reduced cardiac uptake and preserved antitumor activity in mice. Cancer Res 1982;42:4734-9.

132. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, *ve ark*. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. J Biol Chem 2007;282:23716-24.

133. Gao LZ, Liu L, vanMeyel D, Cairncross G, Forsyth P, Kimmel D, *ve ark*. Lack of germ-line mutations of CDK4, p16INK4A, and p15INK4B in families with glioma. Clinical Cancer Research 1997;3:977-81.

134. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:827-35.

135. Georges SA, Chau BN, Braun CJ, Zhang X, Dobbelstein M. Cell cycle arrest or apoptosis by p53: are microRNAs-192/215 and -34 making the decision? Cell Cycle 2009;8:680-1.

136. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. Journal of Clinical Pathology 2001;54:229-35.

137. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nature Reviews Genetics 2009;10:94-108.

138. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, *ve ark*. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999;286:531-7.

139. Gotz W, Kasper M, Miosge N, Hughes RC. Detection and distribution of the carbohydrate binding protein galectin-3 in human notochord, intervertebral disc and chordoma. Differentiation 1997;62:149-57.

140. Grabellus F, Konik MJ, Worm K, Sheu SY, van de Nes JA, Bauer S, *ve ark*. MET overexpressing chordomas frequently exhibit polysomy of chromosome 7 but no MET activation through sarcoma-specific gene fusions. Tumour Biol 2010;31:157-63.

141. Green D, Mcpherson E, Byrne PJ, Schein PS. Studies on the Reduced Bone-Marrow Toxicity of C6-Galactose Nitrogen-Mustard. Proceedings of the American Association for Cancer Research 1985;26:215.

142. Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi - 1998 update. Cancer 1999;86:2464-77.

143. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing (Reprinted from Cell, vol 123, pg 631-640, 2005). Cell 2007;131:63-73.

144. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. Nucleic Acids Research 2004;32:D109-D111.

145. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Research 2006;34:D140-D144.

146. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Research 2008;36:D154-D158.

147. Grignani F, Martelli M, Tonato M. [Antimetabolites in the therapy of acute human leukoses. Mechanism of action and conditioning factors in the cellular response to drugs. I]. Clin Ter 1974;69:67-86.

148. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, *ve ark*. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C-elegans developmental timing. Cell 2001;106:23-34.

149. Gruber F, Kastelan M, Brajac I, Saftic M, Peharda V, Cabrijan L, *ve ark*. Molecular and Genetic Mechanisms in Melanoma. Collegium Antropologicum 2008;32:147-52.

150. Guedes A, Barreto BG, Barreto LGS, Araujo IBD, Queiroz AC, Athanazio DA, *ve ark*. Metastatic parachordoma. Journal of Cutaneous Pathology 2009;36:270-3.

151. Gumina MR, Xu CJ, Chiles TC. Cyclin D3 is dispensable for human diffuse large B-cell lymphoma survival and growth Evidence for redundancy with cyclin E. Cell Cycle 2010;9:820-8.

152. Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, *ve ark*. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:652-7.

153. Guo JC, Kleeff J, Li JS, Ding JY, Hammer J, Zhao YP, *ve ark*. Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncogene 2004;23:71-81.

154. Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, *ve ark*. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res 2008;68:26-33.

155. Gupta M, Dillon SR, Ziesmer SC, Feldman AL, Witzig TE, Ansell SM, *ve ark*. A proliferation-inducing ligand mediates follicular lymphoma B-cell proliferation and cyclin D1 expression through phosphatidylinositol 3-kinase-regulated mammalian target of rapamycin activation. Blood 2009;113:5206-16.

156. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nature Reviews Cancer 2002;2:331-41.

157. Halaban R. Melanoma cell autonomous growth: The Rb/E2F pathway. Cancer and Metastasis Reviews 1999;18:333-43.

158. Hallor KH, Staaf J, Jonsson G, Heidenblad M, von Steyern FV, Bauer HCF, *ve ark*. Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. British Journal of Cancer 2008;98:434-42.

159. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.

160. Hart PL. A case of monocytic leukaemia treated with aminopterin. Br Med J 1949;2:363.

161. Hasegawa K, Homma T, Hirano T, Ogose A, Hotta T, Yajiri Y, *ve ark*. Margin-free spondylectomy for extended malignant spine tumors: Surgical technique and outcome of 13 cases. Spine 2007a;32:142-8.

162. Hasegawa T, Ishii D, Kida Y, Yoshimoto M, Koike J, Iizuka H. Gamma Knife surgery for skull base chordomas and chondrosarcomas. Journal of Neurosurgery 2007b;107:752-7.

163. Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. Nature 2005;435:974-8.

164. Hayashi K, Hoshida Y, Horie Y, Takahashi K, Taguchi K, Sonobe H, *ve ark*. Immunohistochemical Study on the Distribution of Alpha-Subunit and Beta-Subunit of S-100 Protein in Brain-Tumors. Acta Neuropathologica 1991;81:657-63.

165. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, *ve ark*. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Research 2005;65:9628-32.

166. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, *ve ark*. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2005a;102:19075-80.

167. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, *ve ark*. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature 2005b;435:828-33.

168. Hedenfalk IA. Gene expression profiling of hereditary and sporadic ovarian cancers reveals unique BRCA1 and BRCA2 signatures. J Natl Cancer Inst 2002;94:960-1.

169. Hedenfalk IA, Ringner M, Trent JM, Borg A. Gene expression in inherited breast cancer. Adv Cancer Res 2002;84:1-34.

170. Henderson FC, McCool K, Seigle J, Jean W, Harter W, Gagnon GJ. Treatment of Chordomas with Cyberknife: Georgetown University Experience and Treatment Recommendations. Neurosurgery 2009;64:A44-A53.

171. Henderson SR, Guiliano D, Presneau N, McLean S, Frow R, Vujovic S, *ve ark*. A molecular map of mesenchymal tumors. Genome Biology 2005;6.

172. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, *ve ark*. Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA. Plos Biology 2009;7.

173. Heron MP. Deaths: Final data for 2006. In. National vital statistics reports: National Center for Health Statistics, 2009.

174. Herrmann BG. Expression Pattern of the Brachyury Gene in Whole-Mount Twis/Twis Mutant Embryos. Development 1991;113:913-&.

175. Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, *ve ark*. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. Cancer Sci 2010;101:241-9.

176. Hof H, Welzel T, Debus J. Effectiveness of cetuximab/gefitinib in the therapy of a sacral chordoma. Onkologie 2006;29:572-4.

177. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in Human Cancers. Science 1991;253:49-53.

178. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. Developmental Cell 2003;5:351-8.

179. Hsu PWC, Huang HD, Hsu SD, Lin LZ, Tsou AP, Tseng CP, *ve ark*. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. Nucleic Acids Research 2006;34:D135-D139.

180. Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PWC, *ve ark*. miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. Nucleic Acids Research 2008;36:D165-D169.

181. Hug EB, Sweeney RA, Nurre PM, Holloway KC, Slater JD, Munzenrider JE. Proton radiotherapy in management of pediatric base of skull tumors. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 2002;52:1017-24.

182. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer - I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. Journal of Urology 2002;168:9-12.

183. Hui Z, Tretiakova M, Zhang Z, Li Y, Wang X, Zhu JX, *ve ark*. Radiosensitization by inhibiting STAT1 in renal cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009;73:288-95.

184. Humzah MD, Soames RW. Human Intervertebral-Disk - Structure and Function. Anatomical Record 1988;220:337-56.

185. Hunt JM. Cancer nursing: Principles and practice, 4th edition. Journal of Advanced Nursing 2000;31:732.

186. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 2001;293:834-8.

187. Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. Sequence-specific inhibition of small RNA function. Plos Biology 2004;2:465-75.

188. Hwang-Verslues WW, Chang KJ, Lee EY, Lee WH. Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes. J Formos Med Assoc 2008;107:751-66.

189. Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, Kunimoto R, Chiyomaru T, Kawamoto K, *ve ark*. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. Int J Cancer 2009;125:345-52.

190. Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, Shimizu K, Tsujimoto G. MicroRNA-34a Inhibits Cell Proliferation by Repressing Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 during Megakaryocytic Differentiation of K562 Cells. Molecular Pharmacology 2010;77:1016-24.

191. Igaki H, Tokuuye K, Okumura T, Sugahara S, Kagei K, Hata M, *ve ark*. Clinical results of proton beam therapy for skull base chordoma. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 2004;60:1120-6.

192. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, *ve ark*. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 2005;65:7065-70.

193. Ishii N, de Tribolet N. Are p53 mutations and p53 overexpression prognostic factors for astrocytic tumors? Critical Reviews in Neurosurgery 1998;8:269-74.

194. Ivanov SV, Goparaju CM, Lopez P, Zavadil J, Toren-Haritan G, Rosenwald S, *ve ark*. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. J Biol Chem 2010;285:22809-17.

195. Janes PW, Daly RJ, Defazio A, Sutherland RL. Activation of the Ras Signaling Pathway in Human Breast-Cancer Cells Overexpressing Erbb-2. Oncogene 1994;9:3601-8.

196. Jeanrot C, Vinh TS, Anract P, de Pinieux G, Ouaknine M, Forest M, *ve ark*. Sacral chordoma: retrospective review of II surgically treated cases. Revue de Chirurgie Orthopedique et Reparatrice de l Appareil Moteur 2000;86:684-93.

197. Jereczek-Fossa BA, Krengli M, Orecchia R. Particle beam radiotherapy for head and neck tumors: Radiobiological basis and clinical experience. Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck 2006;28:750-60.

198. Jiang WH, Zhao SP, Xie ZH, Zhang H, Zhang JY, Xiao JY. Endoscopic resection of chordomas in different clival regions. Acta Oto-Laryngologica 2009;129:71-83.

199. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. PLoS Biol 2004;2:e363.

200. Johnson PC, Nagle RB. Differential-Diagnosis of Chordoma from Chondrosarcoma Using Cytokeratin Immunohistochemistry. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 1984;43:339.

201. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, *ve ark*. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. Cell 2005;120:635-47.

202. Jones HE, Barrow D, Dutkowski CM, Goddard L, Smith C, Harper ME, *ve ark*. Effect of an EGF-R selective tyrosine kinase inhibitor and an anti-androgen on LNCaP cells: Identification of divergent growth regulatory pathways. Prostate 2001;49:38-47.

203. Juliao SF, Rand N, Schwartz HS. Galectin-3: a biologic marker and diagnostic aid for chordoma. Clin Orthop Relat Res 2002:70-5.

204. Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, Hosaka T, Yamamoto H, Nakashima Y, *ve ark*. Amplification of the CDK4 gene in sarcomas: Tumor specificity and relationship with the RB gene mutation. Anticancer Research 1998;18:2317-21.

205. Karger CP, Peschke P, Sanchez-Brandelik R, Scholz M, Debus J. Radiation tolerance of the rat spinal cord after 6 and 18 fractions of photons and carbon ions: Experimental results and clinical implications. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 2006;66:1488-97.

206. Kavka AI, Green JBA. Tales of tails: Brachyury and the T-box genes. Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer 1997;1333:F73-F84.

207. Kelley MJ, Korczak JF, Sheridan E, Yang XH, Goldstein AM, Parry DM. Familial chordoma, a tumor of notochordal remnants, is linked to chromosome 7q33. American Journal of Human Genetics 2001;69:454-60.

208. Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C-elegans. Genes & Development 2001;15:2654-9.

209. Kikkawa N, Hanazawa T, Fujimura L, Nohata N, Suzuki H, Chazono H, *ve ark*. miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). Br J Cancer 2010;103:877-84.

210. Kilgore SP, Prayson RA. Apoptotic and proliferative markers in chordomas: A study of 26 tumors. Laboratory Investigation 2001;81:14A.

211. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005;6:376-85.

212. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m(7)G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. Cell 2007;129:1141-51.

213. Knudson AG. Hereditary cancer: Two hits revisited. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1996;122:135-40.

214. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, *ve ark*. Combinatorial microRNA target predictions. Nature Genetics 2005;37:495-500.

215. Krishnan S, Foote RL, Brown PD, Pollock BE, Link MJ, Garces YI. Radiosurgery for cranial base chordomas and chondrosarcomas. Neurosurgery 2005;56:777-83.

216. Krivtsov AV, Wang Y, Feng Z, Armstrong SA. Gene expression profiling of leukemia stem cells. Methods Mol Biol 2009;538:231-46.

217. Kuzniacka A, Mertens F, Strombeck B, Wiegant J, Mandahl N. Combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization analysis of chordoma. Cancer Genetics and Cytogenetics 2004;151:178-81.

218. Laezza C, Pisanti S, Crescenzi E, Bifulco M. Anandamide inhibits Cdk2 and activates Chk1 leading to cell cycle arrest in human breast cancer cells. Febs Letters 2006;580:6076-82.

219. Lagonigro MS, Tamborini E, Negri T, Staurengo S, Dagrada GP, Miselli F, *ve ark*. PDGFR alpha, PDGFR beta and KIT expression/activation in conventional chondrosarcoma. Journal of Pathology 2006;208:615-23.

220. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3 ' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. Nature Genetics 2002;30:363-4.

221. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of Drosophila microRNA genes. Genome Biology 2003;4.

222. Lane DP. Cancer - P53, Guardian of the Genome. Nature 1992;358:15-6.

223. Langer C, Marcucci G, Holland KB, Radmacher MD, Maharry K, Paschka P, *ve ark*. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. J Clin Oncol 2009;27:3198-204.

224. Lax I, Blomgren H, Naslund I, Svanstrom R. Stereotaxic Radiotherapy of Malignancies in the Abdomen - Methodological Aspects. Acta Oncologica 1994;33:677-83.

225. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, *ve ark*. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. Int J Cancer 2007;120:1046-54.

226. Lee PH, Sawan SP, Modrusan Z, Arnold LJ, Jr., Reynolds MA. An efficient binding chemistry for glass polynucleotide microarrays. Bioconjug Chem 2002a;13:97-103.

227. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C-Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small Rnas with Antisense Complementarity to Lin-14. Cell 1993;75:843-54.

228. Lee RC, Hammell CM, Ambros V. Interacting endogenous and exogenous RNAi pathways in Caenorhabditis elegans. Rna-A Publication of the Rna Society 2006;12:589-97.

229. Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Paris AJ, Yea S, Narla G, Walsh M, *ve ark*. Tumor suppressor activity of KLF6 mediated by downregulation of the PTTG1 oncogene. Febs Letters 2010;584:1006-10.

230. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. Embo Journal 2002b;21:4663-70.

231. Lee Y, Kim M, Han JJ, Yeom KH, Lee S, Baek SH, *ve ark*. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. Embo Journal 2004;23:4051-60.

232. Lee-Jones L, Aligianis I, Davies PA, Puga A, Farndon PA, Stemmer-Rachamimov A, *ve ark*. Sacrococcygeal chordomas in patients with tuberous sclerosis complex show somatic loss of TSC1 or TSC2. Genes Chromosomes & Cancer 2004;41:80-5.

233. Levens D. Disentangling the MYC web. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99:5757-9.

234. Levine AM, Coleman C, Horasek S. Stereotactic Radiosurgery for the Treatment of Primary Sarcomas and Sarcoma Metastases of the Spine. Neurosurgery 2009;64:A54-A59.

235. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 2005;120:15-20.

236. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell 2003;115:787-98.

237. Li L, Meng T, Jia ZL, Zhu GQ, Shi B. Single Nucleotide Polymorphism Associated With Nonsyndromic Cleft Palate Influences the Processing of miR-140. American Journal of Medical Genetics Part A 2010;152A:856-62.

238. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, *ve ark*. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2008;123:1616-22.

239. Li ZR, Van Calcar S, Qu CX, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B. A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100:8164-9.

240. Liang RQ, Li W, Li Y, Tan CY, Li JX, Jin YX, *ve ark*. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. Nucleic Acids Research 2005;33.

241. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate MicroRNA genes. Science 2003a;299:1540.

242. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, *ve ark*. The microRNAs of Caenorhabditis elegans. Genes & Development 2003b;17:991-1008.

243. Lin SL, Chang D, Ying SY. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. Gene 2005;356:32-8.

244. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. RNA 2008;14:417-24.

245. Liu AL, Wang ZC, Sun SB, Wang MH, Luo B, Liu P. Gamma knife radiosurgery for residual skull base chordomas. Neurological Research 2008;30:557-61.

246. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, *ve ark*. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004;101:9740-4.

247. Liu H, Bebu I, Li X. Microarray probes and probe sets. Front Biosci (Elite Ed) 2010;2:325-38.

248. Liu X, Yu J, Jiang L, Wang A, Shi F, Ye H, *ve ark*. MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Genomics Proteomics 2009;6:131-9.

249. Loehn B, Walvekar RR, Harton A, Nuss D. Mandibular metastasis from a skull base chordoma: report of a case with review of literature. Skull Base 2009;19:363-8.

250. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *ve ark*. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005;435:834-8.

251. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science 2004;303:95-8.

252. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5 ' UTR as in the 3 ' UTR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007;104:9667-72.

253. Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA. Molecular Biology Underlying the Clinical Heterogeneity of Prostate Cancer An Update. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2009;133:1033-40.

254. Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, *ve ark*. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. British Journal of Cancer 1996;73:909-16.

255. Maitra A, Wistuba II, Gazdar AF. Microdissection and the study of cancer pathways. Curr Mol Med 2001;1:153-62.

256. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer 2009;9:153-66.

257. Manhani R, Cristofani LM, Odone V, Bendit I. Concomitant p53 mutation and MYCN amplification in neuroblastoma. Medical and Pediatric Oncology 1997;29:206-7.

258. Mannefeld M, Klassen E, Gaubatz S. B-MYB is required for recovery from the DNA damage-induced G2 checkpoint in p53 mutant cells. Cancer Res 2009;69:4073-80.

259. Mansi JL, Smith IE, Walsh G, Sinnett HD, Mckinna JA. Primary Medical Therapy in Operable Breast-Cancer. British Journal of Cancer 1989;60:448.

260. Marucci L, Niemierko A, Liebsch NJ, Aboubaker F, Liu MCC, Munzenrider JE. Spinal cord tolerance to high-dose fractionated 3D conformal proton-photon irradiation as evaluated by equivalent uniform dose and dose volume histogram analysis. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 2004;59:551-5.

261. Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, Haller A, Ninane V, Burny A, *ve ark*. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. Eur Respir J 2009;33:352-9.

262. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, *ve ark*. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex elF4F. Science 2007;317:1764-7.

263. Matsuda Y, Schlange T, Oakeley EJ, Boulay A, Hynes NE. WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. Breast Cancer Res 2009;11:R32.

264. Mayerhofer K, Hefler L, Schindl M, Concin N, Frischmuth K, Leodolter S, *ve ark*. p53 antibody response in patients with vulvar cancer. Anticancer Research 1999;19:2323-6.

265. McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM. Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995. Cancer Causes & Control 2001;12:1-11.

266. McPherson CM, Suki D, McCutcheon IE, Gokaslan ZL, Rhines LD, Mendel E. Metastatic disease from spinal chordoma: a 10-year experience. Journal of Neurosurgery-Spine 2006;5:277-80.

267. Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM, *ve ark*. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. Cancer Res 2008;68:2773-80.

268. Meister G. miRNAs get an early start on translational silencing. Cell 2007;131:25-8.

269. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. Rna-A Publication of the Rna Society 2004;10:544-50.

270. Melillo RM, Santoro M. Tyrosine kinase receptors signaling revealed by global expression profiles: Implications for cancer biology. Current Genomics 2005;6:613-8.

271. Mellinghoff IK, Tran C, Sawyers CL. Growth inhibitory effects of the dual ErbB1/ErbB2 tyrosine kinase inhibitor PKI-166 on human prostate cancer xenografts. Cancer Research 2002;62:5254-9.

272. Meltzer PS. Cancer genomics - Small RNAs with big impacts. Nature 2005;435:745-6.

273. Mendenhall WM, Mendenhall CM, Lewis SB, Villaret DB, Mendenhall NP. Skull base chordoma. Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck 2005;27:159-65.

274. Mercatelli N, Coppola V, Bonci D, Miele F, Costantini A, Guadagnoli M, *ve ark*. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. PLoS One 2008;3:e4029.

275. Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. Eur J Haematol 2008;81:304-10.

276. Merrick WC. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. Gene 2004;332:1-11.

277. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Zhang QG, Sweetser DA, Woods WG, *ve ark*. Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. Blood 2003;102:1474-9.

278. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, *ve ark*. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. J Biol Chem 2008;283:29897-903.

279. Miozzo M, Dalpra L, Riva P, Volonte M, Macciardi F, Pericotti S, *ve ark*. A tumor suppressor locus in familial and sporadic chordoma maps to 1p36. International Journal of Cancer 2000;87:68-72.

280. Mirra JM DRCNSMF. Chordoma In *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*, Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F . In. Lyon: IARCPress, 2002:316-7.

281. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, *ve ark*. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. Genome Biology 2004;5.

282. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, *ve ark*. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. Cancer Sci 2008;99:280-6.

283. Miyamoto H, Saura R, Doita M, Kurosaka M, Mizuno K. The role of cyclooxygenase-2 in lumbar disc herniation. Spine 2002;27:2477-83.

284. Mizoe JE, Hasegawa A, Takagi R, Bessho H, Onda T, Tsujii H. Carbon Ion Radiotherapy for Skull Base Chordoma. Skull Base-An Interdisciplinary Approach 2009;19:219-24.

285. Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. Cell Proliferation 2000;33:261-74.

286. Morris KV. RNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. Rna Interference 2008;320:211-24.

287. Mundhenke C, Maass N, Jonat W, Friedl A. FGF-2 interaction in breast cancer and benign mammary gland tissue. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2002;62:962-6.

288. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, *ve ark*. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene 2006;25:2537-45.

289. Nairz K, Rottig C, Rintelen F, Zdobnov E, Moser M, Hafen E. Overgrowth caused by misexpression of a microRNA with dispensable wild-type function. Developmental Biology 2006;291:314-24.

290. Naka T, Boltze C, Samii A, Herold C, Ostertag H, Iwamoto Y, *ve ark*. Skull base and nonskull base chordomas - Clinicopathologic and immunohistochemical study with special reference to nuclear pleomorphism and proliferative ability. Cancer 2003;98:1934-41.

291. Naka T, Iwamoto Y, Shinohara N, Ushijima M, Chuman H, Tsuneyoshi M. Expression of c-met proto-oncogene product (c-MET) in benign and malignant bone tumors. Mod Pathol 1997;10:832-8.

292. Naka T, Kuester D, Boltze C, Scheil-Bertram S, Samii A, Herold C, *ve ark*. Expression of hepatocyte growth factor and c-MET in skull base chordoma. Cancer 2008a;112:104-10.

293. Naka T, Kuester D, Boltze C, Schulz TO, Samii A, Herold C, *ve ark*. Expression of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2;

cathepsin B; urokinase plasminogen activator; and plasminogen activator inhibitor, type I in skull base chordoma. Hum Pathol 2008b;39:217-23.

294. Naka T, Oda Y, Iwamoto Y, Shinohara N, Chuman H, Fukui M, *ve ark*. Immunohistochemical analysis of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin, and neural cell adhesion molecule (NCAM) in chordoma. Journal of Clinical Pathology 2001;54:945-50.

295. Nakamura Y, Becker LE, Marks A. S100-Protein in Human Chordoma and Human and Rabbit Notochord. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 1983;107:118-20.

296. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of A Chimeric Chalcone Synthase Gene Into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. Plant Cell 1990;2:279-89.

297. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng PY, Salup R, *ve ark*. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. Journal of Immunology 2004;172:464-74.

298. Negri T, Casieri P, Miselli F, Orsenigo M, Piacenza C, Stacchiotti S, *ve ark*. Evidence for PDGFRA, PDGFRB and KIT deregulation in an NSCLC patient. Br J Cancer 2007;96:180-1.

299. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2010;11:220-8.

300. Nelson PT, Baldwin DA, Oberholtzer JC, Mourelatos Z. A microarray-based method for studying micro-RNA (miRNA) expression. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2004a;63:520.

301. Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. Nature Methods 2004b;1:155-61.

302. Nemoto K, Vogt A, Oguri T, Lazo JS. Activation of the Raf-1/MEK/Erk kinase pathway by a novel Cdc25 inhibitor in human prostate cancer cells. Prostate 2004;58:95-102.

303. Niwa J, Hashi K, Minase T. Immunohistochemical and electron microscopic studies on intracranial chordomas: difference between typical chordomas and chondroid chordomas. Noshuyo Byori 1994;11:15-21.

304. Noel G, Feuvret I, Ferrand R, Boisserie G, Mazeron EJ, Habrand JL. Radiotherapeutic factors in the management of cervical-basal chordomas and chondrosarcomas. Neurosurgery 2004;55:1252-62.

305. Noel G, Feuvret L, Calugaru V, Dhermain F, Mammar H, Haie-Meder C, *ve ark*. Chordomas of the base of the skull and upper cervical spine. One hundred patients irradiated by a 3D conformal technique combining photon and proton beams. Acta Oncologica 2005;44:700-8.

306. Nutton V. Cnidian Medicine, Pt 2, A Further Analysis of Level-A in the Pseudo-Hippocratic Treatises 'de Natura Muliebri' and 'de Muliebribus 1-2' - German - Grensemann,H. Classical Review 1988;38:454.

307. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005;435:839-43.

308. Oakley GJ, Fuhrer K, Seethala RR. Brachyury, SOX-9, and podoplanin, new markers in the skull base chordoma vs chondrosarcoma differential: a tissue microarray-based comparative analysis. Modern Pathology 2008;21:1461-9.

309. Ocal IT, Camp RL, Rimm DL. Comparing expression of RTK (receptor tyrosine kinase) family receptors in breast cancer using tissue microarray technology. Modern Pathology 2001;14:33A.

310. Oconnell JX, Renard LG, Liebsch NJ, Efird JT, Munzenrider JE, Rosenberg AE. Base of Skull Chordoma - A Correlative Study of Histologic and Clinical-Features of 62 Cases. Cancer 1994;74:2261-7.

311. Oguz E, Tsai TT, Di Martino A, Guttapalli A, Albert TJ, Shapiro IM, *ve ark*. Galectin-3 expression in the intervertebral disc: A useful marker of the notochord phenotype? Spine 2007;32:9-16.

312. Orian A, van Steensel B, Delrow J, Bussemaker HJ, Li L, Sawado T, *ve ark*. Genomic bindin by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. Genes & Development 2003;17:1101-14.

313. Orzan F, Terreni MR, Longoni M, Boari N, Mortini P, Doglioni C, *ve ark*. Expression study of the target receptor tyrosine kinase of Imatinib mesylate in skull base chordomas. Oncology Reports 2007;18:249-52.

314. Osaka S, Kodoh O, Sugita H, Osaka E, Yoshida Y, Ryu J. Clinical significance of a wide excision policy for sacrococcygeal chordoma. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2006;132:213-8.

315. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. Oncogene 2008;27:1788-93.

316. Ozen M, Pathak S. Genetic alterations in human prostate cancer: a review of current literature. Anticancer Res 2000;20:1905-12.

317. Ozturk A, Orhan B, Turken O, Etiz D, Yaylaci M, Uskent N. Acute myeloblastic leukemia achieving complete remission with Amifostine alone. Leukemia & Lymphoma 2002;43:451-3.

318. Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Endogenous Wnt/beta-Catenin Signaling Is Required for Cardiac Differentiation in Human Embryonic Stem Cells. Plos One 2010;5.

319. Pan H, Han L, Chen W, Yao M, Lu W. Targeting to tumor necrotic regions with biotinylated antibody and streptavidin modified liposomes. J Control Release 2008;125:228-35.

320. Pandey P, Brors B, Srivastava PK, Bott A, Boehn SN, Groene HJ, *ve ark*. Microarray-based approach identifies microRNAs and their target functional patterns in polycystic kidney disease. BMC Genomics 2008;9:624.

321. Papagelopoulos PJ, Mavrogenis AF, Galanis EC, Savvidou OD, Boscainos PJ, Katonis PG, *ve ark*. Chordoma of the spine: Clinicopathological features, diagnosis, and treatment. Orthopedics 2004;27:1256-63.

322. Park JC, Chae YK, Son CH, Kim MS, Lee J, Ostrow K, *ve ark*. Epigenetic silencing of human T (brachyury homologue) gene in non-small-cell lung cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008;365:221-6.

323. Park JK, Song JH, He TC, Nam SW, Lee JY, Park WS. Overexpression of Wnt-2 in colorectal cancers. Neoplasma 2009;56:119-23.

324. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, *ve ark*. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 2000;408:86-9.

325. Perasole A, Infantolino D, Spigariol F. Aspiration Cytology and Immunocytochemistry of Sacral Chordoma with Liver Metastases - A Case-Report. Diagnostic Cytopathology 1991;7:277-81.

326. Persons DL, Bridge JA, Neff JR. Cytogenetic Analysis of 2 Sacral Chordomas. Cancer Genetics and Cytogenetics 1991;56:197-201.

327. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, *ve ark*. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:12885-90.

328. Pierce M, ALT H. Treatment of acute leucemia with aminopterin (4-amino-pteroylglutamic acid). J Lab Clin Med 1948;33:1642.

329. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. Toxicology 2002;181:475-81.

330. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? RNA 2005;11:1753-61.

331. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, *ve ark*. Inhibition of translational initiation by Let-7 microRNA in human cells. Science 2005;309:1573-6.

332. Polsky D, Cordon-Cardo C. Oncogenes in melanoma. Oncogene 2003;22:3087-91.

333. Poszepczynska E, Martinvalet D, Bouloc A, Echchakir H, Wechsler J, Becherel PA, *ve ark*. Erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma with disseminated pustulosis. Production of high levels of interleukin-8 by tumour cells. British Journal of Dermatology 2001;144:1073-9.

334. Presneau N, Shalaby A, Idowu B, Gikas P, Cannon SR, Gout I, *ve ark*. Potential therapeutic targets for chordoma: PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. British Journal of Cancer 2009;100:1406-14.

335. Qian YJ, Chen XB. Tumor suppression by p53: making cells senescent. Histology and Histopathology 2010;25:515-26.

336. Rajarajan A, Bloor BK, Desai H, Stokes A, Odell EW. Variant CD44 expression by human fibroblasts. Biomarkers 2008;13:307-18.

337. Rami MS. [Apoptosis and pathological process]. Lik Sprava 2007:68-70.

338. Rather LJ. Rudolph Virchow and scientific medicine. AMA Arch Intern Med 1957;100:1007-14.

339. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, *ve ark*. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature 2000;403:901-6.

340. Rhomberg W, Eiter H, Bohler F, Dertinger S. Combined radiotherapy and razoxane in the treatment of chondrosarcomas and chordomas. Anticancer Research 2006;26:2407-11.

341. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. Nature 2005;433:477-80.

342. Ridenour RV, Ahrens WA, Folpe AL, Miller DV. Clinical and Histopathologic Features of Chordomas in Children and Young Adults. Pediatric and Developmental Pathology 2010;13:9-17.

343. Robins H, Press WH. Human microRNAs target a functionally distinct population of genes with AT-rich 3 ' UTRs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:15557-62.

344. Romeo S, Hogendoorn P. Brachyury and chordoma: the chondroid-chordoid dilemma resolved? Journal of Pathology 2006;209:143-6.

345. Rossi CJ. Conformal proton beam therapy of prostate cancer - Update on the Loma Linda University Medical Center experience. Strahlentherapie und Onkologie 1999;175:82-4.

346. Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR. The Development of Fibrocartilage in the Rat Intervertebral Disc. Anatomy and Embryology 1995;192:53-62.

347. Saad AG, Collins MH. Prognostic value of MIB-1, E-cadherin, and CD44 in pediatric chordomas. Pediatr Dev Pathol 2005;8:362-8.

348. Salh B, Bergman D, Marotta A, Pelech SL. Differential cyclin-dependent kinase expression and activation in human colon cancer. Anticancer Research 1999a;19:741-8.

349. Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalla M, Flint J, Owen D, *ve ark*. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. Anticancer Research 1999b;19:731-40.

350. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. Blood 2003;101:1220-35.

351. Sangodkar J, Difeo A, Feld L, Bromberg R, Schwartz R, Huang F, *ve ark*. Targeted reduction of KLF6-SV1 restores chemotherapy sensitivity in resistant lung adenocarcinoma. Lung Cancer 2009;66:292-7.

352. Sangoi AR, Dulai MS, Beck AH, Brat DJ, Vogel H. Distinguishing Chordoid Meningiomas From Their Histologic Mimics An Immunohistochemical Evaluation. American Journal of Surgical Pathology 2009;33:669-81.

353. Sathananthan AH, Ratnasooriya WD, de Silva A, Randeniya P. Rediscovering Boveri's centrosome in Ascaris (1888): its impact on human fertility and development. Reproductive Biomedicine Online 2006;12:254-70.

354. Saugstad JA. MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. J Cereb Blood Flow Metab 2010.

355. Sawant RM, Cohen MB, Torchilin VP, Rokhlin OW. Prostate cancer-specific monoclonal antibody 5D4 significantly enhances the cytotoxicity of doxorubicin-loaded liposomes against target cells in vitro. J Drug Target 2008;16:601-4.

356. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, *ve ark*. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. Int J Cancer 2010;126:1166-76.

357. Schafer KA. The cell cycle: A review. Veterinary Pathology 1998;35:461-78.

358. Scheil S, Bruderlein S, Liehr T, Starke H, Herms J, Schulte M, *ve ark*. Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. Genes Chromosomes Cancer 2001;32:203-11.

359. Schimanski CC, Zimmermann T, Schmidtmann I, Gockel I, Lang HK, Galle PR, *ve ark*. K-ras mutation status correlates with the expression of VEGFR1, VEGFR2, and PDGFR alpha in colorectal cancer. International Journal of Colorectal Disease 2010;25:181-6.

360. Schmittgen TD. miR-31: a master regulator of metastasis? Future Oncol 2010;6:17-20.

361. Schmittgen TD, Jiang JM, Liu Q, Yang LQ. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. Nucleic Acids Research 2004;32.

362. Schonegger K, Gelpi E, Prayer D, Dieckmann K, Matula C, Hassler M, *ve ark*. Recurrent and metastatic clivus chordoma: systemic palliative therapy retards disease progression. Anti-Cancer Drugs 2005;16:1139-43.

363. Schubert FR, Fainsod A, Gruenbaum Y, Gruss P. Expression of the Novel Murine Homeobox Gene Sax-1 in the Developing Nervous-System. Mechanisms of Development 1995;51:99-114.

364. Schulz-Ertner D, Karger CP, Feuerhake A, Nikoghosyan A, Combs SE, Jakel O, *ve ark*. Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 2007;68:449-57.

365. Schwab J, Antonescu C, Boland P, Healey J, Rosenberg A, Nielsen P, *ve ark*. Combination of PI3K/mTOR inhibition demonstrates efficacy in human chordoma. Anticancer Res 2009;29:1867-71.

366. Schwaenen C, Viardot A, Berger H, Barth TF, Bentink S, Dohner H, *ve ark*. Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. Genes Chromosomes Cancer 2009;48:39-54.

367. Seabra L, Warenius H. Proteomic co-expression of cyclin-dependent kinases 1 and 4 in human cancer cells. European Journal of Cancer 2007;43:1483-92.

368. Seaman AJ, Koler RD, Stack T, Osgood EE. Aminopterin therapy in acute and sub-acute leukemias and in terminal acute exacerbations of chronic granulocytic leukemia. Am J Med 1950;8:522.

369. Seguin CA, Bojarski M, Pilliar RM, Roughley PJ, Kandel RA. Differential regulation of matrix degrading enzymes in a TNF alpha-induced model of nucleus pulposus tissue degeneration. Matrix Biology 2006;25:409-18.

370. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. Annual Review of Medicine-Selected Topics in the Clinical Sciences 2003;54:73-87.

371. Serrano M. The tumor suppressor protein p16(INK4a). Experimental Cell Research 1997;237:7-13.

372. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. Rna-A Publication of the Rna Society 2006;12:192-7.

373. Shahi P, Loukianiouk S, Bohne-Lang A, Kenzelmann M, Kuffer S, Maertens S, *ve ark*. Argonaute - a database for gene regulation by mammalian microRNAs. Nucleic Acids Research 2006;34:D115-D118.

374. Shalaby AA, Presneau N, Idowu BD, Thompson L, Briggs TR, Tirabosco R, *ve ark*. Analysis of the fibroblastic growth factor receptor-RAS/RAF/MEK/ERK-ETS2/brachyury signalling pathway in chordomas. Mod Pathol 2009;22:996-1005.

375. Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, *ve ark*. Rb Regulates DNA Damage Response and Cellular Senescence through E2F-Dependent Suppression of N-Ras Isoprenylation. Cancer Cell 2009;15:255-69.

376. Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. Science 2003;300:805-8.

377. Singhal N, Kotasek D, Parnis FX. Response to erlotinib in a patient with treatment refractory chordoma. Anticancer Drugs 2009;20:953-5.

378. Sirotnak FM, Donsback RC. Further evidence for a basis of selective activity and relative responsiveness during antifolate therapy of murine tumors. Cancer Res 1975;35:1737-44.

379. Smith BD, Wilson LD. Cutaneous lymphoma. Current Problems in Cancer 2008;32:43-87.

380. Spandidos DA, Zoumpourlis V, Gorgoulis V, Gourtsoyiannis NC. P53 Expression in Human Small-Intestinal Tumors. Oncology Reports 1994;1:885-7.

381. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. Cell 2005;123:1133-46.

382. Stepanek J, Cataldo SA, Ebersold MJ, Lindor NM, Jenkins RB, Unni K, *ve ark*. Familial chordoma with probable autosomal dominant inheritance. American Journal of Medical Genetics 1998;75:335-6.

383. Sticney JM, Hagedorn AB, . Changes in blood and bone marrow in acute leucemia induced by aminopterin. J Lab Clin Med 1948;33:1481.

384. Stott D, Kispert A, Herrmann BG. Rescue of the Tail Defect of Brachyury Mice. Genes & Development 1993;7:197-203.

385. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. Circ Res 2007;100:1164-73.

386. Suarez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. Circ Res 2009;104:442-54.

387. Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, *ve ark*. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Developmental Biology 2004;270:488-98.

388. Sun M, Hurst LD, Carmichael GG, Chen JJ. Evidence for a preferential targeting of 3 '-UTRs by cis-encoded natural antisense transcripts. Nucleic Acids Research 2005;33:5533-43.

389. Sun T, Wang Q, Balk S, Brown M, Lee GS, Kantoff P. The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. Cancer Res 2009;69:3356-63.

390. Sundaresan N, Rosen G, Boriani S. Primary Malignant Tumors of the Spine. Orthopedic Clinics of North America 2009;40:21-+.

391. Sung MS, Lee GK, Kang HS, Kwon ST, Park JG, Suh JS, *ve ark*. Sacrococcygeal chordoma: MR imaging in 30 patients. Skeletal Radiology 2005;34:87-94.

392. Sylvestre Y, De G, V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, *ve ark*. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. J Biol Chem 2007;282:2135-43.

393. Tachibana I, Smith JS, Sato K, Hosek SM, Kimmel DW, Jenkins RB. Investigation of germline PTEN, p53, p16(INK4A)/p14(ARF), and CDK4 alterations in familial glioma. American Journal of Medical Genetics 2000;92:136-41.

394. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, *ve ark*. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Research 2004;64:3753-6.

395. Takei H, Powell SZ. Novel Immunohistochemical Markers in the Diagnosis of Nonglial Tumors of Nervous System. Advances in Anatomic Pathology 2010;17:150-3.

396. Tamborini E, Miselli F, Negri T, Lagonigro MS, Staurengo S, Dagrada GP, *ve ark*. Molecular and biochemical analyses of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) B, PDGFRA, and KIT receptors in chordomas. Clinical Cancer Research 2006;12:6920-8.

397. Tang GL. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. Trends in Biochemical Sciences 2005;30:106-14.

398. Tang L, Li G, Tron VA, Trotter MJ, Ho VC. Expression of cell cycle regulators in human cutaneous malignant melanoma. Melanoma Research 1999;9:148-54.

399. Tanno B, Cesi V, Vitali R, Sesti F, Giuffrida ML, Mancini C, *ve ark*. Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells. Cell Death and Differentiation 2005;12:213-23.

400. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, *ve ark*. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. Nature 2008;451:147-52.

401. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:15472-7.

402. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, *ve ark*. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. Endocr Pathol 2007;18:163-73.

403. Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. Nature Methods 2004;1:47-53.

404. Tirabosco R, Mangham DC, Rosenberg AE, Vujovic S, Bousdras K, Pizzolitto S, *ve ark*. Brachyury expression in extra-axial skeletal and soft tissue chordomas: A marker that distinguishes chordoma from mixed tumor/myoepithelioma/parachordoma in soft tissue. American Journal of Surgical Pathology 2008;32:572-80.

405. Todd JA, Levine AM, Tokes ZA. Liposome-encapsulated methotrexate interactions with human chronic lymphocytic leukemia cells. J Natl Cancer Inst 1980;64:715-9.

406. Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: Drosha can't cut it without a partner. Current Biology 2005;15:R61-R64.

407. Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Sole M, *ve ark*. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. J Hepatol 2010;52:550-9.

408. Tsai NP, Lin YL, Wei LN. MicroRNA mir-346 targets the 5 '-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. Biochemical Journal 2009;424:411-8.

409. Tsao H, Benoit E, Sober AJ, Thiele C, Haluska FG. Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. Cancer Research 1998;58:109-13.

410. Tsunenari I, Yamate J, Sharma KD, Kawachi M, Sakuma S. Expressions of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in tumors induced by two different cloned cell lines established from transplantable rat malignant fibrous histiocytoma. Journal of Veterinary Medical Science 2000;62:699-705.

411. Turbov JM, Twaddle GM, Yang XH, Liu NXM, Murthy S. Effects of receptor tyrosine kinase inhibitor A47 on estrogen and growth factor-dependent breast cancer cell proliferation and apoptosis in vitro. Journal of Surgical Oncology 2002;79:17-29.

412. Umemura S, Shirane M, Takekoshi S, Kusakabe T, Itoh J, Egashira N, *ve ark*. Overexpression of E2F-5 correlates with a pathological basal phenotype and a worse clinical outcome. Br J Cancer 2009;100:764-71.

413. Uziel O, Beery E, Dronichev V, Samocha K, Gryaznov S, Weiss L, *ve ark*. Telomere shortening sensitizes cancer cells to selected cytotoxic agents: in vitro and in vivo studies and putative mechanisms. PLoS One 2010;5:e9132.

414. Valeri N, Croce CM, Fabbri M. Pathogenetic and clinical relevance of microRNAs in colorectal cancer. Cancer Genomics Proteomics 2009;6:195-204.

415. van den Berg A, Mols J, Han JH. RISC-target interaction: Cleavage and translational suppression. Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms 2008;1779:668-77.

416. van RE, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, *ve ark*. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:18255-60.

417. Veerla S, Lindgren D, Kvist A, Frigyesi A, Staaf J, Persson H, *ve ark*. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. Int J Cancer 2009;124:2236-42.

418. Vesely J, Nedvidek J, Seifert J. Microspectrophotometry of the deoxyribonucleic acid in the thymus cells of leukaemic and normal AK mice following the application of aminopterin, azauridine, and phosphoramide in vivo. Neoplasma 1961;8:371-8.

419. Vesely K, Jurajda M, Nenutil R, Vesela M. Expression of p53, cyclin D1 and EGFR correlates with histological grade of adult soft tissue sarcomas: a study on tissue microarrays. Neoplasma 2009;56:239-44.

420. Vilborg A, Wilhelm MT, Wiman KG. Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level. Journal of Molecular Medicine-Jmm 2010;88:645-52.

421. Visone R, Russo L, Pallante P, De M, I, Ferraro A, Leone V, *ve ark*. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. Endocr Relat Cancer 2007;14:791-8.

422. Vistica DT, Fuller R, Dillon N, Petro BJ. Cyto-Toxicity of A Bicyclic Amino-Acid Nitrogen-Mustard Toward Murine-L1210 Leukemia-Cells and Murine Bone-Marrow Progenitor Cells. Journal of Cell Biology 1981;91:A413.

423. Vogelstein B, Kinzler KW. The Genetic Basis of Human Cancer , B. and Kinzler, K. W. New york: The McGraw-Hill, 1998.

424. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, *ve ark*. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006;103:2257-61.

425. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, *ve ark*. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. Cell 2006;124:1169-81.

426. Vujovic S, Henderson S, Presneau N, Odell E, Jacques TS, Tirabosco R, *ve ark*. Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. Journal of Pathology 2006;209:157-65.

427. Walker G, Hayward N. No evidence of a role for activating CDK2 mutations in melanoma. Melanoma Research 2001;11:343-8.

428. Walker WP, Landas SK, Bromley CM, Sturm MTM. Immunohistochemical Distinction of Classic and Chondroid Chordomas. Modern Pathology 1991;4:661-6.

429. Wang M, Tan LP, Dijkstra MK, van LK, Robertus JL, Harms G, *ve ark*. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. J Pathol 2008a;215:13-20.

430. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, *ve ark*. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. Dev Cell 2008b;15:261-71.

431. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, *ve ark*. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. Plos One 2008c;3:e2557.

432. Watanabe S, Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. Bull Tokyo Dent Coll 2009;50:125-33.

433. Waterhouse DN, Gelmon KA, Masin D, Bally MB. Combining doxorubicin and liposomal anti-HER-2/NEU antisense oligodeoxynucleotides to treat HER-2/NEU-expressing MDA-MB-435 breast tumor model. J Exp Ther Oncol 2003;3:261-71.

434. Weber DC, Mirimanoff RO, Miralbell R. Proton beam therapy: clinical indications and summary of the Swiss experience. Bulletin du Cancer 2007;94:807-15.

435. Weinberger PM, Yu ZW, Kowalski D, Joe J, Manger P, Psyrri A, *ve ark*. Differential expression of epidermal growth factor receptor, c-Met, and HER2/neu in chordoma compared with 17 other malignancies. Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery 2005;131:707-11.

436. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. Oncogene 2007;26:5017-22.

437. Welch WC, Morrison RS, Gross JL, Gollin SM, Kitson RB, Goldfarb RH, *ve ark*. Morphologic, Immunological, Biochemical, and Cytogenetic Characteristics of the Human Glioblastoma-Derived Cell-Line, Snb-19. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 1995;31:610-6.

438. Wenig BL, Sciubba JJ, Goldstein MN, Abramson AL. Chondroid Chordoma of the Skull Base - A Better Prognosis Based on Histologic Criteria. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 1985;93:559-63.

439. Wick ST, Dubay MM, Imanil I, Brizuela L. Biochemical and Mutagenic Analysis of the Melanoma Tumor-Suppressor Gene-Product P16. Oncogene 1995;11:2013-9.

440. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology 2009;11:228-34.

441. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Letters 2009;277:8-21.

442. Wojno KJ, Hruban RH, Garinchesa P, Huvos AG. Chondroid Chordomas and Low-Grade Chondrosarcomas of the Craniospinal Axis - An Immunohistochemical Analysis of 17 Cases. American Journal of Surgical Pathology 1992;16:1144-52.

443. Woo SY, Dilliplane P, Rahman A, Sinks LF. Liposomal methotrexate in the treatment of murine L1210 leukemia. Cancer Drug Deliv 1983;1:59-62.

444. Wu C, Lin J, Hong M, Choudhury Y, Balani P, Leung D, *ve ark*. Combinatorial control of suicide gene expression by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer therapy. Mol Ther 2009;17:2058-66.

445. Xiang J, Wu J. Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis. Current Genomics 2010;11:129-35.

446. Xie W, Chow LT, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Conditional expression of the ErbB2 oncogene elicits reversible hyperplasia in stratified epithelia and up-regulation of TGF alpha expression in transgenic mice. Oncogene 1999;18:3593-607.

447. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, *ve ark*. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006;9:189-98.

448. Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, *ve ark*. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. Cancer Res 2008;68:425-33.

449. Yang X, Kelley MJ, Korczak JF, Sheridan E, Goldstein AM, Parry DM. A familial chordoma locus maps to chromosome 7q33. American Journal of Human Genetics 2001;69:512.

450. Yang XHR, Ng D, Alcorta DA, Liebsch NJ, Sheridan E, Li SF, *ve ark*. T (brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma. Nature Genetics 2009;41:1176-8.

451. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes & Development 2003;17:3011-6.

452. Youngren JF, Gable K, Penaranda C, Maddux BA, Zavodovskaya M, Lobo M, *ve ark*. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu receptors and suppresses growth in breast cancer cells. Breast Cancer Research and Treatment 2005;94:37-46.

453. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, *ve ark*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell 2007;131:1109-23.

454. Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, *ve ark*. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. Biochem Biophys Res Commun 2006;349:59-68.

455. Yu LD, Moore AB, Dixon D. Receptor Tyrosine Kinases and Their Hormonal Regulation in Uterine Leiomyoma. Seminars in Reproductive Medicine 2010;28:249-58.

456. Yu Z, Wang C, Wang M, Li Z, Casimiro MC, Liu M, *ve ark*. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. J Cell Biol 2008;182:509-17.

457. Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. Oncogene 2002;21:6915-35.

458. Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, Barbuzano FG, Proto-Siqueira R, Silva-Jr WA, *ve ark*. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. Braz J Med Biol Res 2007;40:1435-40.

459. Zeng Y, Cai XZ, Cullen BR. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. Rna Interference 2005;392:371-80.

460. Zeng Y, Sankala H, Zhang XX, Graves PR. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. Biochemical Journal 2008;413:429-36.

461. Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. Febs Letters 2006a;580:3753-62.

462. Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. MicroRNA: A new player in stem cells. Journal of Cellular Physiology 2006b;209:266-9.

463. Zhang BH, Pan XP, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant Journal 2006c;46:243-59.

464. Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. Developmental Biology 2006d;289:3-16.

465. Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cellular and Molecular Life Sciences 2006e;63:246-54.

466. Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. Cell Research 2005;15:336-60.

467. Zhang HB, Bajraszewski N, Wu EX, Wang HW, Moseman AP, Dabora SL, *ve ark*. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. Journal of Clinical Investigation 2007;117:730-8.

468. Zhang JX, Han L, Ge YL, Zhou X, Zhang AL, Zhang CZ, *ve ark*. miR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway. International Journal of Oncology 2010a;36:913-20.

469. Zhang XL, Zhu WY, Zhang JF, Huo SJ, Zhou LM, Gu Z, *ve ark*. MicroRNA-650 targets ING4 to promote gastric cancer tumorigenicity. Biochemical and Biophysical Research Communications 2010b;395:275-80.

470. Zhao JJ, Yang J, Lin J, Yao N, Zhu Y, Zheng J, *ve ark*. Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. Childs Nerv Syst 2009;25:13-20.

471. Zhou YM, Chen LJ, Barlogie B, Stephens O, Wu XS, Williams DR, *ve ark*. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010;107:7904-9.

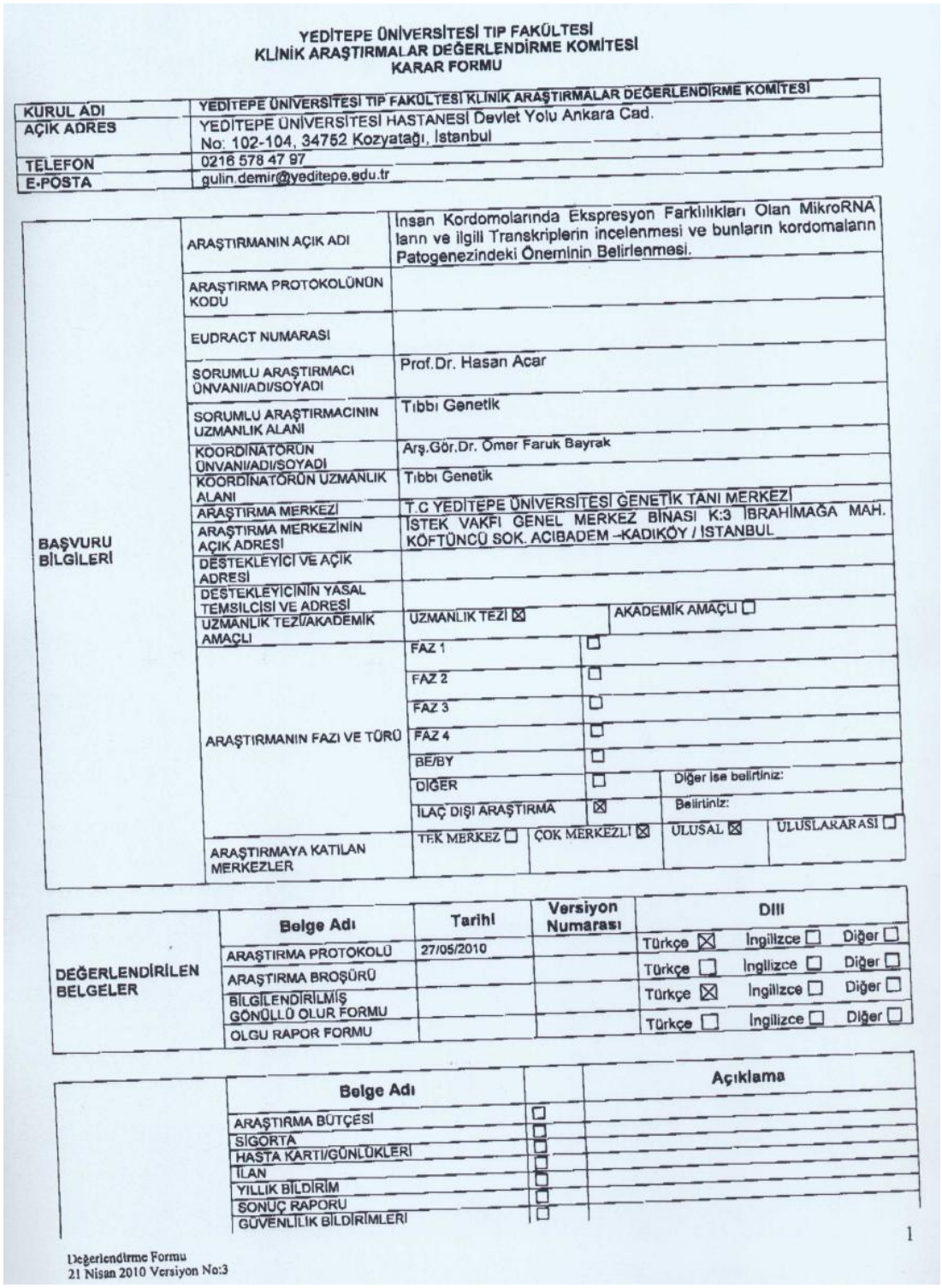
472. Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification. J Biochem Mol Biol 2007;40:135-41.

473. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. J Pathol 2009;219:3-15.

474. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. Trends in Molecular Medicine 2002;8:17-23.

EKLER

7.1. EK-A Etik Kurul Onay Belgesi



YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİTESİ
KARAR FORMU

KURUL ADI	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİTESİ
AÇIK ADRES	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ Devlet Yolu Ankara Cad. No: 102-104, 34752 Kozyatağı, İstanbul
TELEFON	0216 578 47 97
E-POSTA	gulin.demir@yeditepe.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Kordomolarında Ekspresyon Farklılıkları Olan MikroRNA ların ve ilgili Transkriplerin incelenmesi ve bunların kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi.
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	
	EUDRACT NUMARASI	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Hasan Acar
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Dr. Ömer Faruk Bayrak
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	T.C YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ GENETİK TANI MERKEZİ
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İSTEK VAKFI GENEL MERKEZ BİNASI K:3 İBRAHİMAĞA MAH. KÖFTÜNCÜ SOK. ACIBADEM –KADIKÖY / İSTANBUL
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒ / AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐ / FAZ 2 ☐ / FAZ 3 ☐ / FAZ 4 ☐ / BE/BY ☐ / DİĞER ☐ (Diğer ise belirtiniz:) / İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA ☒ (Belirtiniz:)
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ / ÇOK MERKEZLİ ☒ / ULUSAL ☒ / ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	27/05/2010		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	

1

Değerlendirme Formu
21 Nisan 2010 Versiyon No:3

DİĞER	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 019	Tarih:01/06/2010
	Hasan Acar sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik bir sakınca bulunmadığına toplantıya katılan değerlendirme kurulu üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KOMİTESİ BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Değerlendirme komitesi Kuruluş ve Çalışma Esasları.

DEĞERLENDİRME KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. R. Serdar ALPAN

DEĞERLENDİRME KOMİTESİ ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. R. Serdar Alpan	Farmakoloji	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Kemal Sarıca	Üroloji	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. S. Sami Kartı	Hematoloji	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. M. Reha Cengizler	Pediatri	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Serdar Öztezcan	Biyokimya	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yard. Doç. Dr. Baki Ekçi	Genel Cerrahi	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç Dr. Ferda Özkan	Patoloji	YÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yard. Doç Dr. Elif Vatanoğlu	Deontoloji	YÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Nural Bekiroğlu	Biyoistatistik	MÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Esra Can Say	Diş Has. Ted.	YÜDF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Meriç Köksal	Eczacılık	YÜEF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ali Rıza Okur	Hukuk	YÜHF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Ali Ümit Keskin	Biyomedikal Müh.	YÜMF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Başar Atalay	Beyin Cerrahi	YÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
			E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	

* : Araştırma ile İlişki
** : Toplantıda Bulunma

7.2. EK-B Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu

	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	**Ad Soyadı :** **Protokol No :** **Tedavi No :** **Yatış Tarihi :** **Cinsiyeti :** **Doktor Adı :** **Doğum Tarihi :** **Servis/oda No :**

Sayın Prof. Dr. Hasan Acar, Prof Dr. Uğur Türe, Doç. Dr. Mustafa Ozen, Doç Dr. Başar Atalay ve Arş. Gör. Ömer Faruk Bayrak tarafından Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji ve Tıbbi Genetik Anabilim dalarında ve Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D'da **"İnsan Kordomalarında Ekspresyon Farklılıkları olan mikroRNAların ve İlgili Transkriptlerin incelenmesi ve Bunların Kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi"** başlıklı tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili bilgiler bana aktarıldı. Bu araştırma kapsamında beyin tümörlerinden ameliyat sonrası elde edilecek tümör materyalinden gerekli tıbbi testler (patoloji, biyokimya vs) için alınan miktardan geriye kalan kısım ileride genetik ve etiyolojik araştırmalarda kullanılmak ve DNA, RNA, miRNA yada protein vb. eldesi için uygun koşullarda saklanacak, gerekli görüldüğü taktirde bu dokulardan hücre kültürü yapılacak ve izole edilen DNA ve RNA mutasyon ve gen ekspresyon analizi için kullanılacaktır. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)* 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. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof Dr Uğur Türe; Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Ana bilim dalı devlet yolu Ankara cad. no:102 Kozyatağı-İstanbul (0216) 578 40 00 – 4838'ten veya 0 532 313 6625 arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime 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 "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Ameliyatım sonunda elde edilen her türlü materyalin yukarıda izah edilği ve tarafıma detayları ile açıklndığı şekilde kullanılmasını onaylıyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜNÜN
Adı, soyadı: Tarih
Adres:
Tel. İmza

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN
Adı, soyadı: Tarih
Adres:
Tel. İmza

AÇIKLAMAYI YAPAN ARAŞTIRMACININ
Adı, soyadı: Tarih
Adres:
Tel. İmza

RIZA ALMA İŞLEMİNDE BAŞTAN SONA TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN
Adı, soyadı: Tarih
Adres:
Tel. İmza

7.3. EK-C Aydınlatılmış Gönüllü Onay Formu

	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	**Ad Soyadı :** **Protokol No :** **Tedavi No :** **Yatış Tarihi :** **Cinsiyeti :** **Doktor Adı :** **Doğum Tarihi :** **Servis/oda No :**

Kordomaların oluşumunda rol oynadığı düşünülen mRNA ve microRNA'ların ekpresyon profillerinin ortaya konmasını ve bu moleküllerin potansiyel terapötik etkilerinin araştırılmasını öngören bir çalışma planlamaktayız. Araştırmanın ismi **"İnsan Kordomalarında Ekspresyon Farklılıkları olan mikroRNAların ve İlgili Transkriptlerin incelenmesi ve Bunların Kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi"** dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni sizin/çocuğunuzun/yakınınızın kordoma tümörü veya Disk hernisi şikayetinin bulunmasıdır. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji ve Tıbbı Genetik A.B.D ve Selçuk Üniversitesi Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalının ortak katılımı ile kordomanın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof Dr. Uğur Türe, veya Doç Dr. Başar Atalay veya onların görevlendireceği bir hekim tarafından ameliyat esnasında alınan dokunun bir kısmı araştırma laboratuarımızda sıvı azot içerinde saklanacak. Bu araştırma kapsamında ameliyat sonrası elde edilecek materyalden gerekli tıbbi testler (patoloji, biyokimya vs) için alınan miktardan geriye kalan kısım ileride genetik ve etiyolojik araştırmalarda kullanılmak ve DNA, RNA, miRNA yada protein vb. eldesi için uygun koşullarda saklanacak, gerekli görüldüğü taktirde bu dokulardan hücre kültürü yapılacak ve izole edilen DNA ve RNA mutasyon ve gen ekspresyon analizi için kullanılacaktır. Bu araştırma kapsamında elde edilen bilgiler kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için ameliyat esnasında alınan tümör dokusunun bir kısmını daha önce belirtilen nedenlerden ötürü saklayacağız.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Ancak hemen belirtmemiz gerekir ki; yaptığımız testler sizin veya ailenizin bir ferdinin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de etkileyebilir. Sizin anormal bir gen taşıdığınızı saptadığımızda bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin de saptanmasıdır. Bu durumlarda gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmenizi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili genetik hastalığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya çocuğunuza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

7.4. EK-D miRNA Hedef bilgileri

miRNA	Target Gene		Predictions : Interaction predicted : Interaction not predicted : Sort according to predictions made by this program										
Mature ID	Symbol	ResfSeq	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/ TargetScanS
hsa-miR-31	PEX5	NM_000319											
hsa-miR-31	CTNND2	NM_001332											
hsa-miR-31	EIF5	NM_001969											
hsa-miR-31	SH2D1A	NM_002351											
hsa-miR-31	PPP2R2A	NM_002717											
hsa-miR-31	PPP6C	NM_002821											
hsa-miR-31	RASA1	NM_002890											
hsa-miR-31	SLC6A6	NM_003243											
hsa-miR-31	TFRC	NM_003734											
hsa-miR-31	SNX4	NM_004194											
hsa-miR-31	SLC1A2	NM_004171											
hsa-miR-31	AKAP7	NM_004842											
hsa-miR-31	OXSR1	NM_005109											
hsa-miR-31	UBE2K	NM_005339											
hsa-miR-31	RGS4	NM_005613											
hsa-miR-31	TACC1	NM_006283											
hsa-miR-31	MAP4K5	NM_006575											
hsa-miR-31	FZD3	NM_017412											
hsa-miR-31	HIF1AN	NM_018302											
hsa-miR-31	RSBN1	NM_020164											
hsa-miR-31	TM9SF3	NM_020123											
hsa-miR-31	KANK1	NM_015158											
hsa-miR-31	SATB2	NM_015265											
hsa-miR-31	HIAT1	NM_033055											
hsa-miR-31	DCBLD2	NM_080927											
hsa-miR-31	MBOAT2	NM_138799											
hsa-miR-31	STX12	NM_177424											
hsa-miR-31	APBB2	NM_173075											
hsa-miR-31	KSR2	NM_173598											
hsa-miR-31	TMEM145												

Predictions

: Interaction predicted

: Interaction not predicted

miRNA	Target Gene		Target Interaction	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/ TargetScanS
Mature ID	Symbol	RefSeq												
hsa-miR-222	KIT	NM_000222	Click for Detail											
hsa-miR-222	CDKN1B	NM_004064	Click for Detail											
hsa-miR-222	CDKN1B	NM_004064	Click for Detail											
hsa-miR-222	CDKN1C	NM_022631	Click for Detail											
hsa-miR-222	ESR1	NM_022742	Click for Detail											

Predictions

: Interaction predicted

: Interaction not predicted

: Sort according to predictions made by this program

miRNA	Target Gene		DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/ TargetScanS
Mature ID	Symbol	RefSeq											
hsa-miR-222	CDKN1B	NM_004064											
hsa-miR-222	HRB	NM_004504											
hsa-miR-222	VAPB	NM_004738											
hsa-miR-222	ARF4	NM_001660											
hsa-miR-222	KIT	NM_000222											
hsa-miR-222	ATXN1	NM_000332											
hsa-miR-222	PPP3R1	NM_000945											
hsa-miR-222	TCF12	NM_003205											
hsa-miR-222	EIF3J	NM_003758											
hsa-miR-222	RALA	NM_005402											
hsa-miR-222	ARID1A	NM_006015											
hsa-miR-222	PAIP1	NM_006451											
hsa-miR-222	ZFPM2	NM_012082											
hsa-miR-222	YWHAG	NM_012479											
hsa-miR-222	PPARGC1A	NM_013261											
hsa-miR-222	MYLIP	NM_013262											
hsa-miR-222	EIF5A2	NM_020390											
hsa-miR-222	VGLL4	NM_014667											
hsa-miR-222	TOX	NM_014729											
hsa-miR-222	ZEB2	NM_014795											
hsa-miR-222	TMCC1	NM_015008											
hsa-miR-222	CDC2L6	NM_015076											
hsa-miR-222	POGZ	NM_015100											
hsa-miR-222	DMRT3	NM_021240											
hsa-miR-222	MESDC1	NM_022566											
hsa-miR-222	KIF16B	NM_024704											
hsa-miR-222	MIER3	NM_152622											
hsa-miR-222	RBM24	NM_153020											
hsa-miR-222	GARNL1	NM_194301											
hsa-miR-222	INSIG1	NM_198337											

miRNA	Target Gene		Predictions : Interaction predicted : Interaction not predicted : Sort according to predictions made by this program										
Mature ID	Symbol	ResfSeq	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/ TargetScanS
hsa-miR-140-3p	AGL	NM_000028											
hsa-miR-140-3p	BCL2	NM_000633											
hsa-miR-140-3p	AGL	NM_000642											
hsa-miR-140-3p	AGL	NM_000643											
hsa-miR-140-3p	AGL	NM_000644											
hsa-miR-140-3p	AGL	NM_000645											
hsa-miR-140-3p	AGL	NM_000846											
hsa-miR-140-3p	GSTM3	NM_000849											
hsa-miR-140-3p	HTR1F	NM_000966											
hsa-miR-140-3p	NPY2R	NM_001049											
hsa-miR-140-3p	GRB10	NM_001001549											
hsa-miR-140-3p	GRB10	NM_001001550											
hsa-miR-140-3p	GRB10	NM_001001555											
hsa-miR-140-3p	AKAP2	NM_001004065											
hsa-miR-140-3p	DNM1	NM_001005336											
hsa-miR-140-3p	AK3L1	NM_001005353											
hsa-miR-140-3p	ADAM9	NM_001005845											
hsa-miR-140-3p	TULP4	NM_001007466											
hsa-miR-140-3p	BRD9	NM_001009877											
hsa-miR-140-3p	ASAH3L	NM_001010887											
hsa-miR-140-3p	OLA1	NM_001011708											
hsa-miR-140-3p	RFPL4B	NM_001013734											
hsa-miR-140-3p	KCNMA1	NM_001014797											
hsa-miR-140-3p	JARID1A	NM_001042603											
hsa-miR-140-3p	IQCJ	NM_001042706											
hsa-miR-140-3p	ZNF557	NM_001044388											
hsa-miR-140-3p	C5orf43	NM_001048249											
hsa-miR-140-3p	SLC7A6	NM_001076785											
hsa-miR-140-3p	HS6ST2	NM_001077188											
hsa-miR-140-3p	JRK	NM_001077527											

miRNA	Target Gene			Predictions : Interaction predicted : Interaction not predicted											
Mature ID	Symbol	RefSeq	Target Interaction	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/ TargetScanS
hsa-miR-148a	DNMT3B	NM_175850	Click for Detail											
hsa-miR-148a	DNMT3B	NM_175849	Click for Detail											
hsa-miR-148a	NR1I2	NM_033013	Click for Detail											

Tahmin edilen

miRNA	Target Gene		Predictions : Interaction predicted : Interaction not predicted : Sort according to predictions made by this program										
Mature ID	Symbol	ResfSeq	DIANA-microT	Micro Inspector	mi Randa	Mir Target2	mi Target	NB miRTar	Pic Tar	PITA	RNA 22	RNA hybrid	TargetScan/ TargetScanS
hsa-miR-148a	ESR1	NM_000125											
hsa-miR-148a	MITF	NM_000248											
hsa-miR-148a	GPATCH8	NM_001002909											
hsa-miR-148a	ITGA11	NM_001004439											
hsa-miR-148a	ACVR1	NM_001105											
hsa-miR-148a	S1PR1	NM_001400											
hsa-miR-148a	ESRRG	NM_001438											
hsa-miR-148a	GADD45A	NM_001924											
hsa-miR-148a	INHBB	NM_002193											
hsa-miR-148a	ITGA5	NM_002205											
hsa-miR-148a	PPP1R12A	NM_002480											
hsa-miR-148a	SSR1	NM_003144											
hsa-miR-148a	TGFA	NM_003236											
hsa-miR-148a	WNT10B	NM_003394											
hsa-miR-148a	CUL5	NM_003478											
hsa-miR-148a	NRP1	NM_003873											
hsa-miR-148a	CDK5R1	NM_003885											
hsa-miR-148a	SYNJ1	NM_003895											
hsa-miR-148a	BTAF1	NM_003972											
hsa-miR-148a	PLAA	NM_004253											
hsa-miR-148a	ABCB7	NM_004299											
hsa-miR-148a	SFRS11	NM_004768											
hsa-miR-148a	B4GALT5	NM_004776											
hsa-miR-148a	GPM6A	NM_005277											
hsa-miR-148a	PDIA3	NM_005313											
hsa-miR-148a	GTF2H1	NM_005316											
hsa-miR-148a	WNT1	NM_005430											
hsa-miR-148a	NOG	NM_005450											
hsa-miR-148a	MAFB	NM_005461											
hsa-miR-148a	ABCA1	NM_005502											

8. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta, lise ve üniversite öğrenimini Erzurum'da tamamladı. Yüksek lisansını Atatürk Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsünde Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim dalında 2006 yılında tamamladı.