



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**HEREDİTER MULTİPL EKZOSTOZİS TANISI ALAN OLGULARIN EXT1 VE
EXT2 GEN MUTASYONLARI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**



UZMANLIK TEZİ

Dr. Püren ÖZÜDOĞRU

Antalya, 2020



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**HEREDİTER MULTİPL EKZOSTOZİS TANISI ALAN OLGULARIN EXT1 VE
EXT2 GEN MUTASYONLARI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**



UZMANLIK TEZİ

Dr. Püren ÖZÜDOĞRU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ercan MIHÇI

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2020

*Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2018-3683)*

TEŞEKKÜR

Geride bıraktığım Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Araştırma Görevliliği eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalanabildiğim bölüm hocalarıma,
Tez çalışmalarım sırasında akademik desteğini esirgemeyen değerli tez hocam Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Genetik Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercan MIHÇI'ya,
Tezimin laboratuvar aşamasında ve yazımında büyük destek veren Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Aslı TOYLU'ya,
Tezimin radyolojik incelemelerinde bana değerli zamanımı incelikle ayıran Radyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Can ÇEVİKOL'a,
Tez olgularımın temini ve verilerin sağlanması sırasında destek olan İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Genetik Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ'E,
Hasta verilerinin değerlendirilmesi süresince desteklerini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Genetik Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Banu NUR'a,
Her türlü konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen tüm yandal uzmanı doktor arkadaşlarıma, birlikte çalışmaktan keyif aldığım kıymetli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde geçirdiğim zamanı değerli kılan hemşire ve paramedik arkadaşlarıma,
Eğitim sürecimde beni her daim gönülden destekleyen, bana bilimsel çalışmayı öğreten ve hiçbir bilgisini esirgemeyen sevgili hocalarım Prof. Dr. Sema AKMAN, Prof. Dr. Reha ARTAN ve Doç. Dr. Mesut PARLAK ve Doç. Dr. Bilge ALDEMİR KOCABAŞ'a,
İlk 6 yıllık tıp eğitimimi aldığım ve her daim bir üyesi olmaktan gurur duyduğum, her başım sıkıştığında yanımda hissettiğim çok sevgili Hacettepe aileme,
Bu günlere gelmemdeki katkı ve destekleri için anne ve babama, ve her an varlığını hissettiğim kızkardeşime,
Onlardan almak zorunda olduğum zamanlar için özür dileyerek, varlıklarına şükrettiğim biricik eşim Murat'a ve canım oğlum Ali'ye,
Ve her daim keyif aldığım mesleğimin en güzel tarafı olan tüm çocuklarıma,
Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Püren ÖZÜDOĞRU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-----|
| İç Kapak | |
| Teşekkür | |
| İçindekiler..... | i |
| Kısaltmalar Dizini | ii |
| Şekiller Dizini | iii |
| Tablolar Dizini..... | vi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 3. GENETİK..... | 6 |
| 4. ETYOPATOGENEZ..... | 9 |
| 5. TEDAVİ..... | 16 |
| 6. OLGULAR ve YÖNTEM | 17 |
| 7. BULGULAR..... | 20 |
| 8. TARTIŞMA..... | 24 |
| 9. ÖZET..... | 29 |
| 10. ABSTRACT..... | 31 |
| 11. KAYNAKLAR..... | 33 |
| 12.EKLER..... | 46 |
| Ek 1.Aydınlatılmış Onam Formu..... | 46 |
| Ek 2.Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı..... | 50 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| HME | Hereditör Multipl Ekzositoz |
| EXT1 | Exostosin-1 |
| EXT2 | Exostosin-2 |
| HSPG | Heparan Sülfat Proteoglikan |
| LOH | Heterozigozite kaybı |
| IHH | Hedgehog ligand |
| PTHrP | Paratiroid hormonu ile ilgili protein |
| HPSE | Heparanaz |
| ECM | Hücre dışı matris |
| GAG | Glikozaminoglikan |
| HS | Heparan sülfat |
| CS | Kondroitin sülfat |
| GPI | Glikozilfosfatidilinositol |
| XylT | Ksilosiltransferaz |
| GalT | Galaktosiltransferaz |
| RAR γ | Retinoik asit reseptörü γ |
| BMP | Kemik morfojenetik protein |
| GlcAc | D-glukuronik asit |
| GlcNAc | N-asetil-D-glukozamin |
| PVO | Palovaroten |
| FOP | Fibrodisplaziya Ossifikans Progresiva |
| ACVR1 | Aktivin A reseptör tip I |
| ALK2 | Aktivin benzeri kinaz 2 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 1: Uzun kemiklerin metafiziyeal bölgesinde kıkırdak kökenli ekzofitik kemik çıkıntıları | 1 |
| Şekil 2: Ön kolda Madelung deformitesine benzeyen deformite | 4 |
| Şekil 3 : Büyüme plakasının diyagramatik gösterimi ve ekzostoz gelişimi | 10 |
| Şekil 4: Varyant frekanslarının önceki çalışmalarla karşılaştırılması | 20 |

TABLolar DİZİNİ

| <u>Tablo</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| Tablo 1: Herediter multipl ekzostozis hastalarında sık görülen klinik semptom ve komplikasyonlar | 3 |
| Tablo 2: HS biyosentezinde yer alan enzimler | 13 |
| Tablo 3: EXT1 ve EXT2 genlerinde tanımlanan varyantlar | 22 |
| Tablo 4: Yeni saptanan nükleotid değişikliklerinin varyant tiplerine göre dağılımı | 23 |
| Tablo 5: Protein fonksiyonu üzerinde yeni saptanan varyantların öngörülen-olası etkileri | 27 |

1 . GİRİŞ VE AMAÇ

Hereditör multiple ekzostozi (HME) veya diğer adı ile multiple osteokondroma, uzun kemiklerin metafiziyeal bölgesinde, büyüme plaklarını çevreleyen perikondrium içinde, yani kemiklerin juksta-epifiziyeal bölgelerinde, malign olmayan kıkırdak kökenli ekzofitik kemik tümörleri gelişimi ile karakterize, nadir bir otozomal dominant çocukluk çağı hastalığıdır (1-7) (Şekil 1). Ancak denovo mutasyonların meydana geldiği de bilinmektedir (3).

Şekil 1: Uzun kemiklerin metafiziyeal bölgesinde kıkırdak kökenli ekzofitik kemik çıkıntılarını.



Çalışmamızda Multiple ekzostozi hastalarımızda EXT1 ve EXT2 gen mutasyonlarının saptanması, genotip ve fenotip ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile Ülkemizdeki HME hastalarında EXT1 ve EXT2 gen mutasyonları değerlendirilecek, yeni varyantlar belirlenecek, Türk toplumunda hastalığın, doğası, sıklığı ve dağılımını inceleyerek genotip ve fenotip ilişkisi belirlenecektir.

2 . GENEL BİLGİLER

Hereditör multipl ekzostoziş, işkelet ve bağ dokusu bozuklukları ile ilişkili glikozaminoglikan biyosentezinde bozulma sonucu gelişen bir hastalıktır (8). Bu hastalık kondrosit proliferasyonunda artışa neden olarak juksta-epifiziyal bölgede anormal kemik büyümesi ile sonuçlanır.

Hereditör multipl ekzostoziş insidansı 1-2 / 100,000 'dir (3, 9). Hastalarının yaklaşık % 20' sinde aile öyküsü yoktur (10).

Kıkırdak tümörleri, kemiği etkileyen en yaygın neoplazmalardır ve ekzostozişler, iyi huylu kıkırdak lezyonlarından en sık görüldür (11, 12).

Hereditör multipl ekzostoziş, çocuk ve adölesan hastalarda uzun kemikler, vertabralar, kostalar ve pelvisin büyüme plakalarına bitişik gelişen, kemikli bir gövdeye ve iyi huylu kıkırdak çıkıntılara sahip, osteokondrom veya ekzostoziş olarak adlandırılan kemik tümörleri ile karakterizedir (4, 13). Ekzostozişler, adını aldığı sendromun en belirgin özelliğidir ve kemikli bir tabanı kaplayan büyüme plakası benzeri kıkırdaklı bir kapaktan oluşur (4). Ekzostozişler sapsız (geniş tabanlı) ya da pedinkuledir (14). Birkaç kemikte veya aynı kemikte birden fazla bölgede görülebilir. En sık tutulan kemikler distal femur (% 90), proksimal tibia (% 84), fibula (% 76) ve humerusdur (% 72). Skapula, vertebra ve pelviste de oluşabilir, ancak çene ve kalvaryumda genellikle görülmez (2, 3, 9, 15).

Hereditör multipl ekzostoziş hastalığında semptomların ortaya çıkışı doğumdan sonra başlar ve semptomların başlaması sırasında ortalama yaş aralığı 2-15 yıl arasında değişkenlik gösterir (3). Bireylerin yaklaşık % 50' sinde 3,5 yaşından önce, % 80' den fazlasında ise, ilk on yılda teşhis edilir (3). İskelet olgunluğuna ulaşana kadar yavaş yavaş ebat ve sayıca artar (2, 3, 16). Ergenliğin sona ermesinden sonra, tüm büyüme plakaları kapandığında ve işkelet olgunluğa ulaştığında yeni ekzositoz oluşmaz.

Daha önceki çalışmalarda erkeklerde kadınlara nazaran HME prevalansının daha yüksek olduğu (E/K=1.5: 1) görülmüştür (15, 17). Ancak daha yakın tarihli çalışmalarda cinsiyet baskınlık kanıtı bulunamamıştır (2, 18).

Hereditör multipl ekzostoze ismini veren birden çok sayıda ekzostoz, çoğunlukla iyi huylu olan iskelet çıkıntılarınıdır. Bununla birlikte, büyüme plaklarıyla fiziksel olarak ilişkili olduklarından, konumları, büyüklükleri ve sayılarına göre birçok sağlık sorununa neden olma riskleri mevcuttur (2, 19-21) (Tablo1).

Büyüme geriliği, malformasyonlar, ulna ve radius gibi komşu iskelet elemanlarında şekil değişikliklerine sebep olarak iskelet uzaması ve kemik deformitelerine, eklem hareketinde kısıtlılığa ve boy kısalığına neden olabilir. Ayrıca kaslar, tendonlar, damarlar, cilt ve omurilik gibi çevre dokulara baskı yaparak ciddi fiziksel ve kozmetik kaygılara neden olabilir (1-3, 19, 22). Bacaklarda, ön kolda (madelung deformitesine benzeyen) ve ellerde deformite sık görülür (Şekil 2) (23). Etkilenen bireyler kısa boyludur ve mesomelik segment veya ekstremiteilerin distal kısmı daha ciddi şekilde etkilenir (2, 16). Mesomelik kısımda fibula ve ulna, tibia ve radiustan daha fazla etkilenir. Üst ekstremitenin longitudinal uzamasındaki asimetri, ulnanın progresif kısalmasına neden olur ve bilekte ulnar deviasyon ve radial subluksasyona neden olabilir (Şekil 2) (24).

Tablo 1: Hereditör multipl ekzostozis hastalarında sık görülen klinik semptom ve komplikasyonlar.

| |
|---|
| Ekstremitte, göğüs ve omurgada iskelet değişiklikleri (3, 4, 19, 22, 25) Coxa valga (3, 26, 27) Ekstremitte uzunluğu farklılıkları (19) |
| Spinal darlık(28) Skolyoz(29), (30) Kısa boy(2, 20) Sinir, tendon ve damar sıkışması(1, 3, 19) |
| Yara iyileşmesinde anormallikler(31) Sosyal ve yaşam kalitesi zorlukları(32-34) |

Şekil 2: Ön kolda Madelung deformitesine benzeyen deformite.



Kemik büyümesi benign olmasına rağmen, komşu dokularda, sinirlerde veya kan damarlarında basıya, çevre dokuları etkileyerek hareket bozukluğuna, kronik ağrıya ve hatta erken başlangıçlı osteoartritlere neden olabilir (9).

Hereditör multipl ekzostozezin bir başka ciddi komplikasyonu, omuriliği veya sinir köklerini sıkıştırabilen vertebra yüzeyinde ekzostoz oluşumudur. Ekzostozlara bağlı omurilik sıkışmasının, yürüme bozuklukları, uyuşukluk, artmış refleks yanıtları, spastisite ve inkontinans dahil olmak üzere motor veya duyuşsal eksiklik olarak ortaya çıktığı görülmüştür (35, 36). Vertebral ekzostozlar aynı zamanda özofagusa baskı yaparak yutmayı bozabilir (33). Ek olarak, hem vertebral hem de kostal yüzeylerdeki ekzostozlar akciğer fonksiyonunu etkileyebilir, spontan hemotoraks, pnömotoraks ve perikardiyal efüzyona neden olabilir, acil cerrahi müdahale gerektirebilir (37).

Hastaların yaklaşık % 0,2-5 'inde osteokondromlar malign transformasyon göstererek kemoterapiye veya radyoterapiye dirençli, hayatı tehdit edebilen kondrosarkomlara (18, 38) veya osteosarkomlara dönüşebilir (2, 9). Malignite

gelişimi için evrensel olarak kabul edilmiş protokoller yoktur; bununla birlikte, dördüncü dekatta malign değişiklik en sık meydana geldiğinden, yetişkinlerde klinik takip önemlidir (39).

Hereditör multipl ekzostoza EXT eksikliği, birden fazla dokuda ve plazmada, düşük heparan sülfat (HS) seviyelerine yol açan HS zincirlerinin kısalmasıyla sonuçlanır ve potansiyel olarak mutasyonların çoklu organ sistemleri üzerindeki etkisini açıklar (40-42).

Hücre içi ve hücre yüzeyini değiştiren enzimler dokuya spesifik olduğundan, HS yapıları farklı dokularda ve hücrelerde farklılık gösterebilir (43). Çalışmalar, HS zincirlerinin ve bunların parçası olan proteoglikanların çok sayıda gelişimsel ve fizyolojik işlev gösterdiğini göstermiştir (43, 44). Önemli ve esas becerileri hedef hücreler ve dokulardaki sinyal proteinleri, fibroblast büyüme faktörü (FGF), kemik morfogenetik protein (BMP) ve yüzey antijenleri ile etkileşime girebilme ve hedef üzerindeki protein dağılımı, difüzyon, turnover, biyoyararlanım ve eylemi düzenleme yetenekleridir (45-47). Sinyal proteinlerinin tümü, spesifik bir HS-bağlanma alanına sahiptir (45, 47).

Hereditör multipl ekzostoza hastaları HS'nin tüm dokularda azalması nedeni ile yara iyileşmesinde gecikme, diş problemleri, sosyal sorunlar, öğrenme güçlüğü, uyku bozuklukları ve nöropatiler gibi iskelet dışı sağlık problemlerinden muzdarip olabilir (31, 48-51). Hereditör multipl ekzostoza, postprandiyal lipid klirensinde değişiklikler ve pankreas hacminin azalması nedeniyle düşük pankreas beta-hücresi rezervi eşlik edebilir. Hereditör multipl ekzostoza hastalarında EXT1 veya EXT2 genlerindeki alel kaybı kendi içinde lipit metabolizma defektleri ve skar oluşumu gibi bazı patolojilere neden olabilir (31, 52), ancak osteokondrom oluşumuna neden olmak için yeterli değildir (52-55). Bu iskelet dışı bulgular HME'yi saf bir iskelet rahatsızlığından ziyade bir sendrom haline getirir (52, 56). Kayda değer sayıda hasta, yaşam boyunca ağrı ve fiziksel zorluklar ile mücadele etmektedir (32, 57).

3 . GENETİK

Hereditör multipl ekzostozis, genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Exostosin-1 (8q24.11-q24.13'te EXT1; MIM 608177) (58, 59) ve Exostosin-2 (11p12-p11'de EXT2; MIM 608210) (60, 61) genleri hastalıktan sorumludur ve bu genler homologdur (59, 61). 11 ve 16 ekzon içerir ve sırasıyla 746 ve 718 amino asit içeren proteinleri kodlar (61, 62).

Genetik temele ilişkin ilk ipucu Langer-Giedion sendromu olan bireylerden elde edilmiştir. Etkilenen bireyler, karakteristik yüz özelliklerine ve merkezi sinir sistemi anormalliklerine ek olarak çoklu ekzostozlara sahiptir. Bu sendromun kromozom 8 bölgesindeki geniş bir delesyondan kaynaklanmasından dolayı, osteokondromlar için bu gendeki delesyon yol gösterici olmuştur (63). Başlangıçta iki lokasyon tanımlanmış ve daha sonra bu bölgelerdeki genlerdeki mutasyonlar belirlenmiştir (58). İlk gen, kromozom 8 (lokus 8q24.1) üzerinde bulunmuş ve 1993 yılında Cook tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra, EXT2 geni, 11. kromozomda (locus 11p1113) tanımlanmıştır (59, 61, 64).

25 yıldan uzun süren çalışmalar, HME vakalarının çoğunluğunun EXT1 veya EXT2'deki heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları ile ilişkili olduğunu, mutasyonların çoğunun ailesel ve yaklaşık % 10 'unun sporadik olduğunu göstermiştir (41, 59, 64, 65). Bu bulgulara dayanarak, HME otozomal dominant bir hastalık olarak tanımlanır. Bununla birlikte, en göze çarpan osteokondrom oluşum hipotezi, tümör gelişiminde Knudson hipotezine paralel olarak; heterozigozite kaybı (LOH), aneuploidi ya da HS seviyelerini farklı hücrelerde ve dokularda daha da düşürecek diğer genetik değişikliklerin, etkilenen hücreleri tümörijenik hücrelere dönüştürebilmesi için "ikinci bir vuruş" gerektirdiği yönündedir (4, 66-69).

EXT genlerinin, HS sentezi (5, 70) ve HME gelişimi (59, 65) ile ilişkisini ortaya koyan çalışmaların ardından HME hastalarında EXT1 ve EXT2 'de çok sayıda nonsense, çerçeve kayması, missense ve split-site mutasyonlarını belirlenmiştir (10, 64, 71).

Hem EXT1 hem de EXT2 genleri, heparan sülfat ve proteoglikanların sentezinde yer alan endoplazmik retikulumun glikotransferaz enzimlerini (sırasıyla N-

Asetilglukosamin transferaz ve D-glukuronikasit transferaz) kodlar ve proteoglikan zincirinin uzamasını sağlar (72, 73). HS zinciri, D-glukuronik asit (GlcAc) ve N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) alt birimlerinden oluşan bir doğrusal glikosaminoglikandır. Yani HS zincirleri, EXT1 ve EXT2 glikoziltransferazları içeren bir enzim kompleksinin katalize ettiği bir işlem ile GlcAc ve GlcNAc kalıntıları ile uzatılmıştır. Zincirlerin uzunluğu değişebilir ve hücreye spesifik olabilir. Glikoziltransferaz genlerinde mutasyon, bu genlerin kodladığı enzimlerin yanlış sentezlenmesine, bu da düşük enzim aktivitesine ve daha az/kısa HS zincir sentezine yol açar (61, 64).

Genetik çalışmalar ve hücre analizleri, osteokondrom gelişiminde EXT1 veya EXT2 dışında heterozigosite kaybı, anöploidi veya başka değişiklikler olabileceğini göstermiştir (53, 74-76). Farklı çalışmalarda, bileşik heterozigot EXT1 ve EXT2 mutasyonları dahil olmak üzere alternatif genetik değişikliklere sahip hastalar belirlenmiştir (10, 71, 77). Tekli heterozigot Ext1 +/- veya Ext2 +/- mutant farelerin büyük ölçüde normal olduğu bulunmuş, tek bir heterozigot EXT mutasyonunun HME' i tetiklemek için yeterli olmadığı fikri doğrulanmıştır (42, 78). Bununla birlikte, bileşik heterozigot Ext1 +/-; Ext2 +/- mutant fareler ve Ext1-null fareler birden fazla osteokondrom oluşumu göstermiş ve insan HME fenotipini birkaç açıdan taklit etmiştir (42, 79-81). Bu nedenle, osteokondrom oluşumunda ikinci bir genetik olay ve HS'de majör bir düşüş (mutlak kayıp olması gerekmez) gerekir.

EXT1 'in, HS biyosentezini kurtarabilecek bir proteini kodladığı gösterilmiştir (5). EXT2 ise, sığır serumundan saflaştırılmış bir HS ko-polimeraz olarak tanımlanmıştır (70).

HME 'de fare modeliyle yapılan daha yeni çalışmalarda, EXT1 ablasyonunun uzun kemik büyüme plakaları boyunca perikondriyumda geniş ve ektopik BMP sinyali ile sonuçlandığı ve bunun sonucunda ektopik kondrojenez ve osteokondrom benzeri gelişimin oluştuğu gösterilmiştir (55).

EXT mutasyonlarının sayısı ve tipi çoktur ve değişik derecelerde HS eksikliğine / kısılmasına yol açar (10). Bu genlerdeki mutasyonların farklı konsantrasyon kalıpları vardır. EXT1 mutasyonları genin içinden dağınık durumda iken, EXT2'

deki mutasyonlar proteinin N terminal kısmında kümelenme eğilimindedir (10, 72).

Genotip-Fenotip Korelasyonu

EXT1 mutasyonları olan hastaların, EXT2 mutasyonlarına sahip hastalara göre daha kısa ekstremite segmentlerine ve daha kısa boylara ve daha fazla pelvik ve kemik tutulumuna yol açan daha fazla ekzostoz, daha fazla ekstremite uyumsuzluğuna sahip olduğu gösterilmiştir (82). Şimdiye kadar, EXT1 mutasyonları taşıyan hastalarda, daha fazla sayıda ekzostozun olduğu, daha şiddetli bir fenotipin, etkilenen anatomik bölgeler, deformiteler ve fiziksel kısıtlılık ve daha yüksek bir malign transformasyon riski bulunduğunu tanımlayan çok sayıda genotip-fenotip korelasyon çalışması yapılmıştır (14, 18, 82, 83). EXT2 'deki mutasyonlar daha çok orta derecede bir fenotip ile ilişkilidir (14, 84). Enzimatik fonksiyonu nedeniyle EXT1 'de saptanan mutasyonların daha ağır bir HME kas-iskelet sistemi fenotipi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (10, 14, 18, 21, 71). EXT1 mutasyonlarının EXT2 mutasyonlarına kıyasla daha ciddi sonuçları olması, EXT1 proteininin HS polimerizasyonunda önemli bir katalitik fonksiyona sahip olduğunu destekler, EXT2, Golgi ile ilişkili EXT1 / EXT2 kompleksleri içerisinde yapısal veya destekleyici rollere sahip olabilir (85).

Ailelerde ve aynı mutasyona sahip bireyler arasında hastalık sunumunda geniş bir çeşitlilik yelpazesi vardır, bu da fenotip spesifikasyonu ve ciddiyetinde, ek genetik, hormonal veya çevresel etkiler olduğunu gösterir.

Erkek hastalar tipik olarak, büyüme plağının daha geç kapanması ve dolayısı ile ekzostoz oluşumu için daha fazla zaman olması nedeni ile, daha şiddetli bir klinik tablo sergiler (82, 86).

Hereditör multipl ekzostozis hastaları arasındaki hastalık şiddetini değerlendirmek ve sınıflandırmak için hala yaygın olarak kabul edilmiş bir sistem olmadığı (18, 87) ve benzer şekilde, net ve güvenilir bir genotip-fenotip korelasyonu olmadığı belirtilebilir. (82, 86).

4 . ETYOPATOGENEZ

Büyüme plağı, kıkırdak epifiz ile yeni üretilen kemik metafizi arasında yer almaktadır ve longitudinal kemik büyümesinden sorumludur. Büyüme plağı içinde kondrositler çoğalır, prehipertrofik ve hipertrofik evreler sonrasında nihayetinde apoptozise uğrayana kadar farklılaşmaya devam eder. Kondrositler, ortak bir osteokondroprogenitor hücreye farklılaşan mezenkimal prekürsör hücrelerden (mezenkimal kök hücre) gelişir (88). Hücreler farklılaşmayı uyaran çeşitli genlerin ekspresyonu ile koordine edilmiş bir farklılaşma sürecine girerler (89-91).

Hedgehog sinyali, iskelet gelişiminin önemli bir düzenleyicisidir ve büyüme plağındaki kondrositlerin kaderinin belirlenmesinde önemlidir (92). 1995 yılında Nobel alan Volhard ve Weischaus 1970’te Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’nda embriyogenik gelişim üzerine doğrudan etkili 50’den fazla gen belirlemişlerdir (93, 94). 1993 yılında omurgalılarda 3 hedgehog (hh) geni keşfedilmiştir (“Sonic hh” (Shh), “Indian hh” (Ihh) ve “Desert hh” (Dhh)) (95-98). Günümüzde hedgehog genlerinin embriyonik gelişimin temel düzenleyicileri olduğu kabul edilmekte, Hh proteinleri hücre proliferasyonunu ve diferansiasyonunu, doku paterninin oluşumunu yönetmekte, sol-sağ asimetrisini, ekstremitelerin, iskelet sisteminin, adele yapılarının, gözlerin, akciğerlerin, dişlerin, sinir sisteminin ve bağırsakların doğru biçimde oluşumunu, sperm ve kıkırdak diferansiasyonunu indüklemektedir (92). Hh sinyalleri farklı işlevlere de sahiptir. Bir hedef alanda, doza bağımlı olarak, hücrelerin farklı olabilen kaderlerinin belirlenmesinde morfogen özellikleri görülürken, organ gelişimini sağlayan hücre proliferasyonunu düzenlerken mitogen etkileri ortaya çıkmaktadır (93, 94, 99, 100). Erişkin hayatta bu sinyal yolağı aktif kalmakta olup kök hücrenin yaşamını idame ettirmesinde, doku onarımı ve regenerasyonunda önemli işlevlere sahiptir. Dolayısıyla doku homeostazının sağlanmasında bu sinyaller kritik bir rol oynamaktadır (100).

Büyüme plağındaki prehipertrofik kondrositler Hh Ligand (Ihh) eksprese ederler (101-103). Ihh, paratiroid hormonu ile ilgili protein (PTHrP) ile negatif bir feedback döngüsünde hareket eden endokondral ossifikasyonun ana düzenleyicisi

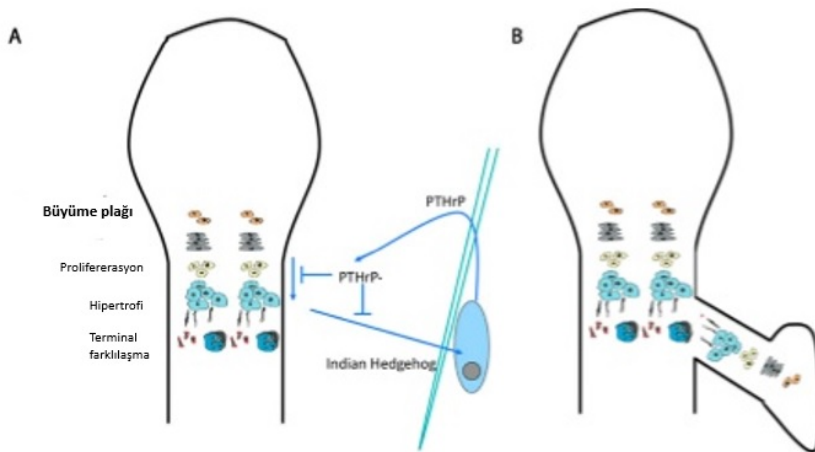
olarak görev yapar. Hh Ligand, periartiküler kondrositlerin proliferatif kondrositlere farklılaşmasını inhibe eden PTHrP 'nin ekspresyonunu artırmak için sinyal vererek hipertrofik farklılaşmanın başlangıcını düzenler. Ihh ayrıca, kondrosit farklılaşmasını düzenler ve perikondriumun PTHrP'den bağımsız bir şekilde ossifikasyonunu uyarır (Şekil 3) (104). PTHrP'nin Ihh tarafından düzenlenmesi, kondrosit farklılaşma kaskadı başlatılmasında rol oynayan kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) gibi araçları da içerir, kondrositlerde Ihh ekspresyonunu artırır (105).

Heparan sülfat, hedgehog ligandlarına bağlanır. EXT mutasyonları anormal heparan sülfat oluşmasına neden olur ve bu durum, hücre dışı ortamda anormal bir hedgehog ligand difüzyonu ile sonuçlanır (5, 106, 107). Hedgehog ligand, büyüme plağı kondrositlerinin terminal farklılaşmasını biçimlendirmek için hareket ettiği için, mutasyonun fonksiyonel sonucu olarak anormal kemik ve kıkırdak büyümesi ve şekillenmesine neden olur (Şekil 3) (24).

Şekil 3 : Büyüme plakasının diyagramatik gösterimi ve ekzostoz gelişimi (Referans (24)'den modifiye edilmiştir).

A: Büyüme plağı kondrositleri Ihh ve PTHrP tarafından düzenlenen negatif bir geri besleme döngüsünde hareket eden koordineli bir farklılaşma sürecine girer.

B: EXT gen mutasyonları hedgehog protein difüzyonunda anormalliklere, bazı büyüme plakası kondrositlerinin yanlış açıda longitudinal kemik gelişmesine ve sonunda ekzostoz gelişimine neden olur.



Heparan sülfat zincirler; hyaluronat gibi glikozaminoglikanların aksine karmaşık makromoleküllerdir (43, 44, 108). Heparan sülfat Jorpes ve Gardell tarafından 60 yıldan daha uzun bir süre önce ayrı bir moleküler varlık olarak tanımlanmış olmasına rağmen, yapısının açıklanması halen devam etmekte olan yavaş ve özenli bir süreçtir (109). Yapısal heterojenliği ve değişkenliği nedeniyle, HS tek bir bileşik olarak değil bir polimer ailesi olarak kabul edilir. Hücre yüzeylerinde ve hücre dışı matrikste (ECM) PG şeklinde oluşur (110, 111). HS'nin fizyolojik ve patofizyolojik aktivitelerinin çoğu, doğada büyük ölçüde elektrostatik olan ve çeşitli proteinlerle olan etkileşimlerden kaynaklanmaktadır (44, 47, 112-117).

Spesifik kimyaları ve yüksek negatif yükleri nedeniyle, HS zincirleri, büyüme faktörleri, sinyal proteinleri, integral membran reseptörleri, kemokinler ve hücre dışı matriks proteinleri gibi bir dizi proteine bağlanabilir (44, 118).

Heparan sülfat (HS), hücre yüzeyinin ve matriks ile ilişkili proteoglikanların (Heparan Sülfat Proteoglikan = HSPG'ler) çok yönlü ve temel bir bileşenidir (119). HSPG'ler dokuya özgü bir şekilde ifade edilir ve çok sayıda önemli gelişimsel ve fizyolojik fonksiyona sahiptir (46). Başlıca rollerinden biri, spesifik bir HS-bağlanma alanına sahip olarak büyüme faktörleri, morfojenler ve reseptörler ile etkileşime girmesidir (45, 47). HSPG 'ler protein kullanılabilirliğini, dağılımını, turnover ve sinyal alışverişini düzenler, böylece hücre adezyonunu ve göçünü, hücre-hücre etkileşimleri ve iletişimini, hücre farklılaşması ve morfogenezi, lipoprotein metabolizmasını, hemostaz ve gelişimde rol oynayan proteazları etkiler (44, 46, 120). Hücre yüzeyinde veya hücre dışı matrikste proteoglikanlar, HS zincirlerinin reseptör tanıma ve bağlama için gerekli olduğu ligandlar veya yardımcı reseptörler olarak işlev görür (121). ECM ve bazal membrandaki HSPG'ler (perlekan, agrin, kolajen XVIII) fibronektin ve laminin gibi matriks proteinleri ile etkileşime girer ve böylece mekanik strese karşı direnç, filtrasyon ve bariyer özellikleri sağlar. Ayrıca, kemokinler ve büyüme faktörleri için rezervuar görevi görürler. Perlekan, agrin ve kollajen XVIII'ün yan HS zincirleri, doku büyümesi ve onarımında rol oynayan ve doku rejenerasyonu veya yara iyileşmesi gibi doku remodeling bölgelerinde bulunabilen büyüme faktörlerini bağlar (122).

HSPG'ler, farklı çekirdek protein yapılarıyla karakterize edilen dört ana ailedir. İlk ikisi; syndekan ve glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlı glipikanlar, hücrelerin plazma zarı ile ilişkili HSPG türleridir. Üçüncü bir grup perlekan, agrin ve kollajen XVIII; salgılanmış formları içerir. Son olarak, serglisin hücre içi depolama granüllerinde, uzun ve yüksek oranda sülfatlanmış heparin zincirleri olan HS taşır. (43, 44, 46, 120).

Salgılanan Heparan Sülfat Proteoglikanlar olan perlekan, agrin ve kollajen XVIII, büyük bazal membran HSPG'lerdir. Perlekan genellikle mezenkimal organlarda ve bağ dokularında bulunur (123). ECM'de çok miktarda olması nedeniyle perlekan, kıkırdak oluşumundan yara iyileşmesinin düzenlenmesine kadar çok çeşitli gelişimsel ve homeostatik süreçler için önemlidir. Agrin, temel olarak bir nöronal PG olarak kabul edilmiştir, ancak gelişim sırasında çeşitli dokularda yaygın şekilde eksprese edilir. Özellikle, nöromusküler kavşakların oluşumu, bakımı ve yenilenmesinde kilit bir eleman olarak kabul edilir (124, 125). Kollajen XVIII vücutta çeşitli bazal membranlarda bulunur ve üç GAG bağlantı bölgesi içerir (126).

Heparan sülfat biyosentezinde mevcut bilgi, bilinen tüm HSPG'lerin polisakarit zincirlerinin aynı mekanizmaya göre üretildiğini destekler (112, 114).

HS zincirleri, başlangıç, uzama ve modifikasyon aşamalarını içeren bir biyosentetik işlemde lineer polisakaritlere birleştirilen tekrarlayan D-glukuronik asit (GlcA) ve N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) kalıntılarında oluşur. Sentez golgi aparatında, proteoglikanların çekirdek proteininde bir serin tortusuna bir ksilozun ksiloziltransferaz (XylT) ile eklenmesiyle başlatılır (67). Oluşan son proteinler, birinci karbonhidrat tortusunun tetrasakarit bağlantısına eklenmesi de dahil olmak üzere, HS sentezinde rol oynar (72, 127-129). Bir dizi enzim, çekirdek proteininin serin tortusu üzerinde bir tetrasakarit bağlantısı oluşturduktan sonra, Ext1 ve Ext2, HS zincirini polimerize eder (108). Elde edilen polimer, N-deasetilasyon / N-sülfatlama, epimerizasyon ve O-sülfatlama gibi karmaşık bir dizi modifikasyona tabi tutulur ve protein bağlanma özgüllüğü kazandırılır (120, 130). Hücre yüzeyinde zincirlerin ileri işlenmesi gerçekleşir (131, 132). Sonuçta yüksek derecede yapısal karmaşıklık ve biyolojik özgüllük derecesine sahip zincirler oluşur (43, 44).

Reaksiyonların çoğu, potansiyel olarak mevcut şeker birimlerinin sadece bir kısmını içereceğinden, nihai ürünler, doku kaynağına göre değişen heterojen yapılara sahiptir.

N-sülfotransferaz 1 (Ndst1), HS düzeneğinde bir başka kritik enzimdir ve asetil gruplarını sülfat modifikasyonları ile değiştirerek dokulara özgü sülfatlama paternleri oluşturur. Ndst1'in kaybı, hedgehog dağılımı ve büyüme plağı fonksiyonunda ciddi değişikliklere neden olur (133).

Toplamda, 11 farklı enzim (izoformlar hariç) HS biyosentezine dahil edilmiştir ve enzim yollarında meydana gelen aksamalar sonrası oluşan hastalıklardan bazıları Tablo 2' de özetlenmiştir.

Tablo 2: HS sentezinde yer alan enzimler.

| Enzim | Gen | Fenotip |
|--|------------|---|
| Ksilosiltransferaz 1 (XylT1) | Xylt1 | İskelet displazisi (139-145) |
| Ksilosiltransferaz 2 (XylT2) | Xylt2 | Kemik kırılabilirliği, katarakt ve işitme kusurları (139-145) |
| Galaktosiltransferaz 1 (GalT1) | B4galt7 | Ehlers-Danlos progeroid formu (146, 147) |
| Galaktosiltransferaz 2 (GalT2) | B3galt6 | Al-Gazali sendromu; iskelet anomalileri (148) |
| Glukuroniltransferaz (GlcAT1) | B3gat3 | İskelet displazisi, MKA (149, 150) |
| N-asetilglukosaminiltransferaz (EXTL2) | Ext2 | Bildirilmemiş. (127, 151) |
| Polimeraz 1 (EXT1); | Ext1; | HME, nöbet ve gelişimsel bozukluk (70, 72, 78, 152-154) |
| Polimeraz 2 (EXT2) | Ext2 | HME, nöbet ve gelişimsel bozukluk (70, 72, 78, 152-154) |
| N-deasetilaz/N-sülfotransferaz1 (NDST1) | Ndst1 | Mental retardasyon (155-159) |
| N-deasetilaz/N-sülfotransferaz2 (NDST2) | Ndst2 | Bildirilmemiş. (158-160) |
| N-deasetilaz/N-sülfotransferaz3 (NDST3) | Ndst3 | Şizofreni ve bipolar bozukluklar (161) |
| N-deasetilaz/N-sülfotransferaz4 (NDST4) | Ndst4 | Bildirilmemiş (162) |
| Glukuronil C5-epimeraz (Hsepi) | Glce | Bildirilmemiş (163) |
| Heksuronil 2-O-sülfotransferaz (2-OST) | Hs2st | Bildirilmemiş (164-166) |
| Glukozaminil6-O-sülfotransferaz1(6-OST1) | Hs6st1 | İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (167-169) |
| Glukozaminil6-O-sülfotransferaz2-3 | Hs6st2-3 | Bildirilmemiş (170) |
| Glukozaminil3-O-sülfotransferaz1-6 | Hs3st1-6 | Bildirilmemiş (170) |

HS zincirleri ve HSPG biyolojisinin bir başka ilginç yönü, zincirlerin, postbiyosentetik modifikasyonu; yani heparanaz (HPSE) ve iki endo-6-0-sülfotransferaz (Sulf) gibi enzimlerin etkisiyle hücre dışı olarak modifiye edilebilmesidir (134, 135). Sulfler, sülfat gruplarını seçici olarak ayırarak, yapısal patern ve heterojenliği değiştirir ve sinyal molekülleriyle etkileşimi etkileyerek hücre dışı HS zincirlerini değiştirir (134, 136, 137). Sulf1 enzimi hem BMP hem de FGF sinyallerine olumsuz etki eder (138). Sulf ekspresyonu, kondrositler arasındaki sinyalleri düzenleyerek eklem kıkırdak homeostazını korumak için de gereklidir (67).

HS'nin postbiyosentetik modifikasyonunda yer alan enzimler tümör patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir. Memelilerdeki HS'yi parçalayan tek endoglikozidaz olan Heparanaz'ın tümör hücreleri tarafından fazla sentezlenmesinin tümörlerin malignitesi ile güçlü bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır (171). Heparanaz, oluşan polimerin glikozidik bağına etki eden ve HS'yi spesifik olarak ayıran bir endoglukuronidazdır (172, 173). Ekzostoz dokusunda heparanaz ekspresyonu artışı tanımlanmıştır (174, 175). HS zincirlerinin küçük parçalara ayrılmasından sorumlu endoglukuronidaz olan HPSE, proliferatif bir aktiviteye sahiptir, kanser oluşumunda, invazyon ve büyüme faktörlerinin salınmasını düzenleyerek hücre dışı matrisin yapısal olarak yeniden yapılandırılmasında yer almaktadır (176). HPSE'nin endokondral ossifikasyon sırasında geç kondrosit farklılaşmasında rol oynadığını düşündüren, gelişmekte olan kemiklerdeki kondrosöz kavşağında artmış HPSE seviyeleridir (177). HS zincirlerinin bölünmesi, bazal membranların yapısını bozar, böylece tümör hücrelerinin dolaşıma girmesini ve daha fazla yayılmasını kolaylaştırır. Bazal membranın bozulması, primer tümörlerin ve metastazların patolojik gelişimi için gerekli olan anjiyogenez için de gereklidir. ECM'deki HSPG'lere bağlı sitokinler ve büyüme faktörleri, heparanaz tarafından katalize edilen HS zincirlerinin bölünmesiyle mobilize edilir ve tümör büyümesinin, stromal gelişimin veya anjiyogenezin uyarılması için erişilebilir hale gelir (178). Heparanaz ekspresyonu, ECM'nin ve bazal yapıların bozulmasıyla tümör hücresi sızmasını ve metastazı teşvik eder. İnflamatuar hücreler, yaralanan bölgelere göç etmek için bu aktiviteden de yararlanır. Ayrıca, HS'nin yanı sıra heparanaz aşırı

ekspresyonunun sadece genel zincirleri kısaltmakla kalmayıp, aynı zamanda HS'nin sülfatlanma derecesini de arttırdığı gösterilmiştir. Sülfatlanmadaki değişiklik, tümör gelişiminde önemli sinyal yollarını etkileyebilir.

Hem EXT1 hem de EXT2 HS sentezi için gereklidir (78, 154). EXT1'de mutasyon taşıyan farelerden izole edilen embriyonik fibroblastlar, daha kısa HS zincirleri sentezler ve insan hücrelerinde EXT1 veya EXT2'nin susturulması daha kısa HS zincirlerinin oluşması ile sonuçlanır (136). Bu türün en iyi anlaşılan genetik bozukluğu, HME ile sonuçlanan EXT1 veya EXT2 genleri mutasyonu sonucu daha az HS sentezlenmesinden ziyade proteinin daha kısa sentezlenmesi olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmalar, özellikle HS zincirlerinin, proteoglikanlara, büyüme ve sinyal proteinlerinin dağılımını ve kullanılabilirliğini ve bunların hedef hücreler üzerindeki ilgili etkileşimlerini, fonksiyonlarını ve biyoaktivitelerini düzenleyen anahtar yeteneklerle donatıldığını göstermiştir (46, 119, 179). Hedgehog protein, kemik morfojenik proteini (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve Wnt familyası üyeleri dahil bu proteinlerin birçoğu, büyüme plağında ifade edilir (104). HS'nin iskelet oluşumunda, büyümesinde ve morfogenezinde birçok önemli süreci etkilediği açıktır. Temel bir HS polimerleştirici enzim olan EXT1'de eksiklik, Indian Hedgehog (Ihh) difüzyon değişikliklerine, artmış sinyalizasyon ve büyüme plağı morfolojisinde önemli değişikliklere neden olur (180, 181) .

Bozulmuş HS sentezinin neden olduğu olgular genellikle, büyüme bozuklukları ve iskelet deformiteleri ile karakterize, çakışan fenotipik özelliklere sahiptir (136). Örneğin, kemik ve muskuloskeletal kusurlara neden olan ECM defektleri arasında Desbuquois displazisi tip 2, Ehlers-Danlos sendromunun progeriod varyantı, Larsen benzeri sendrom ve çoklu osteokondromlar (MO) bulunur. Bu hastalıklar sırasıyla XylT1 ve XylT2, GalT1, GalT2, GlcAT1, EXT1 ve EXT2'yi kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir (182). İlişkili semptomların ve fiziksel bulguların çeşitliliği ve şiddeti, mutasyona ve muhtemelen başka faktörlere bağlı olarak durumdan duruma değişir.

5 . TEDAVİ

Hereditör multipl ekzostozise yönelik güncel tedavi, temel olarak semptomatik tümörlerin cerrahi olarak çıkarılması, deformasyonlar, ekstremite uzunluğu tutarsızlıkları ve eklem ankilozu gibi majör iskelet kusurlarının düzeltilmesinden oluşur ve hastalar 18 yaşına kadar sıklıkla 40-50'den fazla ameliyat geçirir (4, 19, 183). Bununla birlikte, ekzostozların rezeke edilmesi çoğu zaman zordur. Cerrahi işlemin sonuçlarının her zaman tatmin edici olmamasının bir başka nedeni de ameliyat sonrası beklenenden daha geniş skar kalmasıdır (31). Olasılıkla, anormal heparan sülfat proteoglikanı, hücre dışı matrikste değişikliğe neden olarak beklenenden daha geniş bir skar veya keloid ile sonuçlanmasına sebep olmaktadır (24).

HME için farmakolojik tedavisinin araştırılması sırasında selektif BMP tip I reseptör inhibitörü olan ve HME fare modellerinde osteokondrom oluşumunu azaltan LDN-193189 bulunmuştur (184-186).

Bir diğer ajan palovaroten (PVO) ise, bir retinoik asit reseptörü γ (RAR γ) seçici agonistidir (187). Bu endikasyona dayanan bir faz 2 klinik çalışması PVO 'nun mükemmel güvenlik profilini göstermiştir (188). 2011 yılında Shimono ve ark. heterotopik ossifikasyon ile karakterize nadir bir genetik hastalık olan Fibrodisplazia Ossifikans Progresiva (FOP) 'da, PVO dahil RAR γ seçici agonistlerinin heterotopik ossifikasyonun güçlü inhibitörleri olduğunu bildirildi ve potansiyel terapötik faydalarını ortaya koydu (189, 190). PVO 'nun heterotopik ossifikasyonunu azalttığı etki mekanizması tam olarak açıklanmamasına rağmen, kısmi BMP sinyal inhibisyonu yaptığı düşünülür (189). Prevalans ve klinik fenotip farklı olsa da, HME ve FOP'un bazı fenotipik ve mekanizmal benzerlikleri vardır. Örneğin, FOP hastalarında HME benzeri osteokondrom gelişir (191). FOP mekanizması, bir kemik morfogenetik proteini (BMP) tip I reseptörü olan Aktivin A reseptör tip I / Aktivin benzeri kinaz 2'yi kodlayan ACVR1 / ALK2 geninde mutasyonundan kaynaklanır (192). HS kaybı/azalmasına bağlı aşırı BMP artışı da osteokondrom oluşumunda katkıda bulunan bir faktördür (55, 184, 185). PVO 'nun, HME'nin bir fare modelinde osteokondrom oluşumunu önleme yeteneğine sahip olup olmadığının araştırıldığı çalışmada PVO 'nun, BMP reseptörü

ACVR1'in yapısal olarak aktif mutasyonları nedeniyle, en azından kısmen, artan BMP sinyalinin zayıflaması ile FOP fare modellerinde heterotopik ossifikasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (189, 193, 194). Artan BMP sinyalinin HME fare modellerinde osteokondrom oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiş olduğundan PVO'nun HME'de osteokondrom oluşumunu baskılayabileceği, güçlü bir osteokondrom formasyonu inhibitörü olduğu belirtilmiştir (55, 184, 185).

BMP inhibitörü LDN-193189 ile yapılan tedavinin, osteokondrom oluşumunu baskıladığı, daha önce bildirmiştir (184). PVO'nun neden BMP sinyalini spesifik olarak hedefleyen inhibitörden daha güçlü olduğu hala belirlenmemiştir (195). PVO 'nun, perikondriyal progenitor hücrelerin kaderini belirleyen BMP ilişkisiz yollarda etkin olduğu düşünülmektedir (195).

6. OLGULAR VE YÖNTEM

Çalışmaya 01.01.1998 -31.12.2017 tarihleri arasında klinik ve radyografik özelliklerine göre HME tanısı almış 26 olgu dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil etme kriterleri olarak klinik değerlendirmede ve / veya radyolojik görüntülemelerde iki veya daha fazla ekzostoza saptanması alınmıştır. Dışlama kriteri olarak olgunun HME dışında ek sendromik özelliklere sahip olmaması kabul edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm olgular pediatrik genetik uzmanı ile birlikte muayene edilip fizik muayene bulguları kaydedilmiştir. Olgulardan DNA eldesi için 2 cc venöz kan örneği EDTA'lı tüpe alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm olguların kendilerinden ya da ailelerinden yazılı aydınlatılmış onam formu alınmıştır (Ek-1). Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar Tarihi: 12.03.2018, Karar Sayısı: 70904504/112) (Ek-2).

DNA Eldesi: Olguların periferik venöz kan örneği Hastanemiz kan alma biriminde EDTA'lı tüpe alınmıştır. Periferik kan örneklerinden silika kolon yöntemi kullanılarak DNA elde edilmiş ve florometrik olarak DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

Yeni Nesil DNA Dizileme: Genomik DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak, hedef gen bölgelerine ait primerler ile multipleks PCR yapılmıştır. Amplikonların barkodlanması sonrası emülsiyon PCR ile amplikon kütüphanesi oluşturulmuştur. Sentezle dizileme metoduna dayanan yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi kullanılarak Ion S5 (ThermoFisher Scientific Inc.) cihazında DNA dizisi elde edilmiştir.

Varyant Analizi: DNA dizi varyantları Ion Reporter Software (ThermoFisher Scientific Inc.) ve SEQ (Genomize) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Saptanan varyantların allel dağılım özellikleri, ilişkili proteinin fonksiyonuna olası etkileri ve ilişkili oldukları fenotipler varyant veri bankalarında (ClinVar, HGMD, Ensembl) incelenmiştir.

Genotip-Fenotip Karşılaştırma Analizi: Olguların fenotipleri ve saptanan genotip bulguları, varyant bilgi bankalarındaki bilgiler ile karşılaştırılmıştır. Her bir olguda saptanan varyantların özellikleri fenotipik bulgularla ilişkileri açısından incelenmiştir.



7.BULGULAR

Klinik Bulgular:

Olguların yaş aralığı 3-54 arasında değişkenlik göstermektedir.

Daha önceki bazı çalışmalarda erkeklerde kadınlara nazaran HME prevalansının daha yüksek olduğu (E/K=1.5: 1) görülmüştür (15, 17). Ancak bizim çalışmamızda 26 olgudan 14 tanesi kadın, 12 tanesi ise erkektir ve belirgin cinsiyet baskınlığı gözlenmemiştir.

Olguların serum kalsiyum seviyeleri; 9 ile 10,1 aralığında, fosfor seviyeleri; 3,4 ile 5.01 aralığında saptanmıştır.

26 olgudan on üçünün aile hikayesi pozitifken, on üçü sporadiktir.

Aile öyküsü pozitif olan ve varyant saptanan 11 olgunun 9 tanesi EXT1 (bunların 6'sı yeni saptanmış, 3'ü bilinen varyant); 2 tanesi EXT2' (bunların da 1'i yeni saptanmış, 1'i bilinen varyant) dir.

Aile öyküsü pozitif olan 9 EXT1 varyantından, 2 tanesi yeni tanımlanmış olan stop kodonu, 4 tanesi yeni tanımlanmış olan delesyon, daha önce bilinen varyantlardan 2 tanesi stop kodonu, 1 tanesi ise missense varyanttır.

Aile öyküsü pozitif olan EXT2 varyantlarından 1 tanesi yeni saptanmış insersiyon, diğer bilinen varyant ise stop kodonudur.

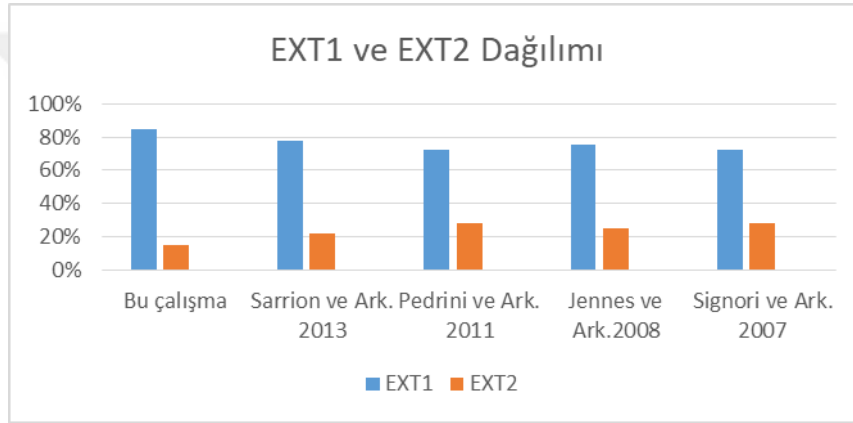
Aile öyküsü negatif olan 9 olgunun 8 tanesi EXT1; bunların 5'i yeni tanımlanmış, 3'ü bilinen varyant, kalan 1 EXT2 olgusu ise yeni tanımlanmış varyanttır. Olguların 15 tanesinde deformite gelişimi mevcuttur. Deformite geliştiren 5 olgu opere olmuş ve ulaşılabilen 3 olgunun patoloji sonucu osteokondrom olarak raporlanmıştır.

HS'in tüm dokularda azalması nedeni ile gözlenebilen ek hastalıklara dair; yara iyileşmesinde gecikme, diş problemleri, sosyal sorunlar, öğrenme güçlüğü, uyku bozuklukları ve nöropatiler olgularda gözlenmemiştir (31, 48-51). Postprandiyal lipid klirensinde değişiklikler ve pankreas hacminin azalması çalışma kapsamında değerlendirilmemiştir.

Genetik Bulgular

Çalışmamızda incelenen 26 HME olgusunun %85'inde (17 olgu) EXT1 geninde ve %15'inde EXT2 geninde varyant saptanmıştır. Bu dağılım farklı popülasyonlarda yapılmış birçok çalışma sonucu ile uyum içindedir (Şekil 4).

Şekil 4: Varyant frekanslarının önceki çalışmalarla karşılaştırılması.(EXT1 varyant durumlarının oranı (mavi) ve EXT2 varyant durum oranı(turuncu) ile gösterilmiştir.



HME öntanlı 26 gönüllüde EXT1 ve EXT2 genleri yeni nesil DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Olguların altısında (%23) kullandığımız yöntem ile varyant saptanamamıştır. Varyant saptanan 20 olguda birbirinden farklı delesyon, insersiyon veya nonsens(stop)/missens etkili tek nükleotid değişiklikleri gözlenmiştir (Tablo 4).

EXT1 geninde 17 olguda ve EXT2 geninde ise 3 olguda varyant tanımlanmıştır ve bu varyantların tamamı genlerin kodlayıcı ekzon bölgelerinde yerleşiktir. Saptanan 14 varyant hakkında varyant bilgi bankalarında veya literatürde bilgi bulunamamıştır ve bu varyantların ilk defa tanımlanan varyantlar olduğu düşünülmektedir.

Tablo 3: EXT1 ve EXT2 genlerinde tanımlanan varyantlar.

| Olgu Numarası | Gen | DNA | Protein | Varyant Tipi | Referans No |
|---------------|------|---------------|--------------------|--------------|---------------------------|
| 1 | EXT1 | c.493C>T | p.Gln165Ter | stop | CM053230 ^a |
| 2 | EXT1 | c.1776C>A | p.Tyr592Ter | stop | CM012095 ^b |
| 3 | EXT1 | c.166C>T | p.Pro56Ser | missense | rs368004125 ^c |
| 4 | EXT1 | c.1019G>A | p.Arg340His | missense | rs119103287 ^d |
| 5 | EXT1 | c.1021A>G | p.Arg341Gly | missense | rs1554580149 ^e |
| 6 | EXT1 | c.739G>T | p.Glu247Ter | stop | Bu çalışma |
| 7 | EXT1 | c.2029C>T | p.Gln677Ter | stop | Bu çalışma |
| 8 | EXT1 | c.803G>T | p.Gly268Val | missense | Bu çalışma |
| 9 | EXT1 | c.1219C>G | p.Gln407Glu | missense | Bu çalışma |
| 10 | EXT1 | c.2044A>G | p.Met682Val | missense | Bu çalışma |
| 11 | EXT1 | c.31delC | p.Leu11SerfsTer18 | delesyon | Bu çalışma |
| 12 | EXT1 | c.298delA | p.Met100TrpfsTer34 | delesyon | Bu çalışma |
| 13 | EXT1 | c.650_665del | p.Ala217ValfsTer30 | delesyon | Bu çalışma |
| 14 | EXT1 | c.1820delG | p.Gly607AspfsTer14 | delesyon | Bu çalışma |
| 15 | EXT1 | c.1978delC | p.Leu660TrpfsTer5 | delesyon | Bu çalışma |
| 16 | EXT1 | c.2084delC | p.Pro695SerfsTer11 | delesyon | Bu çalışma |
| 17 | EXT1 | c.2115delG | p.Met705IlefsTer13 | delesyon | Bu çalışma |
| 18 | EXT2 | c.166C>T | p.Arg56Ter | stop | rs754533434 ^f |
| 19 | EXT2 | c.261T>A | p.Asn87Lys | missense | Bu çalışma |
| 20 | EXT2 | c.764_765insA | p.Tyr255Ter | insersiyon | Bu çalışma |

a-CM053230: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=EXT1&accession=CM053230>

b-CM012095: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=EXT1&accession=CM012095>

c-rs368004125: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs368004125>

d- rs119103287: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs119103287>

e- rs1554580149: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1554580149>

f- rs754533434: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs754533434>

EXT1 geninde saptadığımız varyantların yedi tanesi nükleotid delesyonu özelliğindedir ve hepsi yeni saptanmış varyantlardır. Delesyonlar genin 5' ve 3' boyunca kodon 11 ve kodon 705 arasında farklı bölgelerde dağınık olarak yerleşiktir. Saptanan dört adet stop kodonu varyantının ikisi daha önce bildirilmiştir ve diğer ikisi yeni saptanan varyantlardandır. Tanımlanan altı missens varyantın ise üç tanesi daha önce bildirilmiştir ancak diğer üçü yeni saptanmıştır.

EXT2 geni varyantlarında ise birisi yeni saptanmış missense varyant, ikincisi yeni saptanmış insersiyon varyantı ve üçüncüsü bilinen stop kodonu varyantıdır.

Tablo 4: Yeni saptanan nükleotid değişikliklerinin varyant tiplerine göre dağılımı

| | <i>Bildirilmiş</i> | <i>Yeni Saptanan</i> | <i>Toplam</i> |
|-------------|--------------------|----------------------|---------------|
| Stop kodonu | 3 | 2 | 5 (%25) |
| Del/İns | - | 8 | 8 (%40) |
| Missens | 4 | 3 | 7 (%35) |



8 . TARTIŞMA

HME ön tanıılı 26 gönüllüde EXT1 ve EXT2 genleri yeni nesil DNA dizi analizi yöntemi ile incelendiğinde, olguların altısında (%23) kullandığımız yöntem ile varyant saptanamamıştır. Varyant saptanan 20 olguda birbirinden farklı delesyon, insersiyon veya nonsens(stop) / missens etkili tek nükleotid değişiklikleri gözlenmiştir. EXT1 geninde 17 olguda ve EXT2 geninde ise 3 olguda varyant tanımlanmıştır ve bu varyantların tamamı genlerin kodlayıcı ekzon bölgelerinde yerleşiktir. Saptanan 14 varyant hakkında varyant bilgi bankalarında veya literatürde bilgi bulunamamıştır ve bu varyantların ilk defa tanımlanan varyantlar olduğu düşünülmektedir.

İncelenen HME öntanıılı olgularda saptanan DNA nükleotid varyantlarının, bu genlerin kodladığı protein fonksiyonları üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde varyant bilgi bankaları öncelikli olarak kullanılmıştır. EXT1 geninde saptanan iki stop kodonu ve dört missens varyant daha önce HME olgularında gözlenmiştir ve varyant bilgi bankalarında protein fonksiyonu üzerinde patolojik etkiye sahip değişimler oldukları kabul edilmektedir.

Daha önce bildirilen olgular değerlendirildiğinde; 1 numaralı olguda EXT1 geninde saptanan c.493C>T varyantı stop kodonudur ve ilk olarak 2005 yılında Pedrini ve arkadaşlarının yaptığı multipl ekzostozlu İtalyan hastalarda DHPLC bazlı mutasyon taraması çalışmasında tanımlanmıştır (196). Bu çalışma incelendiğinde, çalışmanın DHPLC tekniğini değerlendirme amaçlı yapılmış olduğu ve hastaların fenotipik özelliklerinin değerlendirilmediği görülmüştür. Olgu değerlendirildiğinde, ailevi geçişe sahip olan 10 yaşında erkek olgunun 11 adet ekzostozu mevcut ve deformite geliştirmemiş olduğu saptanmıştır.

2 numaralı olguda EXT1 geninde saptanan c.1776C>A varyantı stop kodonudur. Francannet ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmada IS grubu olarak değerlendirilmiştir (14). Bu çalışmada hastalığın fenotipik derecelendirmesine dayanarak, iki aile grubu tanımlanmış, ağır etkilenen üyeleri olan aileleri içeren ilk grup S grubu, orta derecede etkilenen fenotip ikinci grup M grubu olarak isimlendirilmiştir. S grubu; exostoz sayısı,vertebra tutulumu ve boy persentiline göre dört ayrı klinik alt gruba ayrılmış, IS grubu en az ekzostoz sayısına sahip,

boyu 10 percentilden küçük, vertebral tutulumu olmayan hastalık derecesini tanımlamıştır. Bizim hastamızı değerlendirdiğimizde ailevi geçişi olan 7 yaş kız olguda da vertebral tutulum yok, 15'in üzerinde ekzostoz sayısına sahiptir ancak çalışma kapsamında boy percentili değerlendirmesi yapılmamıştır. Ek olarak hastada deformite gelişimi mevcuttur.

3 numaralı olguda EXT1 geninde saptanan c.166C>T varyantına ait klinik verilere veri tabanlarında ulaşılamamakla beraber, olgu değerlendirildiğinde, ailevi geçişe sahip 18 yaş erkek olgunun 6 adet ekzostozu mevcut ve deformite geliştirmemiş olduğu saptanmıştır.

4 numaralı olguda EXT1 geninde saptanan c.1019G>A varyantı missense mutasyon olarak değerlendirilmiştir. İlk olarak 1998 yılında Raskind ve arkadaşları tarafından HME 'li 34 ailede lokus heterojenitesi ve EXT1 mutasyonlarının değerlendirilmesi amacı ile yapılan çalışmada saptanmıştır (197). Hastalara ait fenotipik özellikler çalışmada yer almamaktadır. İzlemede 2000 yılında Dobson-Stone ve arkadaşları tarafından yapılan HME hastalarında EXT1 ve EXT2 mutasyonlarının tespiti için floresan tek iplikli konformasyon polimorfizm analizi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi denatüre etme tekniklerinin karşılaştırılması amacı ile yapılan çalışmada ve 2001 yılında Cheung ve arkadaşları tarafından HME hastalarında EXT1 geninde etyolojik nokta mutasyonlarında heparan sülfat polimeraz aktivitesinin fonksiyonel analizinin değerlendirildiği çalışmada da bildirilmiştir. Bozzola ve arkadaşlarının 2015 yılında bildirdiği bir vaka raporunda, büyüme hormonu eksikliği olan 2 HME hastasında büyüme hormon replasmanının ekzostoz gelişimine ve ilerlemesine etkisi değerlendirilmiş, hastalardan birinde c.1019G>A varyantı saptanmıştır. Varyantın saptandığı vakada çoklu ekzostoz (skapulalar, kaburgalar, sol distal femur, sağ proksimal tibia, sol ön kol) mevcut, aile öyküsü pozitif, ayrıca 6 aylıkken Langerhans hücreli histiositoz ve diabetes insipidus tanıları almış ve boy kısalığı etyolojisine yönelik çekilen hipotalamohipofizer bölge manyetik rezonans görüntülemesinde hipofiz sapının kalınlaşması (4.18 mm) saptanmıştır. GH replasmanı alan hastanın tedavisinin 6, 12 ve 18 ay ultrason incelemesinde, ekzostozlarda önemli değişiklikler olmadığı belirlenmiştir. 2016 yılında Ishimaru ve arkadaşları tarafından 112 japon hastanın yer aldığı çalışmada 71 aile taraması

yapılmış, 2 ailede ailesel geçişli c.1019G>A varyantı saptanmıştır. Bizim olgumuzda ise aile öyküsü negatif olan 22 yaşında kız, ekzostoz sayısı 3, kranial grafide dövülmüş bakır manzarası olan olgunun boyu çalışma kapsamında değerlendirilmemiştir.

5 numaralı olguda EXT1 geninde saptanan c.1021A>G varyantı missense mutasyondur Bu dizi değişikliğinde, EXT1 proteininin 341. kodonundaki (p.Arg341Gly) arginin ile glisin değiştirir. Bu varyant, türler arasında korunan bir pozisyonda meydana gelir ve siliko analizinde, bu varyantın muhtemelen protein yapısına / fonksiyonuna zarar verdiğini tahmin edilebilir. Mevcut kanıtlar varyantın patojenik olduğunu gösterir, ancak bunu kanıtlamak için ek verilere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, bu değişken Olası Patojenik olarak sınıflanmıştır.

Yukarıda tanımladığımız hastalar dışında saptadığımız ve daha önce bildirilmemiş varyantların, protein fonksiyonu üzerine etkilerinin öngörülebilmesi için varyant tipi belirleyici niteliktedir. Delesyon ve stop kodonu varyantları, kodlanan proteinin aminoasit dizisinde genel olarak kısaltmaya yol açarlar ve fonksiyon kaybına neden olurlar. Çalışmamızda EXT1 geninde tanımlanan iki stop kodonu ve yedi delesyon varyantı, 746 aminoasid uzunluktaki EXT1 proteininin daha kısa boylarda üretimine yol açacaktır (en kısa 29 aa uzunlukta-olgu11 ve en uzun 718 aa uzunlukta-olgu17). Üretilen kısa EXT1 proteinlerinin, kaybedilen bölgelerin sahip oldukları özelliklere bağlı olarak, protein fonksiyonlarını bozacağı ve patolojik klinik bulgulara neden olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca bu varyantlar mevcut toplum çalışmalarında da bildirilmemiştir. Dolayısıyla saptadığımız stop kodonu ve delesyon varyantları oluşturacakları etki açısından “olasılıkla patolojik” olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 5: Protein fonksiyonu üzerinde yeni saptanan varyantların öngörülen-olası etkileri

| Olgu No | Gen | Protein | Varyant Tipi | Öngörülen Etki-SIFT* | Öngörülen Etki-MT** | Olası Etki |
|---------|------|--------------------|--------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 3 | EXT1 | p.Pro56Ser | missense | Etkileyici | Etkileyici | Anlamı bilinmeyen |
| 8 | EXT1 | p.Gly268Val | missense | Etkileyici | Etkileyici | Anlamı bilinmeyen |
| 9 | EXT1 | p.Gln407Glu | missense | Tolere edilebilir | Etkileyici | Anlamı bilinmeyen |
| 10 | EXT1 | p.Met682Val | missense | Tolere edilebilir | Etkileyici | Anlamı bilinmeyen |
| 19 | EXT2 | p.Asn87Lys | missense | Tolere edilebilir | Benign | Anlamı bilinmeyen |
| 6 | EXT1 | p.Glu247Ter | stop | | | Olasılıkla patolojik |
| 7 | EXT1 | p.Gln677Ter | stop | | | Olasılıkla patolojik |
| 11 | EXT1 | p.Leu11SerfsTer18 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 12 | EXT1 | p.Met100TrpfsTer34 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 13 | EXT1 | p.Ala217ValfsTer30 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 14 | EXT1 | p.Gly607AspfsTer14 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 15 | EXT1 | p.Leu660TrpfsTer5 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 16 | EXT1 | p.Pro695SerfsTer11 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 17 | EXT1 | p.Met705IlefsTer13 | delesyon | | | Olasılıkla patolojik |
| 20 | EXT2 | p.Tyr255Ter | insersiyon | | | Olasılıkla patolojik |

*SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant; SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic Acids Research, 2012 Jul; 40 (Web Server Issue): W542-7.

**MT: MutationTaster; Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Methods. 2014 Apr;11(4):361-2.

Missens varyantların protein fonksiyonu üzerine etkilerinin incelenmesi için web tabanlı Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) ve MutationTaster (MT) programları kullanılmıştır. EXT1 geni p.Pro56Ser ve p.Gly268Val varyantları incelendiğinde, gerek SIFT gerekse MT programı protein fonksiyonunun etkileneceğini öngörmektedir. Buna karşın EXT1 geni p.Gln407Glu ve p.Met682Val varyantları SIFT programı ile tolere edilebilir olarak yorumlanırken MT programında fonksiyonu etkileyici olacakları sonucuna ulaşılmıştır. EXT2 geni p.Asn87Lys varyantı analizinde ise her iki program da protein fonksiyonlarının korunacağını öngörmektedir. Mevcut toplum çalışmalarında bu missens varyantlara ilişkin bilgi bulunmadığı için “anlamı bilinmeyen varyant” olarak sınıflandırılmaları tercih edilmiştir.

Bu sınıflama varyantların etkisine dair bir öngörü olmakla birlikte olguların ailelerindeki allel dağılımlarının belirlenmesi ile daha kesin yorumlar yapılması mümkün olabilir.

Çalışmamızın kısıtlayıcı noktaları; saptadığımız olası patojen varyantların fonksiyon analizi ve ebeveyn çalışmalarının yapılmamış olması ve çalışmanın başlangıcında hedeflenen fenotip genotip korelasyonunun kayıtların yetersizliği ve hastaların uyum göstermemesi nedeni ile yapılamamış olmasıdır. Ancak çalışmamız Türkiye’de HME tanılı hastalarda yapılan en geniş moleküler çalışma olması yanında, tanımlanan yeni varyantlarla literatüre katkı sağlamıştır.

10. ÖZET

Hereditär multiple ekzostoza (HME) veya diğer adı ile multiple osteokondroma, uzun kemiklerin metafiziyeal bölgesinde, büyüme plaklarını çevreleyen perikondrium içinde, yani kemiklerin juksta-epifiziyeal bölgelerinde, iskelet ve bağ dokusu bozuklukları ile ilişkili glikozaminoglikan biyosentezinde bozulma sonucu malign olmayan kıkırdak kökenli ekzofitik kemik tümörleri gelişimi ile karakterize, nadir bir otozomal dominant hastalıktır. Semptomların başlaması sırasında ortalama yaş aralığı 2-15 yıl arasında değişkenlik gösterir ve büyüme plakları kapandığında yeni ekzostoz oluşmaması hastalığın tipik özelliğidir. Ekzostozlar çoğunlukla iyi huylu olan iskelet çıkıntılaridir.

Hastaların yaklaşık % 0,2-5'inde osteokondromlar malign transformasyon göstererek kemoterapiye veya radyoterapiye dirençli, hayatı tehdit edebilen kondrosarkomlara veya osteosarkomlara dönüşebilir.

Hereditär multipl ekzostoza, genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Exostosin-1 (8q24.11-q24.13'te EXT1) ve Exostosin-2 (11p12-p11'de EXT2) genleri hastalıktan sorumludur. HME vakalarının çoğunluğunun EXT1 veya EXT2'deki heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları ile ilişkili olduğu, mutasyonların çoğunun ailesel ve yaklaşık % 10'unun sporadik olduğunu gösterilmiştir.

Çalışmamızda HME hastalarımızda EXT1 ve EXT2 gen mutasyonlarının saptanması, genotip ve fenotip ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile Ülkemizdeki HME hastalarında EXT1 ve EXT2 gen mutasyonlarının değerlendirilmesi, yeni varyantlar belirlenmesi, Türk toplumunda hastalığın, doğası, sıklığı ve dağılımı incelenerek genotip ve fenotip ilişkisi belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında HME öntanıllı 26 gönüllüde EXT1 ve EXT2 genleri yeni nesil DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Olguların fenotipleri ve saptanan genotip bulguları, varyant bilgi bankalarındaki bilgiler ile karşılaştırılmıştır. Her bir olguda saptanan varyantların özellikleri fenotipik bulgularla ilişkileri açısından incelenmiştir. Olguların altısında (%23) kullandığımız yöntem ile varyant saptanamamıştır. Varyant saptanan 20 olguda birbirinden farklı delesyon, insersiyon veya nonsens(stop)/missens etkili tek nükleotid değişiklikleri gözlenmiştir . EXT1 geninde 17 olguda ve EXT2 geninde ise 3 olguda varyant tanımlanmıştır ve bu varyantların tamamı genlerin kodlayıcı

ekzon bölgelerinde yerleşiktir. Saptanan 14 varyant hakkında varyant bilgi bankalarında veya literatürde bilgi bulunamamıştır ve bu varyantların ilk defa tanımlanan varyantlar olduğu düşünülmektedir. EXT1 geninde saptadığımız varyantların yedi tanesi nükleotid delesyonu özelliğindedir ve hepsi yeni saptanmış varyantlardır. Delesyonlar genin 5' ve 3' boyunca kodon 11 ve kodon 705 arasında farklı bölgelerde dağınık olarak yerleşiktir. Saptanan dört adet stop kodonu varyantının ikisi daha önce bildirilmiştir ve diğer ikisi yeni saptanan varyantlardandır. Tanımlanan altı missens varyantın ise üç tanesi daha önce bildirilmiştir ancak diğer üçü yeni saptanmıştır. EXT2 geni varyantlarında ise birisi yeni saptanmış missense varyant, ikincisi yeni saptanmış insersiyon varyantı ve üçüncüsü bilinen stop kodonu varyantıdır.

Çalışmamız Türkiye'de HME hastalarında yapılan en geniş kapsamlı moleküler genetik çalışmadır. Çalışmamızda bulunan yeni varyantlar literatüre katkısı olacaktır. Bu çalışmadan çıkan sonuçlar, HME hastalarında moleküler genetik tanı, tedavi ve takip yöntemlerinin gelişmesine katkısı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Herediter multiple ekzostozis, EXT1, EXT2

11. ABSTRACT

Hereditary multiple exostosis (HME), also known as multiple osteochondroma, is a rare autosomal dominant disease, which contains malfunction in the metaphyseal region of the long bones, within the perichondrium surrounding the growth plates, i.e. in the glucosaminoglycan biosynthesis associated with skeletal and connective tissue disorders and characterized by the development of cartilage-based exophytic bone tumors.

The average age range varies between 2-15 years at the onset of symptoms, and the absence of new exostosis when the growth plates are closed is typical of the disease. Exostoses are mostly benign skeletal protrusions. In approximately 0.2-5% of patients, osteochondromas can turn into life-threatening chondrosarcoma or osteosarcoma that are resistant to chemotherapy or radiotherapy by showing malignant transformation.

Hereditary multiple exostosis is a genetically heterogeneous disease. Exostosin-1 (EXT1 in 8q24.11-q24.13) and Exostosin-2 (EXT2 in 11p12-p11) genes are responsible for the disease. It's shown that the majority of HME cases are associated with heterozygous dysfunction mutations in EXT1 or EXT2, most of the mutations are familial and about 10% are sporadic.

In our study, it was aimed to determine EXT1 and EXT2 gene mutations in HME patients in our country, to determine new variants, to determine the genotype and phenotype relationship by examining the nature, frequency and distribution of the disease in Turkish society. Within the scope of the study, EXT1 and EXT2 genes were investigated in 26 volunteers diagnosed with HME by a new generation DNA sequence analysis method. The phenotypes and genotype findings of the cases were compared with the information in the variant databases. The characteristics of the variants detected in each case were examined in terms of their relationship with the phenotypic findings.

In six cases (23%), the variant could not be detected using the method we used. In 20 cases with variants, different single nucleotide changes with deletion, insertion or nonsense (stop) / missens effect were observed. Variant was defined in 17 cases

in EXT1 gene and 3 cases in EXT2 gene and all of these variants are located in the coding exon regions of genes. Information on 14 variants detected has not been found in variant databases or literature, and these variants are considered to be the newly detected variants. Seven of the variants we detected in the EXT1 gene are nucleotide deletions and all are newly detected variants. Deletions are located scattered throughout the 5' and 3' of the gene between codon 11 and codon 705 in different regions. Two of the four stop codon variants detected have been previously reported, and the other two are from the newly detected variants. Three of the six missens variants identified were previously reported, but the other three were newly identified. In EXT2 gene variants, one is the newly detected missense variant, the second is the newly detected insertion variant and the third is the known stop codon variant.

Our study is the most comprehensive study of molecular genetics HME patients in Turkey. New variants in our study will contribute to the literature. The results of this study will contribute to the development of molecular genetic diagnosis, treatment and follow-up methods in HME patients.

Keywords: Hereditary multiple exostosis, EXT1, EXT2

12. KAYNAKLAR

1. Solomon L. Hereditary Multiple Exostosis. American journal of human genetics. 1964;16:351-63.
2. Wicklund CL, Pauli RM, Johnston D, Hecht JT. Natural history study of hereditary multiple exostoses. American journal of medical genetics. 1995;55(1):43-6.
3. Schmale GA, Conrad EU, 3rd, Raskind WH. The natural history of hereditary multiple exostoses. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1994;76(7):986-92.
4. Jones KB. Glycobiology and the growth plate: current concepts in multiple hereditary exostoses. Journal of pediatric orthopedics. 2011;31(5):577-86.
5. McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Mattison K, Esford LE, Dyer AP, et al. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. Nature genetics. 1998;19(2):158-61.
6. Karasick D, Schweitzer ME, Eschelmann DJ. Symptomatic osteochondromas: imaging features. AJR American journal of roentgenology. 1997;168(6):1507-12.
7. Kok HK, Fitzgerald L, Campbell N, Lyburn ID, Munk PL, Buckley O, et al. Multimodality imaging features of hereditary multiple exostoses. The British journal of radiology. 2013;86(1030):20130398.
8. Hennet T, Cabalzar J. Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycocalyx dysfunction. Trends in biochemical sciences. 2015;40(7):377-84.
9. Hennekam RC. Hereditary multiple exostoses. Journal of medical genetics. 1991;28(4):262-6.
10. Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, et al. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). Human mutation. 2009;30(12):1620-7.
11. Spjut HJ, Dorfman HD, Fechner RE, Ackerman LV. Tumors of bone and cartilage. In: Spjut HJ, Dorfman HD, Fechner RE, Ackerman LV, editors. Atlas of tumor pathology, second series, fascicle 5. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1971. pp. 249-50.
12. Levesque J, Marx R, Bell RS, Wunder JS, Kandel R, White L 1998 A Clinical Guide to Primary Bone Tumors. Williams & Wilkins, Philadelphia, 1998. Enchondroma; p 98-107
13. Porter DE, Simpson AH. The neoplastic pathogenesis of solitary and multiple osteochondromas. The Journal of pathology. 1999;188(2):119-25.
14. Francannet C, Cohen-Tanugi A, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J, Legeai-Mallet L. Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. Journal of medical genetics. 2001;38(7):430-4.
15. Shapiro F, Simon S, Glimcher MJ. Hereditary multiple exostoses. Anthropometric, roentgenographic, and clinical aspects. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1979;61(6A):815-24.

16. Legeai-Mallet L, Munnich A, Maroteaux P, Le Merrer M. Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses. *Clinical genetics*. 1997;52(1):12-6.
17. Bovee JV. Multiple osteochondromas. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008;3:3.
18. Porter DE, Lonie L, Fraser M, Dobson-Stone C, Porter JR, Monaco AP, et al. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A genotype-phenotype study. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2004;86(7):1041-6.
19. Stieber JR, Dormans JP. Manifestations of hereditary multiple exostoses. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2005;13(2):110-120.
20. Clement ND, Duckworth AD, Baker AD, Porter DE. Skeletal growth patterns in hereditary multiple exostoses: a natural history. *Journal of pediatric orthopedics Part B*. 2012;21(2):150-4.
21. Clement ND, Porter DE. Hereditary multiple exostoses: anatomical distribution and burden of exostoses is dependent upon genotype and gender. *Scottish medical journal*. 2014;59(1):35-44.
22. Uchida K, Kurihara Y, Sekiguchi S, Doi Y, Matsuda K, Miyanaga M, et al. Spontaneous haemothorax caused by costal exostosis. *The European respiratory journal*. 1997;10(3):735-6.
23. Peterson HA. Multiple Hereditary osteochondromata. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 239:222-230
24. Alman BA. Multiple hereditary exostosis and hedgehog signaling: implications for novel therapies. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2009;91 Suppl 4:63-7.
25. Dormans JP. *Pediatric orthopaedics: core knowledge in orthopaedics*. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.
26. Porter DE, Benson MK, Hosney GA. The hip in hereditary multiple exostoses. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2001;83(7):988-95.
27. Wang YZ, Park KW, Oh CS, Ahn YS, Kang QL, Jung ST, et al. Developmental pattern of the hip in patients with hereditary multiple exostoses. *BMC musculoskeletal disorders*. 2015;16:54.
28. Roach JW, Klatt JW, Faulkner ND. Involvement of the spine in patients with multiple hereditary exostoses. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2009;91(8):1942-8.
29. Matsumoto Y, Matsumoto K, Harimaya K, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Scoliosis in patients with multiple hereditary exostoses. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2015;24(7):1568-73.
30. Felix NA, Mazur JM, Loveless EA. Acetabular dysplasia associated with hereditary multiple exostoses. A case report. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2000;82(4):555-7.
31. Hosalkar H, Greenberg J, Gaugler RL, Garg S, Dormans JP. Abnormal scarring with keloid formation after osteochondroma excision in children with multiple hereditary exostoses. *Journal of pediatric orthopedics*. 2007;27(3):333-7.

32. Goud AL, de Lange J, Scholtes VA, Bulstra SK, Ham SJ. Pain, physical and social functioning, and quality of life in individuals with multiple hereditary exostoses in The Netherlands: a national cohort study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(11):1013-20.
33. Chhina H, Davis JC, Alvarez CM. Health-related quality of life in people with hereditary multiple exostoses. *Journal of pediatric orthopedics*. 2012;32(2):210-4.
34. Arkader A. Multiple hereditary exostoses: its burden on childhood and beyond: commentary on an article by A.L. Goud, MD, et al.: "Pain, physical and social functioning, and quality of life in individuals with multiple hereditary exostoses in The Netherlands. A national cohort study". *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(11):e81.
35. Zaijun L, Xinhai Y, Zhipeng W, Wending H, Quan H, Zhenhua Z, et al. Outcome and prognosis of myelopathy and radiculopathy from osteochondroma in the mobile spine: a report on 14 patients. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2013;26(4):194-9.
36. Bari MS, Jahangir Alam MM, Chowdhury FR, Dhar PB, Begum A. Hereditary multiple exostoses causing cord compression. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*. 2012;22(12):797-9.
37. Assefa D, Murphy RC, Bergman K, Atlas AB. Three faces of costal exostoses: case series and review of literature. *Pediatric emergency care*. 2011;27(12):1188-91.
38. de Andrea CE, Reijnders CM, Kroon HM, de Jong D, Hogendoorn PC, Suzhai K, et al. Secondary peripheral chondrosarcoma evolving from osteochondroma as a result of outgrowth of cells with functional EXT. *Oncogene*. 2012;31(9):1095-104.
39. Ahmed AR, Tan TS, Unni KK, Collins MS, Wenger DE, Sim FH. Secondary chondrosarcoma in osteochondroma: report of 107 patients. *Clinical orthopaedics and related research*. 2003(411):193-206.
40. Anower EKMF, Matsumoto K, Habuchi H, Morita H, Yokochi T, Shimizu K, et al. Glycosaminoglycans in the blood of hereditary multiple exostoses patients: Half reduction of heparan sulfate to chondroitin sulfate ratio and the possible diagnostic application. *Glycobiology*. 2013;23(7):865-76.
41. Cheung PK, McCormick C, Crawford BE, Esko JD, Tufaro F, Duncan G. Etiological point mutations in the hereditary multiple exostoses gene EXT1: a functional analysis of heparan sulfate polymerase activity. *American journal of human genetics*. 2001;69(1):55-66.
42. Zak BM, Schuksz M, Koyama E, Mundy C, Wells DE, Yamaguchi Y, et al. Compound heterozygous loss of Ext1 and Ext2 is sufficient for formation of multiple exostoses in mouse ribs and long bones. *Bone*. 2011;48(5):979-87.
43. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(7).
44. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*. 2007;446(7139):1030-7.
45. Billings PC, Pacifici M. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries. *Connective tissue research*. 2015;56(4):272-80.
46. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*. 2004;131(24):6009-21.

47. Xu D, Esko JD. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annual review of biochemistry*. 2014;83:129-57.
48. Wiweger MI, Zhao Z, van Merkesteyn RJ, Roehl HH, Hogendoorn PC. HSPG-deficient zebrafish uncovers dental aspect of multiple osteochondromas. *PloS one*. 2012;7(1):e29734.
49. Bolton P, Powell J, Rutter M, Buckle V, Yates JR, Ishikawa-Brush Y, et al. Autism, mental retardation, multiple exostoses and short stature in a female with 46,X,t(X;8)(p22.13;q22.1). *Psychiatric genetics*. 1995;5(2):51-5.
50. De Stefano N, Dotti MT, Malandrini A, Federico A. Association of myopathy with multiple exostoses and mental retardation: a case report. *Brain & development*. 1994;16(2):136-8.
51. Roberts IS, Gleadle JM. Familial nephropathy and multiple exostoses with exostosin-1 (EXT1) gene mutation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(3):450-3.
52. Mooij HL, Bernelot Moens SJ, Gordts PL, Stanford KI, Foley EM, van den Boogert MA, et al. Ext1 heterozygosity causes a modest effect on postprandial lipid clearance in humans. *Journal of lipid research*. 2015;56(3):665-73.
53. Bovee JV, Cleton-Jansen AM, Wuyts W, Caethoven G, Taminiou AH, Bakker E, et al. EXT-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas. *American journal of human genetics*. 1999;65(3):689-98.
54. Hecht JT, Hayes E, Haynes R, Cole WG, Long RJ, Farach-Carson MC, et al. Differentiation-induced loss of heparan sulfate in human exostosis derived chondrocytes. *Differentiation; research in biological diversity*. 2005;73(5):212-21.
55. Huegel J, Mundy C, Sgariglia F, Nygren P, Billings PC, Yamaguchi Y, et al. Perichondrium phenotype and border function are regulated by Ext1 and heparan sulfate in developing long bones: a mechanism likely deranged in Hereditary Multiple Exostoses. *Developmental biology*. 2013;377(1):100-12.
56. Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, et al. Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney international*. 2008;74(3):289-99.
57. Darilek S, Wicklund C, Novy D, Scott A, Gambello M, Johnston D, et al. Hereditary multiple exostosis and pain. *Journal of pediatric orthopedics*. 2005;25(3):369-76.
58. Cook A, Raskind W, Blanton SH, Pauli RM, Gregg RG, Francomano CA, et al. Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses. *American journal of human genetics*. 1993;53(1):71-9.
59. Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, et al. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nature genetics*. 1995;11(2):137-43.
60. Wuyts W, Ramlakhan S, Van Hul W, Hecht JT, van den Ouweland AM, Raskind WH, et al. Refinement of the multiple exostoses locus (EXT2) to a 3-cM interval on chromosome 11. *American journal of human genetics*. 1995;57(2):382-7.
61. Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, et al. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nature genetics*. 1996;14(1):25-32.

62. Wuyts W, Van Hul W, Wauters J, Nemtsova M, Reyniers E, Van Hul EV, et al. Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Human molecular genetics*. 1996;5(10):1547-57.
63. Buhler EM, Malik NJ. The tricho-rhino-phalangeal syndrome(s): chromosome 8 long arm deletion: is there a shortest region of overlap between reported cases? TRP I and TRP II syndromes: are they separate entities? *American journal of medical genetics*. 1984;19(1):113-9.
64. Wuyts W, Van Hul W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Human mutation*. 2000;15(3):220-7.
65. Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, Wagner M. Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8. *American journal of human genetics*. 1995;56(5):1125-31.
66. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-3.
67. Huegel J, Sgariglia F, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Dormans JP, Pacifici M. Heparan sulfate in skeletal development, growth, and pathology: the case of hereditary multiple exostoses. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2013;242(9):1021-32.
68. Mertens F, Rydholm A, Kreicbergs A, Willen H, Jonsson K, Heim S, et al. Loss of chromosome band 8q24 in sporadic osteocartilaginous exostoses. *Genes, chromosomes & cancer*. 1994;9(1):8-12.
69. Raskind WH, Conrad EU, Chansky H, Matsushita M. Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. *American journal of human genetics*. 1995;56(5):1132-9.
70. Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(41):26265-8.
71. Zuntini M, Pedrini E, Parra A, Sgariglia F, Gentile FV, Pandolfi M, et al. Genetic models of osteochondroma onset and neoplastic progression: evidence for mechanisms alternative to EXT genes inactivation. *Oncogene*. 2010;29(26):3827-34.
72. Busse M, Feta A, Presto J, Wilen M, Gronning M, Kjellen L, et al. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(45):32802-10.
73. Wu YQ, Heutink P, de Vries BB, Sandkuijl LA, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, et al. Assignment of a second locus for multiple exostoses to the pericentromeric region of chromosome 11. *Human molecular genetics*. 1994;3(1):167-71.
74. Hameetman L, Szuhai K, Yavas A, Knijnenburg J, van Duin M, van Dekken H, et al. The role of EXT1 in nonhereditary osteochondroma: identification of homozygous deletions. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(5):396-406.
75. Reijnders CM, Waaijer CJ, Hamilton A, Buddingh EP, Dijkstra SP, Ham J, et al. No haploinsufficiency but loss of heterozygosity for EXT in multiple osteochondromas. *The American journal of pathology*. 2010;177(4):1946-57.

76. Bernard MA, Hall CE, Hogue DA, Cole WG, Scott A, Snuggs MB, et al. Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins EXT1 and EXT2 in exostosis chondrocytes. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2001;48(2):149-62.
77. Hall CR, Cole WG, Haynes R, Hecht JT. Reevaluation of a genetic model for the development of exostosis in hereditary multiple exostosis. *American journal of medical genetics*. 2002;112(1):1-5.
78. Stickens D, Zak BM, Rougier N, Esko JD, Werb Z. Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. *Development*. 2005;132(22):5055-68.
79. Jones KB, Piombo V, Searby C, Kurriger G, Yang B, Grabellus F, et al. A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of Ext1 in chondrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(5):2054-9.
80. Matsumoto K, Irie F, Mackem S, Yamaguchi Y. A mouse model of chondrocyte-specific somatic mutation reveals a role for Ext1 loss of heterozygosity in multiple hereditary exostoses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(24):10932-7.
81. Sgariglia F, Candela ME, Huegel J, Jacenko O, Koyama E, Yamaguchi Y, et al. Epiphyseal abnormalities, trabecular bone loss and articular chondrocyte hypertrophy develop in the long bones of postnatal Ext1-deficient mice. *Bone*. 2013;57(1):220-31.
82. Alvarez C, Tredwell S, De Vera M, Hayden M. The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clinical genetics*. 2006;70(2):122-30.
83. Jager M, Westhoff B, Portier S, Leube B, Hardt K, Royer-Pokora B, et al. Clinical outcome and genotype in patients with hereditary multiple exostoses. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2007;25(12):1541-51.
84. Heinritz W, Huffmeier U, Strenge S, Mitterski B, Zweier C, Leinung S, et al. New mutations of EXT1 and EXT2 genes in German patients with Multiple Osteochondromas. *Annals of human genetics*. 2009;73(Pt 3):283-91.
85. Busse-Wicher M, Wicher KB, Kusche-Gullberg M. The exostosin family: proteins with many functions. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014;35:25-33.
86. Pedrini E, Jennes I, Tremosini M, Milanese A, Mordenti M, Parra A, et al. Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2011;93(24):2294-302.
87. Alvarez CM, De Vera MA, Heslip TR, Casey B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clinical orthopaedics and related research*. 2007;462:73-9.
88. Tiet TD, Hopyan S, Nadesan P, Gokgoz N, Poon R, Lin AC, et al. Constitutive hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation. *The American journal of pathology*. 2006;168(1):321-30.
89. Zou L, Zou X, Li H, Mygind T, Zeng Y, Lu N, et al. Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2006;585:431-41.
90. Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, et al. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(41):14665-70.

91. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Current opinion in cell biology*. 2001;13(6):721-7.
92. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(32):11325-30.
93. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2010;18(18):6613-24.
94. Gupta S, Takebe N, Lorusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2010;2(4):237-50.
95. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993;75(7):1401-16.
96. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993;75(7):1417-30.
97. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 1993;75(7):1431-44.
98. Chang DT, Lopez A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, et al. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*. 1994;120(11):3339-53.
99. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*. 2001;15(23):3059-87.
100. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(4):306-17.
101. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A. Interaction of *Ihh* and *BMP/Noggin* signaling during cartilage differentiation. *Developmental biology*. 1999;209(2):239-53.
102. Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. Patterns of expression of murine *Vgr-1* and *BMP-2a* RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes & development*. 1989;3(11):1657-68.
103. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and *Bmp* genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Developmental biology*. 1995;172(1):126-38.
104. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423(6937):332-6.
105. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, *Ihh/Pthlh*, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Developmental cell*. 2002;3(3):439-49.
106. The I, Bellaiche Y, Perrimon N. Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Molecular cell*. 1999;4(4):633-9.
107. Dasgupta U, Dixit BL, Rusch M, Selleck S, The I. Functional conservation of the human *EXT1* tumor suppressor gene and its *Drosophila* homolog tout velu. *Development genes and evolution*. 2007;217(8):555-61.
108. Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:435-71.

109. Jorpes JE, Gardell S. On heparin monosulfuric acid. *The Journal of biological chemistry*. 1948;176(1):267-76.
110. Feta A, Do AT, Rentzsch F, Technau U, Kusche-Gullberg M. Molecular analysis of heparan sulfate biosynthetic enzyme machinery and characterization of heparan sulfate structure in *Nematostella vectensis*. *The Biochemical journal*. 2009;419(3):585-93.
111. Medeiros GF, Mendes A, Castro RA, Bau EC, Nader HB, Dietrich CP. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1475(3):287-94.
112. Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(2):169-73.
113. Gallagher JT. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(3):357-61.
114. Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellen L. Regulated diversity of heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(39):24979-82.
115. Lindahl U, Kjellen L. Pathophysiology of heparan sulphate: many diseases, few drugs. *Journal of internal medicine*. 2013;273(6):555-71.
116. Gallagher J. Fell-Muir Lecture: Heparan sulphate and the art of cell regulation: a polymer chain conducts the protein orchestra. *International journal of experimental pathology*. 2015;96(4):203-31.
117. Sugahara K, Kitagawa H. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB life*. 2002;54(4):163-75.
118. Hacker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(7):530-41.
119. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:729-77.
120. Bulow HE, Hobert O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006;22:375-407.
121. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *The Biochemical journal*. 1997;327 (Pt 1):1-16.
122. Farach-Carson MC, Warren CR, Harrington DA, Carson DD. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014;34:64-79.
123. Handler M, Yurchenco PD, Iozzo RV. Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1997;210(2):130-45.
124. Barik A, Zhang B, Sohal GS, Xiong WC, Mei L. Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Developmental neurobiology*. 2014;74(8):828-38.
125. Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(4):295-308.
126. Seppinen L, Pihlajaniemi T. The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2011;30(2):83-92.

127. Kitagawa H, Shimakawa H, Sugahara K. The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(20):13933-7.
128. Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, et al. Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(13):7176-81.
129. Okada M, Nadanaka S, Shoji N, Tamura J, Kitagawa H. Biosynthesis of heparan sulfate in EXT1-deficient cells. *The Biochemical journal*. 2010;428(3):463-71.
130. Kusche-Gullberg M, Kjellen L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Current opinion in structural biology*. 2003;13(5):605-11.
131. Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CP, Jr. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science*. 2001;293(5535):1663-6.
132. Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49175-85.
133. Yasuda T, Mundy C, Kinumatsu T, Shibukawa Y, Shibutani T, Grobe K, et al. Sulfotransferase Ndst1 is needed for mandibular and TMJ development. *Journal of dental research*. 2010;89(10):1111-6.
134. Ai X, Kitazawa T, Do AT, Kusche-Gullberg M, Labosky PA, Emerson CP, Jr. SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development*. 2007;134(18):3327-38.
135. Fux L, Ilan N, Sanderson RD, Vlodevsky I. Heparanase: busy at the cell surface. *Trends in biochemical sciences*. 2009;34(10):511-9.
136. Li JP, Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *International review of cell and molecular biology*. 2016;325:215-73.
137. Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Rosen SD. Measuring the activities of the Sulf1s: two novel heparin/heparan sulfate endosulfatases. *Methods in enzymology*. 2006;416:243-53.
138. Freeman SD, Moore WM, Guiral EC, Holme AD, Turnbull JE, Pownall ME. Extracellular regulation of developmental cell signaling by XtSulf1. *Developmental biology*. 2008;320(2):436-45.
139. Stoolmiller AC, Horwitz AL, Dorfman A. Biosynthesis of the chondroitin sulfate proteoglycan. Purification and properties of xylosyltransferase. *The Journal of biological chemistry*. 1972;247(11):3525-32.
140. Campbell P, Jacobsson I, Benzing-Purdie L, Roden L, Fessler JH. Silk--a new substrate for UDP-d-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *Analytical biochemistry*. 1984;137(2):505-16.
141. Gotting C, Kuhn J, Zahn R, Brinkmann T, Kleesiek K. Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *Journal of molecular biology*. 2000;304(4):517-28.

142. Condac E, Silasi-Mansat R, Kosanke S, Schoeb T, Towner R, Lupu F, et al. Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(22):9416-21.
143. Munns CF, Fahiminiya S, Poudel N, Munteanu MC, Majewski J, Sillence DO, et al. Homozygosity for frameshift mutations in XYLT2 result in a spondylo-ocular syndrome with bone fragility, cataracts, and hearing defects. *American journal of human genetics*. 2015;96(6):971-8.
144. Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feysot C, Leroy JG, et al. XYLT1 mutations in Desbuquois dysplasia type 2. *American journal of human genetics*. 2014;94(3):405-14.
145. van Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knegt L, Cobben JM. Complete and partial XYLT1 deletion in a patient with neonatal short limb skeletal dysplasia. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;170A(2):510-4.
146. Faiyaz-Ul-Haque M, Zaidi SH, Al-Ali M, Al-Mureikhi MS, Kennedy S, Al-Thani G, et al. A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type. *American journal of medical genetics Part A*. 2004;128A(1):39-45.
147. Cartault F, Munier P, Jacquemont ML, Vellayoudom J, Doray B, Payet C, et al. Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: homozygous p.R270C mutation with founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*. 2015;23(1):49-53.
148. Sellars EA, Bosanko KA, Lepard T, Garnica A, Schaefer GB. A newborn with complex skeletal abnormalities, joint contractures, and bilateral corneal clouding with sclerocornea. *Seminars in pediatric neurology*. 2014;21(2):84-7.
149. Jones KL, Schwarze U, Adam MP, Byers PH, Mefford HC. A homozygous B3GAT3 mutation causes a severe syndrome with multiple fractures, expanding the phenotype of linkeropathy syndromes. *American journal of medical genetics Part A*. 2015;167A(11):2691-6.
150. von Oettingen JE, Tan WH, Dauber A. Skeletal dysplasia, global developmental delay, and multiple congenital anomalies in a 5-year-old boy-report of the second family with B3GAT3 mutation and expansion of the phenotype. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164A(6):1580-6.
151. Nadanaka S, Zhou S, Kagiya S, Shoji N, Sugahara K, Sugihara K, et al. EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(13):9321-33.
152. Senay C, Lind T, Muguruma K, Tone Y, Kitagawa H, Sugahara K, et al. The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO reports*. 2000;1(3):282-6.
153. McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, Tufaro F. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(2):668-73.

154. Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, et al. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Developmental biology*. 2000;224(2):299-311.
155. Wei Z, Swiedler SJ, Ishihara M, Orellana A, Hirschberg CB. A single protein catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation during the biosynthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(9):3885-8.
156. Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, van Kuppevelt T, Ellin F, Eriksson I, et al. Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(34):25926-30.
157. Reuter MS, Musante L, Hu H, Diederich S, Sticht H, Ekici AB, et al. NDST1 missense mutations in autosomal recessive intellectual disability. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164A(11):2753-63.
158. Silbert JE. Biosynthesis of heparin. IV. N-Deacetylation of a precursor glycosaminoglycan. *The Journal of biological chemistry*. 1967;242(21):5153-7.
159. Silbert JE. Biosynthesis of heparin. 3. Formation of a sulfated glycosaminoglycan with a microsomal preparation from mast cell tumors. *The Journal of biological chemistry*. 1967;242(21):5146-52.
160. Riesenfeld J, Hozok M, Lindahl U. Biosynthesis of heparan sulfate in rat liver. Characterization of polysaccharides obtained with intact cells and with a cell-free system. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(12):7050-5.
161. Pallerla SR, Lawrence R, Lewejohann L, Pan Y, Fischer T, Schlomann U, et al. Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(24):16885-94.
162. Aikawa J, Grobe K, Tsujimoto M, Esko JD. Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(8):5876-82.
163. Li JP, Gong F, Hagner-McWhirter A, Forsberg E, Abrink M, Kisilevsky R, et al. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(31):28363-6.
164. Kobayashi M, Habuchi H, Yoneda M, Habuchi O, Kimata K. Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21):13980-5.
165. Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, Wilson VA. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes & development*. 1998;12(12):1894-906.
166. Merry CL, Bullock SL, Swan DC, Backen AC, Lyon M, Beddington RS, et al. The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st^{-/-} mutant mouse. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(38):35429-34.
167. Habuchi H, Nagai N, Sugaya N, Atsumi F, Stevens RL, Kimata K. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(21):15578-88.
168. Smeds E, Habuchi H, Do AT, Hjertson E, Grundberg H, Kimata K, et al. Substrate specificities of mouse heparan sulphate glucosaminyl 6-O-sulphotransferases. *The Biochemical journal*. 2003;372(Pt 2):371-80.

169. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(28):11524-9.
170. HajMohammadi S, Enjyoji K, Princivalle M, Christi P, Lech M, Beeler D, et al. Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(7):989-99.
171. Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, Thompson CA, Vlodavsky I, Au JL, et al. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *The FEBS journal*. 2013;280(10):2294-306.
172. Mao Y, Huang Y, Buczek-Thomas JA, Ethen CM, Nugent MA, Wu ZL, et al. A liquid chromatography-mass spectrometry-based approach to characterize the substrate specificity of mammalian heparanase. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(49):34141-51.
173. Pikas DS, Li JP, Vlodavsky I, Lindahl U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(30):18770-7.
174. Trebicz-Geffen M, Robinson D, Evron Z, Glaser T, Fridkin M, Kollander Y, et al. The molecular and cellular basis of exostosis formation in hereditary multiple exostoses. *International journal of experimental pathology*. 2008;89(5):321-31.
175. Yang L, Hui WS, Chan WC, Ng VC, Yam TH, Leung HC, et al. A splice-site mutation leads to haploinsufficiency of EXT2 mRNA for a dominant trait in a large family with multiple osteochondromas. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28(11):1522-30.
176. Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(12):2018-39.
177. Brown AJ, Alicknavitch M, D'Souza SS, Daikoku T, Kirn-Safran CB, Marchetti D, et al. Heparanase expression and activity influences chondrogenic and osteogenic processes during endochondral bone formation. *Bone*. 2008;43(4):689-99.
178. Vlodavsky I, Beckhove P, Lerner I, Pisano C, Meirovitz A, Ilan N, et al. Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2012;5(2):115-32.
179. Umulis D, O'Connor MB, Blair SS. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development*. 2009;136(22):3715-28.
180. Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Developmental cell*. 2004;6(6):801-13.
181. Hilton MJ, Gutierrez L, Martinez DA, Wells DE. EXT1 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone development. *Bone*. 2005;36(3):379-86.
182. Mizumoto S, Ikegawa S, Sugahara K. Human genetic disorders caused by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(16):10953-61.

183. Kitsoulis P, Galani V, Stefanaki K, Paraskevas G, Karatzias G, Agnantis NJ, et al. Osteochondromas: review of the clinical, radiological and pathological features. *In vivo*. 2008;22(5):633-46.
184. Inubushi T, Nozawa S, Matsumoto K, Irie F, Yamaguchi Y. Aberrant perichondrial BMP signaling mediates multiple osteochondromagenesis in mice. *JCI insight*. 2017;2(15).
185. Sinha S, Mundy C, Bechtold T, Sgariglia F, Ibrahim MM, Billings PC, et al. Unsuspected osteochondroma-like outgrowths in the cranial base of Hereditary Multiple Exostoses patients and modeling and treatment with a BMP antagonist in mice. *PLoS genetics*. 2017;13(4):e1006742.
186. Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu JF, Lai CS, et al. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(15):4388-92.
187. Hind M, Stinchcombe S. Palovarotene, a novel retinoic acid receptor gamma agonist for the treatment of emphysema. *Current opinion in investigational drugs*. 2009;10(11):1243-50.
188. Stolk J, Stockley RA, Stoel BC, Cooper BG, Piitulainen E, Seersholm N, et al. Randomised controlled trial for emphysema with a selective agonist of the gamma-type retinoic acid receptor. *The European respiratory journal*. 2012;40(2):306-12.
189. Shimono K, Tung WE, Macolino C, Chi AH, Didizian JH, Mundy C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-gamma agonists. *Nature medicine*. 2011;17(4):454-60.
190. Shore EM, Kaplan FS. Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Bone*. 2008;43(3):427-33.
191. Deirmengian GK, Hebela NM, O'Connell M, Glaser DL, Shore EM, Kaplan FS. Proximal tibial osteochondromas in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2008;90(2):366-74.
192. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:80.
193. Sinha S, Uchibe K, Usami Y, Pacifici M, Iwamoto M. Effectiveness and mode of action of a combination therapy for heterotopic ossification with a retinoid agonist and an anti-inflammatory agent. *Bone*. 2016;90:59-68.
194. Pavey GJ, Qureshi AT, Tomasino AM, Honnold CL, Bishop DK, Agarwal S, et al. Targeted stimulation of retinoic acid receptor-gamma mitigates the formation of heterotopic ossification in an established blast-related traumatic injury model. *Bone*. 2016;90:159-67.
195. Inubushi T, Lemire I, Irie F, Yamaguchi Y. Palovarotene Inhibits Osteochondroma Formation in a Mouse Model of Multiple Hereditary Exostoses. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2018;33(4):658-66.
196. Pedrini E, De Luca A, Valente EM, Maini V, Capponcelli S, Mordenti M, et al. Novel EXT1 and EXT2 mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas. *Human mutation*. 2005;26(3):280.
197. Raskind WH, Conrad EU, 3rd, Matsushita M, Wijsman EM, Wells DE, Chapman N, et al. Evaluation of locus heterogeneity and EXT1 mutations in 34 families with hereditary multiple exostoses. *Human mutation*. 1998;11(3):231-9.

EKLER

Ek 1. Aydınlatılmış Onam Formu



AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

- a. **Araştırmanın Adı:** “Klinik ve radyolojik olarak Hereditör Multiple Ekzostoz tanısı alan olguların EXT1 ve EXT2 Gen mutasyonları açısından değerlendirilmesi”
- b. **Araştırmanın İçeriği:** Hereditör multipl ekzostozis (HME) veya diğer adı ile multiple osteokondroma, birden fazla iyi huylu kıkırdak tümörünün (ekzostoz) varlığı ile karakterize, yaklaşık 1/ 50.000 insidansı olan otozomal dominant bir kas-iskelet bozukluğudur ve kemik tümörlerinin en sık görülen nedenlerinden biridir.

HME heterojen genetik yapıdadır ve şimdiye kadar 3 adet gen tespit edilmiştir: *EXT1* kromozom 8q23-24 üzerinde heterozigot işlev kaybı mutasyonlarıyla ilişkilidir, *EXT2*, 11p11-12 üzerinde heparan sülfatın biyosentezinden sorumlu Golgi ilişkili glikoziltransferazları kodlamaktadır. Ancak HME olgularının çoğundan *EXT1* ve *EXT2* genleri sorumludur ve araştırmamızda bu genlerin saptanması hedeflenmiştir.

- c. **Araştırmanın Amacı:** Bulunacak sonuçlara göre mutasyonların oranları belirlenecek, doğası, sıklığı ve dağılımını incelenecektir, Çalışmamızda Multiple ekzostozisli hastalarımızda *EXT1* ve *EXT2* gen mutasyonlarının saptanması ve genotip ve fenotip ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız, bu konuda Ülkemizde yapılan ilk çalışma olacaktır.

d. Araştırmanın Nedeni:

- i. () Bilimsel araştırma
- ii. (x) Tez çalışması

e. Araştırmanın Öngörülen Süresi:1 YIL

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 25

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Periferik kan örneği alınırken yeterli kanı alırken zorluk yaşanması,iğnenin girdiği yerde yerinde geçici ağrı,kızarıklık olması dışında beklenen ciddi bir etki yoktur.

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

.....
.....
.....
.....

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar: Mutasyon gösterilmesi hasta ve ailesinde tanı takibin daha kolay yapılmasını ve genetik danışma imkanı sağlayacaktır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Dr.Püren Özüdoğru Telefon: 0-242-2496520

5. Zararların Karşılanması:Çalışmada ağır bir komplikasyon gelişmesi beklenmemekle birlikte, kan alım yerinde uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek kızarıklık,

morarma, ağrı gibi komplikasyonların Dr.Püren Özudoğru tarafından yerinde ve zamanında tıbbi m¼dahale yapılarak giderileceği bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:Araştırma kapsamındaki b¼t¼n işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal g¼venlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gön¼ll¼l¼k, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

a. Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gön¼ll¼ olarak katılıyorum.

b. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

c. Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

d. Çalışmanın y¼r¼t¼c¼s¼ olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosed¼r¼ne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

8. Gizlilik:

Çalışma s¼resince tutulan b¼t¼n kayıtlar ve dosya bilgileri gerektiğinde, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi, çalışma ile ilgili hekimlerinin bilgisi olacaktır. Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu t¼r durumlarda çocuğumun kimliği kesin olarak gizli tutulacaktır.

9. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gön¼ll¼ye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri g¼steren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi

anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

Ek2:

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
2018

KARAR

| | | |
|---------------------------------------|--|--|
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu |
| | AÇIK ADRESİ: | Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA |
| | TELEFON | 0 (242) 249 69 54 |
| | FAKS | 0 (242) 249 69 03 |
| | E-POSTA | etik@akdeniz.edu.tr |
| | ETİK KURUL KODU | 2012-KAEK-20 |
| PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI | Prof.Dr.Ercan MIHÇI | |
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Hereditör Multiple Ekzostoza Tanısı Alan Olguların EXT1 ve EXT2 Gen Mutasyonları Açısından Değerlendirilmesi | |
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No:176 | Tarih: 07.03.2018 |
| | Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın yapılmasında <u>bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına</u> oy birliği ile karar verilmiştir. | |

Yrd.Doç.Dr.M Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Selahattin KÜMRU
Üye

Prof.Dr.Oğuz DURUSUN
Üye

Doç.Dr.Banu NUR
Üye (Yardımcı Araştırmacı)

Prof.Dr.Murat CANPOLAT
Üye

Prof.Dr.Bilge KARSLI
Üye

Doç.Dr.Culsam Özge BAYSAL
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mehtap TÜRKAY
Üye

Prof.Dr. Arda TAŞATARGİL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Dilara İNAN
Üye

Prof.Dr.Veli YAZISIZ
Üye

Doç.Dr.Dijle KIYMEN KORGUN
Üye

Dr.Ünal HÜLÜR
Üye (İzinli)

Turgut ALTUN
Üye (İzinli)

Av.Mustafa AÇIKEL
Üye (İzinli)