

SHAHRAASHOUB SHARIFI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020



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

(DOKTORA TEZİ)

**NÖROFİBROMATOZİS TİP1 OLGULARINDA NF1 GEN
MUTASYONLARININ YENİ NESİL DİZİLEME
TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**

SHAHRASHOUB SHARİFİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. KIVANÇ ÇEFLE**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

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

shahrashtaub sharifi


İTHAF

Hayatımın her aşamasında sevgisini, desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan Doç. Dr. Ali NAZEMİ'ye ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesi sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni bilimsel anlamda yönlendiren, kendisi ile çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE'ye

Doktora eğitimimde büyük katkısı olan, bu çalışmanın gerçekleşmesinde beni her zaman destekleyen, İç Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı sevgili Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ'a

Kendisini tanımaktan onur duyduğum, önerileri ve rehberliği ile yolumu aydınlatan sevgili Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK'e

Tez aşamasında gerekli vaka grubunun oluşturulmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nerses BEBEK, Uzman. Dr. Mustafa SEÇKİN, Uzman. Dr. Ferda USLU'ya

Tez çalışmam sırasında bilimsel ve manevi desteği için sevgili arkadaşım Dr. Çağrı GÜLEÇ, Dr. İlknur SÜER, Uzm. Dr. Tuğba KALAYCI, Dr. Murat KAYA, Uzm. Bio. Adam Najafli' ya

Tez sürecinde beni her zaman motive eden en yakın dostum Dr. Somayyeh Heidargholizadeh ve saygı değer Prof. Dr. Turgut ULUTİN 'e

Doktora sürecinde yanımda olan tüm kıymetli hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve Tüm İ.T.F iç Hastalıkları ABD Tıbbi Genetik Bilim Dalı ailesine, İ.T.F Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalındaki sevgili hocalarım ve kıymetli arkadaşlarıma ,

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana her anlamda destek olan, en değerli varlığım aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-28151

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVI
ÖZET	XXI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nörofibromatozis Tip 1 (NF1).....	3
2.2. NF1 'in Moleküler Genetiği	4
2.2.1. <i>NF1</i> Geninin Tanımlanması.....	4
2.2.2. Alternatif Kırılma.....	5
2.2.2.1. Tip 1 nörofibromin.....	5
2.2.2.2. Tip 2 nörofibromin.....	5
2.2.2.3. Üçüncü nörofibromin izoformu	5
2.2.2.4. Diğer nörofibromin izoformları	6
2.2.3. Gömülü Genler.....	6
2.2.3.1. EV12A And EV12B.....	6
2.2.3.2. OMG	6
2.2.4. Psödogen Benzeri Diziler.....	7
2.3. Nörofibromin	7
2.3.1. NF1 Gen Ekspresyonu	7
2.3.1.1. NF1 Geninin cDNA Dizisi.....	7
2.3.1.2. Neurofibrominin Dokulardaki İfade Düzeyi.....	7
2.3.2. Nörofibromin Ras GAP Fonksiyonu.....	8
2.3.2.1. RAS Aktivasyon Mekanizması	8
2.3.2.2. RAS Mutasyonları Ve Kanser İlişkisi.....	9
2.4. NF1 'in tanı kriterleri ve klinik özellikleri.....	10

2.4.1. Klinik Özellikler	10
2.4.1.1. Deri bulguları	10
2.4.1.2. Café au lait lekeler	11
2.4.1.3. Çiller.....	11
2.4.1.4. Nörofibromlar	12
2.4.1.5. Pleksiform nörofibromlar (PNF).....	13
2.4.1.6. Nevus anemikus	14
2.4.1.7. Jüvenil ksantogranülom (JXG)	14
2.4.1.8. Glomus tümörleri	15
2.4.2. Deri Dışı Bulgular.....	16
2.4.2.1. Göz bulguları.....	16
2.4.2.2. Nörolojik Bulgular	16
2.4.2.3. İskelet Sistemi Bulguları	17
2.4.2.4. Kardiyovasküler Sistem Bulguları	17
2.4.2.5. Solunum Sistemi Bulguları	18
2.4.2.6. Gastrointestinal Sistemi Bulguları	18
2.4.3. NF1 İle İlişkili Tümörler.....	18
2.5. NF1 ilişkili sendromlar	19
2.5.1. NF1 in değişken formları	19
2.5.2. Rasopatiler	20
2.6. Mutasyon tespit teknikleri.....	22
2.6.1. Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) (Multiple Ligation - dependent Probe Amplification)	23
2.6.2. array-CGH.....	23
2.6.3. SangerDizileme	24
2.6.4. Yeni Nesil Teknolojiler (Next Generation Technologies).....	25
2.6.4.1. Yeni Nesil Dizileme	25
2.6.4.2. YND Teknolojisindeki Yeni Gelişmeler.....	26
2.6.4.3. Ion Torrent Platformu	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Araştırma Grubunun Oluşturulması.....	27
3.2. Yöntemler	27
3.2.1. Hastaların klinik Değerlendirmeleri	27

3.2.2. Moleküler Yöntemler	27
3.2.2.1. DNA Eldesi	27
3.2.2.2. DNA Kalitesinin Değerlendirilmesi, Seyreltmesi Ve Ölçümü	29
3.2.2.3. YND Yöntemi Ile <i>NF1</i> Gen Analizi	29
3.2.2.4. Sanger Dizileme Çalışması	39
3.2.2.5. MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	42
3.2.2.6. array-CGH Çalışması	44
4. BULGULAR.....	48
4.1. Aile (NF1-1):	59
4.1.1. Aile (NF1-1):.....	59
4.2. Aile (NF1-2) :	60
4.2.1. Aile (NF1-2) :	61
4.3. Aile (NF1-3):	61
4.3.1. Aile (NF1-3):.....	61
4.4. Aile (NF1-4):	63
4.4.1. Aile (NF1-4):.....	64
4.5. Aile (NF1-5):	65
4.5.1. Aile (NF1-5):.....	65
4.6. Aile (NF1-6):	67
4.6.1. Aile (NF1-6):.....	67
4.7. Aile (NF1-7):	69
4.7.1. Aile (NF1-7):.....	69
4.8. Aile (NF1-8):	71
4.8.1. Aile (NF1-8):.....	71
4.9. Aile (NF1-9):	71
4.9.1. Aile (NF1-9):.....	71
4.10. Aile (NF1-10):	73
4.10.1. Aile (NF1-10):.....	73
4.11. Aile (NF1-11):	75
4.11.1. Aile (NF1-11):.....	75
4.12. Aile (NF1-12):	77
4.12.1. Aile (NF1-12):.....	77
4.13. Aile (NF1-13):	78

4.13.1. Aile (NF1-13):.....	79
4.14. Aile (NF1-14):	79
4.14.1. Aile (NF1-14):.....	79
4.15. Aile (NF1-15):	80
4.15.1. Aile (NF1-15):.....	80
4.16. Aile (NF1-16):	81
4.16.1. Aile (NF1-16):	81
4.17. Aile (NF1-17):	81
4.17.1. Aile (NF1-17):.....	81
4.18. Aile (NF1-18):	82
4.18.1. Aile (NF1-18):.....	82
4.19. Aile (NF1-19):	83
4.19.1. Aile (NF1-19):.....	83
4.20. Aile (NF1-20):	85
4.20.1. Aile (NF1-20):.....	85
4.21. Aile (NF1-21):	85
4.21.1. Aile (NF1-21):.....	85
4.22. Aile (NF1-22):	86
4.22.1. Olgu (NF1-22):	86
4.23. Aile (NF1-23):	87
4.23.1. Aile (NF1-23):.....	87
4.24. Aile (NF1-24):	89
4.24.1. Aile (NF1-24):.....	89
4.25. Aile (NF1-25):	90
4.25.1. Aile (NF1-25):.....	90
4.26. Aile (NF1-26):	91
4.26.1. Aile (NF1-26):.....	91
4.27. Aile (NF1-27):	91
4.27.1. Aile (NF1-27):.....	92
5. TARTIŞMA	94
KAYNAKLAR	114
FORMLAR	138
ETİK KURUL KARARI	147

PATENT HAKKI İZNİ	148
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	149
ÖZGEÇMİŞ	150



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 NF1 tanı kriterleri (NIH, 1988).	10
Tablo 2.2 NF1 ile ilişkili benign ve malign tümörlerde somatik mutasyonlar.	19
Tablo 2.3 Rasopatiler; klinik bulguları ve ilişkili genler	20
Tablo 2.4 Tablo 2.4. Ras yolağı ile ilişkili genler/ kromozomal lokasyonları ve fonksiyonları	22
Tablo 3.1 ROCHE Kit İle Dna İzolasyonu.	28
Tablo 3.2 Farklı primer havuzu (2X) için hazırlanan karışım.	30
Tablo 3.3 Kütüphane PZR için hazırlanan karışım.	30
Tablo 3.4 Hedef bölge amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.	31
Tablo 3.5 Primer Dizilerinin Kısmen Kesilme aşamasında kullanılan termal döngü programı.	31
Tablo 3.6 Barkod-adaptör karışımı.	32
Tablo 3.7 Barkod-adaptör ligasyon karışımı ve termal döngü programı.	32
Tablo 3.8 Kütüphanenin amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.	34
Tablo 3.9 Kütüphane seyreltilmesi.	36
Tablo 3.10 Hazırlanan emPZR çözeltisi.	36
Tablo 3.11 Zenginleştirme aşamasındaki yapılan işlemler.	38
Tablo 3.12 Dizileme planı.	38
Tablo 3.13 Hedef Bölgelerin Çoğaltılmasında Kullanılan Termal Döngü Programı.	40
Tablo 3.14 Her bir hasta için hazırlanan Digestion mix karışımı.	44
Tablo 3.15 Digestion mix içeren tüplere uygulanan PZR programı.	45
Tablo 3.16 Her bir Cy3 (kontrol) için hazırlanan Labellin gmix karışımı.	45
Tablo 3.17 Her bir Cy5 (hasta) için hazırlanan Labellin gmix karışımı.	45
Tablo 3.18 Digestion mix içeren tüplere uygulanan PZR programı.	46
Tablo 4.1 Çalışma grubunda değerlendirilen olgulardaki klinik bulgular.	49
Tablo 4.2 Çalışma grubunda değerlendirilen olgulardaki moleküler bulgular.	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Ras aktivasyon/inaktivasyon döngüsü (Le LQ ve ark, 2007'den değiştirerek alınmış).	9
Şekil 2.2. Café au lait lekeleri(İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).	11
Şekil 2.3. Çillenme (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).	12
Şekil 2.4. Nörofibromlar (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).	12
Şekil 2.5. PNF (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).	13
Şekil 2.6. Nevus anemikus (https://www.dermatologyadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/).....	14
Şekil 2.7. Juvenil ksantogranülom (https://www.aad.org/dw/dw-insights-and-inquiries/dermatopathology/neurofibromatosis-type-1-juvenile-xanthogranuloma-and-leukemia-wasting-a-good-worry).	15
Şekil 2.8. Glomus tümörü(https://dermnetnz.org/topics/glomus-tumour/).	15
Şekil 2.9. Lisch nodülleri (Abaloun Y ve ark, 2017).....	16
Şekil 4.1. Aile (NF1-1). Aile ağacı, Moleküler analiz yapılan olgular, İndeks (III-2)'ye ait görüntüler, İndeks (III-5)'e ait röntgen görüntüleri.	60
Şekil 4.2. Aile (NF1-1). İndeks(II-10)'a ait YND ile saptanan varyasyon (NF1: c.5294C>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve sanger dizileme ile konfirmasyonu, aile segregasyon analizi; (II-10), (III-1), (III-2), (III-3) ve (III-4)'e ait elektroferogram.....	60
Şekil 4.3. Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	61
Şekil 4.4. Aile (NF1-3). Aile ağacı, Moleküler analiz yapılan olgular.....	62
Şekil 4.5. Aile (NF1-3), İndeks (III-2)'de YND ile herhangi bir varyant saptanmadı, IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile heterozigot tüm gen delesyonu sonucu) analiz görüntüsü. Olgu III-2'ye ait 17. Kromozomdaki delesyon gösteren a-CGH görüntüsü.	63
Şekil 4.6. Aile (NF1-4) . Aile ağacı. moleküler analiz yapılan olgular, olgu (II-11) ve (III-1) ve (III-4) 'e ait görüntüler.	64

Şekil 4.7. Aile (NF1-4). İndeks(II-11)'e ait YND ile saptanan varyasyonun (NF1: C.4662-2 A>C) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile doğrulaması, aile segregasyon analizi ve (III-1)'e ait elektroferogram görüntüsü. ..	65
Şekil 4.8. Aile (NF1-5). Aile ağacı. moleküler analiz yapılan olgular. Olgular (IV-8) ve (V-1)' e ait görüntüler.....	66
Şekil 4.9. Aile (NF1-5). İndeks (V-1)'e ait YND ile saptanan varyasyon (NF1: c.1260+1G>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile doğrulaması, aile segregasyon analizi; (IV-8)'ye ait elektroferogram görüntüsü.	67
Şekil 4.10. Aile (NF1-6) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	68
Şekil 4.11. Aile (NF1-6). İndeks IV-4'e ait YND ile saptanan varyantın(NF1: c.7684_7685delAG) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile doğrulaması, ailesegregasyon analizi; (IV-3) ve (III -3)'e ait elektroferogram görüntüsü.	69
Şekil 4.12. Aile (NF1-7). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.Olgular(II-4)'e ait görüntüler.....	70
Şekil 4.13. Aile (NF1-7). İndeks II-4'e ait YND ile saptanan varyasyon (NF1: c.4931_4931delT) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile doğrulaması, aile segregasyon analizi; (III-1) ve (III-3)'e ait elektroferogram görüntüsü.	70
Şekil 4.14. Aile (NF1-8).Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	71
Şekil 4.15. Aile (NF1-9). Aile ağacı. moleküler analiz yapılan olgular.	72
Şekil 4.16. Aile (NF1-9). İndeks III-3'e ait YND ile saptanan varyantın (NF1: c.1555C>T) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile doğrulaması, aile segregasyon analizi; (IV-1)'e ait elektroferogram görüntüsü.....	72
Şekil 4.17. Aile (NF1-10) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	73
Şekil 4.18. Aile (NF1-10). İndeks (II-2)'de YND ile herhangi bir varyant saptanmadı, IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü. İndeks II-2'e ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile normal sonuç) analiz görüntüleri.....	74
Şekil 4.19. Aile (NF1-11). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.Olgular (III-4), (IV-3) ve (V-1)'e ait görüntüler.....	76
Şekil 4.20. Aile (NF1-11). İndeks (III-4)'de YND ile herhangi bir variant saptanmadı. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile heterozigot tüm gen delesyonu	

sonuç) analiz görüntüleri. Olgu III-4'e ait 17. kromozomdaki delesyonu gösteren a-CGH görüntüsü.	77
Şekil 4.21. Aile (NF1-12) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	78
Şekil 4.22. Aile (NF1-12).İndeks(III-1)'de YND ile herhangi bir variant saptanmadı. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile normal sonuç) analiz görüntüleri.	78
Şekil 4.23. Aile (NF1-13) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	79
Şekil 4.24. Aile (NF1-14).Ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.	80
Şekil 4.25. Aile (NF1-15) . Aile ağacı. : Moleküler analiz yapılan olgular.	80
Şekil 4.26 Aile (NF1-16) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular, olgu (III-4)'e ait görüntüler.....	81
Şekil 4.27. Aile (NF1-17). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	82
Şekil 4.28. Aile (NF1-18).(I) Aile ağacı. : moleküler analiz yapılan olgular.	83
Şekil 4.29. Aile (NF1-19). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	84
Şekil 4.30. Aile (NF1-19). İndeks (III-5)'de YND ile herhangi bir varyant saptanmadı. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile heterozigot tüm gen delesyonu sonucu) analiz görüntüleri.	84
Şekil 4.31. Aile (NF1-20).Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	85
Şekil 4.32. Aile (NF1-21). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	86
Şekil 4.33. Aile (NF1-22). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	86
Şekil 4.34. Aile (NF1-22). İndeks (III-1)'de YND ile saptanan varyantın (NF1:c.2991-1G>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile doğrulaması ve varyanta ait elektroferogram görüntüsü.	87
Şekil 4.35. Aile (NF1-23). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	88
Şekil 4.36. Aile (NF1-23). İndeks (III-1)'de YND ile saptanan varyantın (NF1:c.4486_4487delAA) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile doğrulaması ve varyasyona ait elektroferogram görüntüsü.....	88
Şekil 4.37. Aile (NF1-24). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	89
Şekil 4.38. Aile (NF1-24). İndeks (III-4)'de YND ile saptanan varyantın (NF1: c.2252-1G>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile doğrulaması ve mutasyona ait elektroferogram görüntüsü.	90
Şekil 4.39. Olgu (NF1-25). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.	90

Şekil 4.40. Aile (NF1-25). İndeks (III-6)'de YND ile saptanan varyantın (NF1: c.910C>T) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü.	91
Şekil 4.41. Aile (NF1-26) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	91
Şekil 4.42. Aile (NF1-27). Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.....	92
Şekil 4.43. Aile (NF1-27). İndeks (III-3)'de YND ile saptanan varyantın (NF1: c.407delA) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile konfirmasyonu ve varyasyona ait elektroferogram görüntüsü.	93
Şekil 5.1 Mutasyonların, dimerler olarak işlev gören proteinler üzerindeki potansiyel etkilerinin şematik olarak göstermektedir (Dominant negatif etki) (Frayling ve ark, 2018' den değiştirilerek alınmış).	99



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
A	: Adenine
a-CGH	: Array Comparative Genomic Hybridization
ADAP2	: ARFGAP with dual pleckstrin homology domains 2
ADHD	: Dikkat eksikliği – Hiperaktivite bozukluğu
ATAD5	: ATPase family, aaa domain-containing, member 5
BAM	: Binary Alignment Map
bç	: Baz çifti
C	: Cytosine
CALs	: Cafe au Lait Spots
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
cDNA	: Complementary DNA (tamamlayıcı DNA)
CGH	: Comparative Genomic Hybridization
cm	: Santimetre
CNV	: Copy Number Variation
CNV	: Copy Number Variation (Kopya sayısı değişimi)
COPRS	: coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator
Cp	: Crossing point
Cq	: Quantification cycle
CRLF3	: Cytokine Receptor-Like Factor 3
CSRD	: Cysteine serine rich domain
Ct	: Threshold cycle
CTD	: C terminal domain
Cy3	: Cyanine 3 (Siyanin 3)
Cy5	: Cyanine 5 (Siyanin 5)
dATP	: Deoxyadenosine triphosphate

dCTP	: Deoxycytosine triphosphate
ddNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
dGTP	: Deoxyguanosine triphosphate
DGV	: Database of Genomic Variants
dH ₂ O	: Distile su
dk	: dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dnase	: Deoxyribonuclease
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
dNTP	: dideoksinükleotid
DPRXP4	: divergent-paired related homeobox pseudogene 4
dsDNA	: Double-stranded DNA (çift zincirli DNA)
dTTP	: Deoxythymidine triphosphate
EDTA	: Etilendiamin tetraasidik asit
EVI2A	: Ecotropic Viral Integration Site 2a
EVI2B	: Ecotropic Viral Integration Site 2b
ExAC	:Exome Aggregation Consortium
g	: Gram
G	: Guanine
GAP	: GTPaz aktive edici proteine
GDP	: Guanozin difosfat
GEF	: Guanine nucleotide exchange factor
GİS	: Gastrointestinal sistemi
GİST	: Gastrointestinal stromal tümörü
GRD	: Gap Related Domain
GTP	: Guanozin trifosfat
HGF	: Hepatocyte growth factor
HGMD	:Human Gene Mutation Database (İnsan Mutasyon Veri Bankası)
IGV	:Integrative Genomics Viewer
IQ	: Zeka testi

ISP	: Ion Sphere Particles
JMML	: Jüvenil miyelomonositik lösemi
JXG	: Jüvenil ksantogranülom
kb	: Kilo baz
kDa	: Kilo dalton
L	: Litre
LOC107133515	:smurf2p1-lrrc37bp1 smurf2p1-lrrc37bp1 readthrough transcribed pseudogene
LOC646030	: leucine rich repeat containing 37B pseudogene
LOH	: Heterozigot fonksiyon kaybı (Loss of Heterozygosity)
LRRC37B	: Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 37b
LRRC37B	: leucine rich repeat containing 37B
M	: Molar
Mb	: Megabaz
mg	: Milligram
MgCl ₂	: Magnesium Chloride
MIM	: Mendelian inheritance in man
MIR193A	: MICRO RNA 193A
MIR365B	: microRNA 365b
MIR4724	: microRNA 4724
MIR4725	: microRNA 4725
MIR4733	: microRNA 4733
ml	: Millilitre
MLPA	: Multiple Ligation Dependent Probe Amplification
mM	: Millimolar
MPAK	: Mitojen aktive protein kinaz
MPNST	: Malign periferik sinir kılıfı tümörü (Malignant Peripheral Nerve
Sheath Tumour)	
MR	: Manyetik Rezonans
mRNA	: Messenger RNA
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi

m-TOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NAHR	: Non-allelic homologous recombination
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NF1	: Neurofibromatosis Type 1
NF2	: Neurofibromatosis Type 2
ng	: Nanogram
NIH	: Ulusal sağlık enstitüsü National Institute of Health
nM	: Nanomolar
nmol	: Nanomole
O.D.	: Optik dansite
OD	: Otozomal Dominant
OMG	: Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
pmol	: Picomole
PNF	: Pleksiform nörofibrom
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAB11FIP4	: RAB11FIP4 RAB11 family interacting protein 4
RAS	: Bir proto-onkogen
RasMAPK	: Ras mitogen activated protein kinase
rcf	: Relative Centrifugal Force (Rölatif Santrifüj Gücü)
RNA	: Ribonükleik Asit
Rnase	: Ribonuclease
RNF135	: RING FINGER PROTEIN 135
SD	: Sanger Dizileme
SH3GL1P2 A2 pseudogene 2	: SH3GL1P2 SH3 domain containing GRB2 like 1, endophilin
Sn	: saniye
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polmorfizmi)
SUZ12	: SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit
SUZ12P1	: SUZ12 pseudogene 1
T	: Thymine

TAE	: Tris-Acetic acid-EDTA buffer
TE	: Tris-EDTA
TED	: Tüm Ekzom Dizleme
TEFM	: transcription elongation factor, mitochondrial
TGD	: Tüm Genom Dizileme
Tm	: Melting temperature
Tm	: Temperature of Melting (Erime ısısı)
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TSS	: Torrent Suit Server
U	: Units
USCS	: University of California Santa Cruz
UTP6	: UTP6 small subunit processome component
UTR	: Untranslated Region
VCF	: Variant Call Format
YND	: Yeni Nesil Dizleme

ÖZET

Sharifi. SH. (2020). Nörofibromatozis Tip1 Olgularında NF1 Gen Mutasyonlarının Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Von Recklinghausen hastalığı olarak da bilinen Nörofibromatozis Tip1 (MIM # 162200), etnik ve ırksal kökenden bağımsız, dünya genelinde 3000 ila 4000 kişide 1 prevalansına sahip yaygın bir Ailevi kanser sendromudur. Bu hastalık, kromozom 17q11.2'de lokalize tümör baskılayıcı bir gen olan *NF1* genindeki dominant mutasyonlardan kaynaklanan kalıtsal bir bozukluktur. *NF1* geni, nörofibromin (NM_000267) olarak adlandırılan sitoplazmik bir protein kodlar. Nörofibromin, esas olarak GTPaz aktive edici protein GAP olarak işlev görür ve RAS (rat sarkom proteini) aktivitesini inhibe eder. Yapılan araştırmalar, *NF1* ile ilişkili tümörlerde, nörofibromin ekspresyon kaybının yüksek seviyelerde aktif RAS ile ilişkili olduğunu göstermektedir. NIH tarafından belirlenen *NF1* tanı kriterleri arasında çoklu *cafe-au-lait* lekeleri, iriste *Lisch* nodülleri, aksiller ve inguinal çillenme ve nörofibrom adı verilen benign periferik sinir kılıfı tümörleri, optik gliom, özgün kemik lezyonları ve aile hikayesi bulunmaktadır. *NF1* ile ilişkili diğer klinik komplikasyonlar arasında nörolojik, renal, kardiyovasküler, gastrointestinal, endokrin ve ortopedik tutulum, öğrenme ve entellektüel yetersizlik, dikkat eksikliği ve periferik sinir kılıfı veya merkezi sinir sistemi maligniteleri bulunmaktadır. *NF1* hastalarının yaklaşık dörtte biri önemli morbidite ve mortaliteye neden olan bu klinik komplikasyonlardan birini veya birkaçını göstermektedir. Genel olarak farklı hastalardan elde edilen tümör dokularında saptanan germline ve somatik mutasyonların karakterizasyonu, *NF1* gen mutasyonunun tipi, doğası ve sıklığı hakkında bilgiler sağlamış olsa da, *NF1*'de tümör oluşumunun moleküler mekanizmaları hakkındaki mevcut bilimiz halen sınırlıdır. Bunun yanı sıra birçok sendrom nörofibromatozisi ile ortak klinik bulgular göstermekte ve bu durum özellikle antenatal dönemde kesin tanı açısından zorluklara yol açabilmektedir. Bu nedenle, nörofibromatozis ile benzer sendromların sıklıklarının ve moleküler etiyopatogenezlerinin bilinmesi, prenatal ve postnatal olguların izlemi açısından önem kazanmaktadır. *NF1*'nin klinik heterojenliği, hastalığın tanısında sorumlu *NF1* genin tüm ekzonlarını eş zamanlı dizilenmesini, delesyon/duplikasyon araştırılmasının yapılmasını gerektirmektedir. Çalışmamızda, klinik tanı olarak *NF1* düşünülen olgularda, ilişkili *NF1* geninin tüm ekzonları ve ekzon-intronsınır bölgelerini içeren, tasarlanmış *NF1*gen testi ile YND; Ion Torrent platformunda yapılan araştırmadan elde edilen varyantlar incelendi. Klinik kesin tanıda önemi belirlenen varyantlara özgün Primerler tasarlanarak Sanger dizileme ile doğrulandı, olanaklı olgularda segregasyon analiz sonuçları araştırıldı, herhangi bir varyant ilişkisi saptanmayanlarda yöntemin tasarımı gereği kapsanmayan bölgeleri Sanger dizileme ile incelendi. Sanger dizilemede patojenik varyant saptanmayan olgularda MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi yapıldı. Del/dup analiz sonucu pozitif olgularda array-CGH yöntemi ile *NF1* mikrolelesyonu sendromu araştırıldı. Sonuç olarak toplam 27 ailede klinik kesin tanı olgularda *NF1* geninde tanımlanmış 11 yeni variant ve literatürde bildirilmemiş 11 olası ilişkili variant saptandı ve tanı oranı % 94 olarak belirlendi. Çalışma sonuçlarımızın, Türk toplumunda *NF1* geni mutasyon tipleri ve frekanslarının saptanmasına, taşıyıcı bireyleri belirlenerek iyi ve kötü huylutümörler açısından erken dönemden itibaren takip olanağının sağlanmasına, genetik danışmada, prenatal veya pre-implantasyon öncesi genetik tanıda yardımcı olmasına katkı sağlaması beklenir.

Anahtar Kelimeler: Nörofibromatozis tip1, Yeni Nesil Dizleme, *Ion Torrent*, MLPA, array-CGH, *NF1*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-28151

ABSTRACT

Sharifi. SH. Investigation of NF1 Gene Mutations with Next Generation Sequencing Technology in Neurofibromatosis Type1 Cases. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Doctoral Thesis in Genetics. Istanbul. 2020.

Neurofibromatosis Type 1 (NF1), also known as Von Recklinghausen disease, is a common familial cancer syndrome independent of ethnic and racial origins, It affects approximately 1 in 3000 to 4000 people worldwide. This disease is an inherited disorder caused by dominant mutations in the NF1 gene. The *NF1* gene encodes a cytoplasmic protein called neurofibromin (NM_000267) that is a negative regulator of the RAS pathway. Previous studies have shown increased expression of neurofibromin in NF1-related tumors. The diagnostic criteria for NF1 defined by National Institutes of Health are multiple cafe-au-lait (CAL) spots, benign peripheral nerve sheath tumors (neurofibromas), Lisch nodules, axillary and inguinal freckles, optic glioma, specific bone lesions and family history. Other clinical manifestations associated with NF1 include neurological, renal, cardiovascular, gastrointestinal, endocrine and orthopedic, learning and intellectual disabilities, attention deficit, and peripheral nerve sheath or central nervous system malignancies. About a quarter of NF1 cases eventually develop one or more of these clinical complications that lead to significant morbidity and mortality. Although Characterization of the germline and somatic mutations in tumor tissues provided information about the type, nature and frequency of NF1 gene mutation, information about the molecular mechanisms of the tumor formation is still limited. In addition, some syndromes present clinical findings that overlap with neurofibromatosis, and this can lead to problems in diagnosis, especially in the prenatal period. Therefore, understanding the frequency of molecular etiopathogenesis of neurofibromatosis is important for the follow-up of prenatal and postnatal cases. Given the clinical heterogeneity of NF1, rapid, accurate parallel sequencing of this gene and deletion / duplication analysis (when necessary) is required for proper diagnosis. In this study, we performed sequencing of the *NF1* gene with in-house-designed next generation sequencing (NGS) targeted NF1 gene, using an Ion Torrent platform, covering all exons and exon-intron boundaries in 27 families diagnosed with neurofibromatosis type 1. When sequencing did not yield any pathologic variants, the gene was analysed with MLPA for deletion/duplications. If MLPA showed a deletion, a possible microdeletion involving the NF1 gene was investigated with array-CGH. As a result, we identified 11 previously reported possible related variants and 11 variants that were not previously reported in the literature. Thus the frequency of diagnosis was 94% in this study. The results of our research are expected to contribute to the present knowledge about *NF1* gene mutation types and frequencies in the Turkish population. This will provide follow-up opportunities which will allow early detection of benign and malignant tumors as well as proper genetic counseling including prenatal or pre-implantation genetic diagnosis.

Keywords: Neurofibromatosis type 1, Next Generation Sequencing, *Ion Torrent*, MLPA, array-CGH, NF1

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2018-28151

1. GİRİŞ VE AMAÇ

VonRecklinghause hastalığı olarak da bilinen (MIM # 162200), etnik ve ırksal kökenden bağımsız, dünya genelinde 3000 ila 4000 kişide 1 prevalansına sahip yaygın bir Ailevi kanser sendromudur. Bu hastalık, kromozom 17q11.2'de lokalize tümör baskılayıcı bir gen olan *NF1* genindeki dominant mutasyonlardan kaynaklanan kalıtsal bir bozukluktur. *NF1* geni, nörofibromin (NM_000267) olarak adlandırılan sitoplazmik bir protein kodlar. Bu protein, dokuların çoğunda düşük düzeyde eksprese (/ifade) edilirken, merkezi sinir sisteminde (MSS) en yüksek seviyede eksprese edilmektedir. nörofibromin, esas olarak GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak işlev görür ve RAS (rat sarkom proteini) aktivitesini inhibe eder. Proto-onkogen olarak işlev gören RAS; iç ve dış uyaranlara bağlı olarak, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını, canlılığını sürdürmesini veya ölümünü tetikler. Nörofibrominin GAP ilişkili domaini (GRD) tüm GAP protein süper ailesi (/üst Ailesi) ile dizi homolojisi göstermektedir. Yapılan araştırmalar, *NF1* ile ilişkili tümörlerde, nörofibromin ekspresyon kaybının yüksek seviyelerde aktif RAS ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu hücrel düzensizlik *NF1*'in klinik fenotipik özelliklerinin çoğunu, özellikle *NF1*de belirgin olan iyi huylu ve kötü huylu neoplazm riskini açıklamaktadır. Yapılan çalışmalar *NF1* geninde tesbit edilen mutasyonların gen boyunca rastgele dağıldığını ve mutasyon oluşumuna daha yatkın olan sıcak bölgelerde lokalize olmadıklarını göstermektedir. *NF1* genindeki mutasyonlar, herhangi bir ekzonu etkileyen küçük boyutlu delesyon veya insersiyon şeklinde olabileceği gibi, tek baz düzeyindeki değişimlerden megabazlar düzeyine kadar uzayan büyük delesyonlar şeklinde de olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, rapor edilen mutasyon oranları, kullanılan tekniklere ve doku kaynağına bağlı olarak % 60 ile % 95 arasında değişmektedir. NIH tarafından belirlenen *NF1* 'in tanı kriterleri arasında çoklu *cafe-au-lait* lekeleri, Lisch nodülleri, aksiller çillenme ve nörofibrom adı verilen benign periferik sinir kılıfı tümörleri bulunmaktadır. *NF1* ile ilişkili diğer klinik komplikasyonlar arasında nörolojik, renal, kardiyovasküler, gastrointestinal, endokrin ve ortopedik bulgular, öğrenme güçlüğü ve entellektüel yetersizlik, dikkat eksikliği ve periferik sinir kılıfı veya merkezi sinir sistemi maligniteleri bulunmaktadır. *NF1* hastalarının yaklaşık dörtte biri önemli morbidite ve mortaliteye neden olan bu klinik komplikasyonlardan birini veya birkaçını geliştirmektedir. Genel olarak farklı hastalardan elde edilen tümör dokularında saptanan germline ve somatik mutasyonların

karakterizasyonu, *NF1* gen mutasyonunun tipi, doğası ve sıklığı hakkında bilgiler sağlamış olsa da, *NF1* 'de tümör oluşumunun moleküler mekanizmaları hakkındaki mevcut bilginiz halen sınırlıdır. Bunun yanı sıra birçok sendrom nörofibromatozisile ortak klinik bulgular göstermekte ve bu durum özellikle antenatal dönemde kesin tanı açısından zorluklara yol açabilmektedir. Bu nedenle, Nörofibromatozisile ilişkili sendromların sıklıklarının ve moleküler etiyopatogenezlerinin bilinmesi, prenatal ve postnatalolguların izlemi açısından önem kazanmaktadır. Bu sayılanlarbu hastalıkta klinik tanının yanı sıra moleküler tanının da önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle moleküler analizleri hızlandırmak, *NF1* ile ilişkili tümörlerde ilgili biyolojik yolların genotip-fenotip ilişkisi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla hedef genin YND tabanlı *NF1*-gen testi ile dizilenmesi, saptanan varyantların Sanger dizileme yöntemi ile doğrulaması amaçlanmıştır. Ayrıca olası büyük delesyon/duplikasyonlar MLPA ve array-CGH yöntemleriyle incelenmiştir. Bu kapsamda yaptığımız çalışmada kliniğimizde 2009-2018 yılları arasında Nörofibromatozistanı kriterlerini sağlayan ve takip altında olan, 27 Aileden 47 olgu klinik ve diğer laboratuvar testleri ile birlikte incelendi. Araştırmanın devamında, indeks olgularda *NF1* geninin protein kodlayan bölgelerini ve ekzon-intron sınırlarını kapsayan YND tabanlı *NF1*-gen testinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve saptanan varyantların klinik önemi olduğu düşünülenlerin özgün Primerler tasarlanarak Sanger dizileme ile konfirmasyonu, aile segregasyon analiz sonuçlarının incelenmesi, herhangi bir varyant ilişkisi saptanmayan olgularda *NF1* Yeni nesil dizilemede kapsam dışı olduğu bilinen bölgelere ait tasarlanan Primerler kullanılarak, Sanger dizileme ile araştırılması gerçekleştirildi. Araştırmanın son aşamasında her hangi bir varyasyon saptanmayan ancak Nörofibromatozistip1 tanı kriterleri ile uyumluluk gösteren hastalarda, *NF1* genindeki olası büyük del/dup'ları tanımlamak amaçlı, kullanılan MLPA ve array-CGH yönteminin klinik tanıya katkısı değerlendirildi. Bu çalışmada mutasyon saptanan olgu ve ailelerinin özgün genetik danışma almaları, postnatal ve taşıyıcılık testlerinin yapılması ve prenatal /preimplantasyon genetik tanı için zemin oluşturulması ise klinik izlemdeki en önemli katkı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Nörofibromatosis Tip 1 (NF1), etnik ve ırksal kökenden bağımsız, dünya genelinde 3000 ila 4000 kişide 1 prevalansa sahip yaygın bir ailesel kanser sendromudur (Barrea ve ark, 2017; Anderson ve ark, 2015). Nörofibromatozis tip 1, kromozom17q11.2'de bulunan tümör baskılayıcı *NF1*genindeki dominant mutasyondan kaynaklanan kalıtsal bir genetik bozukluktur. *NF1*, 57 ortak ekson (2.818 amino asit) ve üç alternatif olarak kırılan eksondan oluşan, 282 kb uzunluğuna sahip, bilinen en büyük genlerden biridir (Mao ve ark, 2018; Hinman ve ark, 2014).

*NF1*genin mRNA'sı 11 ila 13 kb'dan uzundur ve nörofibromin (NM_000267) olarak adlandırılan bir sitoplazmik proteinini kodlamaktadır (Barrea ve ark, 2017; Hirbe ve ark, 2014). Nörofibromin, esas olarak GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak işlev görür ve hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, hayatta kalmasını ve ölümünü teşvik eden RAS (rat sarkom proteini) proto-onkogeninin aktivitesini inhibe ederek hücresel düzeni sağlar. Nörofibromin, memelilerde normal embriyonik gelişim için gerekli bir protein olup ve mürin modellerde bu proteinin olmaması, esas olarak kan damarlarının anormal gelişimi sebebiyle ölümcüldür (Barrea ve ark, 2017; Trovó-Marqui ve ark, 2006). Bu protein, çoğu dokuda düşük seviyede eksprese edilirken, merkezi sinir sisteminde (MSS) en yüksek seviyede eksprese edilmektedir (Barrea ve ark, 2017). Tip1 Nörofibromatozisile ilişkili tümörlerde, nörofibromin ekspresyonunun kaybı, yüksek seviyede RAS'ın aşırı aktivasyonuna ve hücre tipine bağlı olarak, RAS yolağının devamındaki proteinlerin (AKT/mTOR ve RAF/MEK) düzensiz sinyalizasyonuna sebep olur. Bunun, NF1'in klinik fenotipinden, özellikle NF1'de belirgin olan iyi huylu ve kötü huylu neoplazmaların gelişiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir.(Williamsve ark, 2009).

2.1. Nörofibromatozis Tip 1 (NF1)

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), bir çok hücre tipini ve vücut sistemlerini etkileyen karmaşık, kalıtsal ve otozomal dominant bir bozukluktur. Nörofibromatozis tip 1'in klinik bulguları tarih boyunca çeşitli vakalar üzerinden bildirilmiştir (Fener ve ark, 2011; Fener ve Gutman, 2013). 1882 yılında Friedrich nörofibromaların PSS'nin endonörium kısmından kaynaklı olduğunu gösterilmiştir. 50 yıl sonra, tanı

kriterlerinden biri olan iris nodülleri, Viyana'lı oftalmolog Lisch tarafından tanımlanmıştır. Hastalık 1988 yılına kadar Von Recklinghausen olarak adlandırılırken, aynı yıl Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından, hastalığın nörofibromatozis tip1 olarak adlandırılması önerilmiştir (Fener ve ark, 2011; Fener ve Gutman, 2013).

Bu hastalığın insidansı 3000 ila 4000 kişide yaklaşık 1 ve genel olarak prevalansı Dünyada yaklaşık 5000 kişide 1 olarak belirtilmiştir (Huson ve ark, 1989; Evans ve ark,2010). Bu hastalık *NF1* geninde gerçekleşen değişik mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. *NF1* geni'nin mutasyon oranı yüksek olup ve her jenerasyonda yaklaşık olarak her 10.000 gamette bir mutasyon meydana gelmektedir. *NF1* geni mutasyonlarının yarısı germ hücrelerinde gerçekleşirken diğer yarısı de novo olarak oluşmaktadır (Mao ve ark, 2018).

2.2. *NF1* 'in Moleküler Genetiği

2.2.1. *NF1* Geninin Tanımlanması

1987'de *NF1* geninin, gen bağlantı çalışmaları ile 17.Kromozom üzerinde olduğu gösterilmiştir. Daha sonra *NF1* geninin iki bağımsız grup tarafından kromozom 17.11.2'ye yakın bir bölgeye haritalandığı belirtilmiştir (Cawthon ve ark,1990; Wallace ve ark, 1990; Viskochil ve ark, 1990). Yapılan farklı çalışmalarda *NF1* klinik tanısı alan iki hastada saptanan 1 ve 17 ve diğeri 17 ve 22 kromozomlarını içeren dengeli translokasyonlar, *NF1* geninin pozisyonunun daha iyi tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Farklı çalışmalarda 17.kromozomun bu bölgesine farklı aday genlerin haritalandığı tespit edilmiştir (Li Y ve ark,1995). Araştırmalar bu genlerin *NF1* geninin içine gömülmüş olduğunu (embedded gene) ve bu genler deki herhangi bir değişim nörofibromatozis kliniğinin yansımamasını göstermiştir (Huson ve ark, 1989; Evans ve ark,2010). Bu üç farklı gen: EV12A, EV12b ve OMgp olmak üzere intron 27b'nin (~ 61kb) içinde bulunup ve her biri 2 ekzondan oluşmaktadır. Bu genler *NF1* geninin komplementar zincirinde *NF1* genine ters oryantasyonda okunur (Viskochil ve ark, 1999). Bu gömülü genlerin (embdded gene) yanı sıra, adenilat kinaz 3 (AK3) *NF1* geni nin 37.intronunun içinde tanımlanmıştır. Bu gen genom boyunca farklı lokalizasyonlarda bulunup ve *NF1* geniyle aynı oryantasyonda okunmaktadır. Nörofibromatozis tip1 hastalığında yapılan araştırmalar, *NF1*'in içinde bulunan bu

genlerin protein ürünlerinin birbiriyle etkileşime girmediğini ve bu genlerin (gömülü genlerin) eksikliği ile ilişkili herhangi bir spesifik fenotip bulgunun ortaya çıkmadığını göstermiştir (Viskochilve ark,1990).

2.2.2. Alternatif Kırılma

Alternatif kırılma, proteozomda çeşitliliği oluşturan önemli bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. Bu mekanizma farklı gelişim evrelerinde ve farklı doku tiplerinde gen ekspresyonunu düzenleyen bir mekanizma olarak belirtilmiştir. Yapılan araştırmalar, alternatif kırılma işleminin bozulmasının, tümör gelişiminde önemli bir rolü olduğunu ve bu mekanizmanın NF1 hastalarında genotip-fenotip ilişkisinden sorumlu olduğunu göstermektedir (Eisenbarth ve ark, 1995).

2.2.2.1. Tip 1 nörofibromin

Tip 1 nörofibrominin protein dizisinde, 23a ve 48a eksonları bulunmamaktadır. Yapılan farklı çalışmalarda bu protein izoformunun RAS proteinine yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermiştir (Xu ve ark, 1990).

2.2.2.2. Tip 2 nörofibromin

Bu protein transkripti ekson 23a'nın GAP (GTPase aktive edici protein) related domain'ine (GRD) 21 amino asidin eklenmesi ile oluşmaktadır. Bu izoformda, GAP fonksiyonu bozulduğu için, RAS regülasyonunun da daha az etkili olduğu gösterilmiştir (Andersen ve diğerleri, 1993; Skuse ve diğerleri, 1996).

Bu protein izoformu, insan ve kemirgen dokularının çoğunda tespit edilmiştir. Tip 2 nörofibromin astrositlerde ifade edilmektedir ancak merkezi sinir sistemi (MSS) nöronlarında ifade edilmemektedir (Andersen ve ark, 1993; Gutmann ve ark, 1999). Yapılan araştırmalar Tip 2 nörofibrominin nöroblastlarda ve schwann hücrelerinde de ifade edildiğini göstermiştir (Gutmann ve ark, 1995b).

2.2.2.3. Üçüncü nörofibromin izoformu

Bu nörofibromin izoformu, ekson 48a'nın carboxyl terminus'una 18 amino asitin eklenmesi ile oluşmaktadır. Yapılan araştırmalar bu transkriptin kalpte ve iskelet kasında ifade edildiğini göstermektedir (Gutmann ve ark, 1995).

2.2.2.4. Diğer nörofibromin izoformları

Nörofibromin'in diğer izoformları diğer 3 tip'e göre daha düşük bir düzeyde ifade edilmektedir. Bu izoformlardan bazıları sadece MSS'de, beyincik, beyin sapı veya omurilikte ve çok düşük düzeyde ifade edilmektedir. Bunların içinde bazı izoformlar postnatal gelişimin erken evrelerinde ön beyin nöronlarında tanımlandığı için, sinir sistemi gelişimi ve farklılaşmasında koruyucu bir rol oynayabilecekleri öne sürülmüştür (Kauffman ve ark,2002; Gutmann ve ark,1999).

2.2.3. Gömülü Genler

Yapılan araştırmalar intron 1 ve 27b'nin, *NF 1* genindeki diğer intronlardan önemli ölçüde daha uzun olduğunu ve EV12A, EV12B ve OMgp genlerinin intron 27b (~ 61 kb)'nin içinde bulunduğu saptanmıştır (O'Connell ve ark, 1990; Vourc'h ve Andres, 2004).

2.2.3.1. EV12A And EV12B

EV12A ve EV12B genleri, fare genlerinin (Evi-2A ve Evi-28) insandaki homologları olarak bilinmektedir. Araştırmalar EV12A ve EV12B genlerin transmembran proteinlerini kodladığını ancak bu genlerin ana fonksiyonlarının net olarak bilinmediğini göstermiştir (Vourc'h ve Andres, 2004). Farklı çalışmalar bu genlerin aynı zamanda onkogen olarak da rol oynayabileceklerini düşündürmektedir (O'Connell ve ark, 1990; Vourc'h ve Andres, 2004). Yapılan farklı çalışmalarda EV12A'nın, beyinde, periferik kanda ve kemik iliğinde (Cawthon ve ark, 1990b) ve EV12B'nin, periferik kan kemik iliği ve fibroblastlarda ifade edildiğini bildirilmiştir (Cawthon ve ark,1991).

2.2.3.2. OMG

OMG geni merkezi sinir sistemi'nin oligodendrositlerinde ifade edilir (Habib ve ark, 1998). Bu gen, hücre dışı bir adhezyon proteini olan oligodendrosit miyelin glikoproteinini (OMg) kodlamaktadır (Mikol and Stephansson, 1988). OMgp'nin nöronal fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir ancak murin modellerinde yapılan çalışmalar OMgp'nin bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini göstermiştir (Venturin ve ark, 2006; Vetrine ve ark, 2011).

2.2.4. Psödogen Benzeri Diziler

Psödogenler'in, kromozomlar arasında meydana gelen multiple duplikasyonlar ve transpozisyonlar sonucunda oluştukları düşünülmektedir (Luijten ve ark, 2001). Bu genler erken durdurma kodonu ve farklı mutasyonlar (frame sift vd) sonucu oluşan ve fonksiyonu olmayan diziler olarak da tanımlanmıştır. Bu sebepten dolayı bu dizilerin ifade edilmedikleri ve protein yapısına dönüşmedikleri düşünülmektedir (Balakirev ve Ayala, 2003). NF1 geni ile yaklaşık % 95 sekans homolojisi gösteren 30 dan fazla psödogen tanımlanmıştır (Luijten ve ark, 2001). Bu psödogenlerinin fonksiyonları henüz bilinmemektedir.

2.3. Nörofibromin

2.3.1. NF1 Gen Ekspresyonu

2.3.1.1. NF1 Geninin cDNA Dizisi

NF1 geni nin cDNA dizisi ilk önce Gutmann ve Collins (1993) ve Viskochil ve arkadaşları (1993) tarafından açıklanmıştır. NF1 geninin protein ürünü nörofibromindir. nörofibromin ~ 2818 amino asit'ten oluşan 220-250 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. Yapılan araştırmalar bu proteinin gelişimin farklı aşamalarında vücudun tüm dokularında ifade edildiğini göstermiştir (DeClue ve ark, 1991; Daston ve ark, 1992).

2.3.1.2. Neurofibrominin Dokulardaki İfade Düzeyi

NF1 mRNA'sı çoğunlukla yetişkin dokularda, düşük bir konsantrasyonda ifade edilmektedir. Bu protein deri fibroblastları, dalak, akciğer, kas ve farklı hücre ve doku tipleri arasında, farklı düzeylerde bulunmaktadır (Wallace ve ark, 1990). Nörofibromin geninin en yüksek düzeyde ifadesi, yetişkin beyindeki nöronlarda, merkezi sinir sisteminde (MSS) ve periferik sinir sisteminde (PSS) bildirilmiştir (Golubic ve ark, 1992). Hayvan modeli üzerinde yapılan çalışmalar, sıçan embriyonik gelişimi sırasında aksonal yol bulmada nörofibrominin önemli bir rolü olduğunu ve bu protein düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir, ancak doğum sonrası gelişimde nöral olmayan dokularda da bu proteinin düşük seviyede varlığı saptanmıştır (Daston ve ark, 1992; Daston ve Ratner, 1992). Nörofibromin düzeyinin nöral ve nöral olmayan dokulardaki değişimi, bu proteinin işlevindeki farklılıklardan kaynaklandığını

göstermektedir. NF1 gen mutasyonları, bu genin MSS'nin içinde ve dışında olan ifade düzeyine bağlı olarak, çok çeşitli klinik bulguların ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

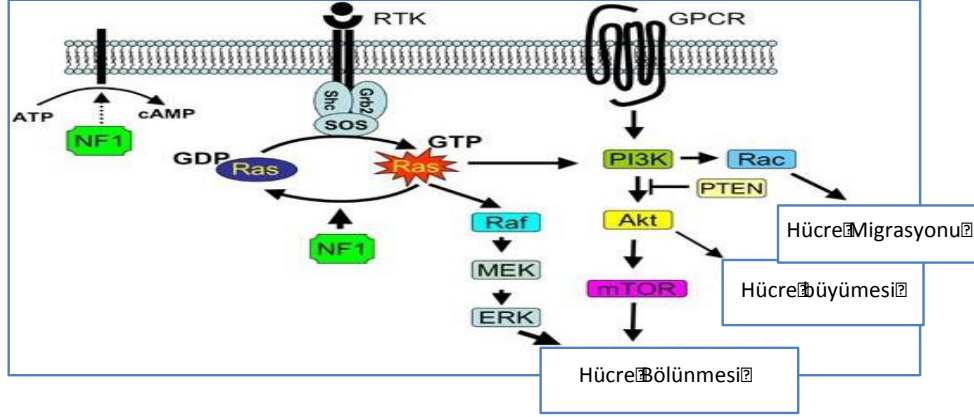
2.3.2. Nörofibromin Ras GAP Fonksiyonu

NF1 geni türler arasında çok yüksek oranda korunmuş bir gen olarak tanımlanmaktadır. Bu gen fare ile insan arasında ~%98 oranında homoloji göstermektedir (Bernards ve ark, 1993; The ve ark, 1997). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda NF1 gibi GAP proteinlerine benzer ve/veya aynı işleve sahip olan proteinleri kodlayan en az 160 gen bildirilmiştir. Bu gen Ras/mitogen activated protein kinase (MAPK) yolağının regulasyonunda önemli işleve sahiptir. Ras'ın kodladığı protein bir G proteindir (GTP bağlayan protein). Bu proteinler hücre membranının iç yüzüne lokalize olmuşlardır. GTP veya GDP bağlı formları ile, iki farklı konformasyonda hücre içerisindeki çeşitli proteinleri etkileyip o proteinlerin konformasyon değişimine ve fosforilenmelerine yol açarak sinyal iletimini sağlar. Bu proteinler hücrede son derece kritik roller oynamaktadırlar. Bu yolak büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinaz (RTK), G-proteini bağlı reseptörler, sitokin reseptörler ve ekstrasellüler matriks reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olup hücre içi protein trafiğini, hücre iskeletinin organizasyonunu, büyüme faktörü sinyal iletimini, ve gen ifadesi gibi mekanizmaları düzenlerler. RAS bütün kanserlerin yaklaşık %20'sinde somatik mutasyona uğramaktadır. Bu nedenle RASopatiler, RASsinyal yolağının aktive olduğu kanser sendromları olarak da bilinmektedir (Ballester ve ark, 1990; McTaggart ve ark, 2006).

2.3.2.1. RAS Aktivasyon Mekanizması

RAS Ailesi proteinleri, GDP veya GTP nin bağlanmasına göre ikili moleküler switch mekanizmasıyla sırasıyla off veya on pozisyonunda kontrol edilmektedir. Araştırmalar bu proteinlerin GDP ve GTP bağlanması ve GTPaz hidrolizi için yüksek afiniteye sahip olduklarını bildirmiştir. Bununla birlikte intrinsik GTP hidrolizi ve GDP /GTP değişim iki temel regülatör protein olarak bilinen Guanin nükleotid exchange faktör (GEF) ve GTPaz aktive edici proteinler yani GAP ile kontrol edilmektedir. GTP bu proteinlere bağlandığı zaman, konformasyonel değişimini sağlayarak bu proteinlerin hedef downstream efektörler ile etkileşmesine olanak vermektedir. GAP'ların birincil fonksiyonu sinyal iletimini negatif olarak regüle etmektir. Guanin nükleotid exchange factorler (GEF) inaktif GDP yi aktif GTP ye çevirerek, RAS sinyali yolağının

aktivasyonunda ve hücrel düzeni sağlamakta önemli rol oynamaktadır (Ballester ve ark, 1990; McTaggart ve ark, 2006) (Şekil .2.1).



Şekil 2.1 Ras aktivasyon/inaktivasyon döngüsü (Le LQ ve ark, 2007'den değiştirerek alınmış).

2.3.2.2. RAS Mutasyonları Ve Kanser İlişkisi

Hücre bölünmesinde ve gelişim sinyallerinde aktif rol alan RAS proteinleri tüm kanserlerde sıklıkla somatik mutasyona uğramaktadır. İnsanlarda RAS genlerindeki aşırı aktivasyona sebep olan mutasyonlar tüm kanserlerin %20'sinde saptanmaktadır. Bu mutasyonlar, GTPaz aktivitesini bozarak GTP-bağlı formda kalan mutant RAS proteinlerinin hücrede birikimine sebep olmakta, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde uyarılmasına, büyümesine ve kanserleşmiş hücrelerin apoptoza direnç gibi özellikler kazanmalarına yol açmaktadır (Le LQ ve ark, 2007; McTaggart ve ark, 2006; Ballester ve ark, 1990).

Hücrelerin sinyal iletimi ve proliferasyon bozuklukları ile malign dönüşümün aktivasyonu, RAS genlerindeki mutasyonların yanı sıra çeşitli genler deki mutasyonlar yoluyla da meydana gelmektedir (Le LQ ve ark, 2007). Bu genler arasında GTP'yi GDP'ye hidrolize ederek RAS sinyal yolağını inaktif hale getiren ve hücre düzenini sağlayan *NF1* genin kodladığı nörofibromin yer almaktadır. Nörofibrominin ekzon 21-27a'yı kapsayan bölgesi, guanozin trifosfataz aktive eden proteinlerin (GAP) katalitik bölgesiyle homoloji göstermektedir. Ekzon 21-27a bölgesi GAP ile ilgili bölge (GRD) olarak adlandırılıp ve *NF1* geninde fonksiyonel olarak net olarak tanımlanan tek bölge olarak belirtilmiştir.

Nörofibromin hücre çoğalması, farklılaşması ve morfogenezini kontrol eden RAS sinyal yolağının negatif regülatörü olmasından dolayı tümör baskılayıcı protein olarak adlandırılmıştır (Ballester ve ark, 1990; McTaggart ve ark, 2006).

Nörofibrominin kaybı hücrede RAS sinyal yolağının devamlı aktivasyonuna yol açarak bu hücrelerde kontrolsüz proliferasyona neden olur. Yapılan araştırmalar nörofibrominin bulunmadığı ya da mutant olduğu durumlarda RAS sinyal yolağının aşırı aktivasyonu aşırı hücre bölünmesi, invazyon, metastaz ve apoptozun engellenmesi gibi mekanizmalara yol açarak, farklı iyi huylu ve ya kötü huylu kanserlerin ortaya çıktığını göstermiştir (Le LQ ve ark, 2007).

2.4. NF1 'in tanı kriterleri ve klinik özellikleri

Nörofibromatozis tip1, aynı mutasyonu paylaşan aile bireylerinin arasında bile oldukça değişken semptomlar göstermektedir. *NF1* gen mutasyonlarının farklı hücre tiplerinde gerçekleşmesine bağlı olarak, Nörofibromatozis tip1 hastalarında çok çeşitli klinik bulguların görüldüğü bildirilmiştir. Bu belirtilerden NF1'de deri bulguları çocukluk çağında ortaya çıktığı için tanısız olarak önem kazanmıştır. 1988 yılında NIH kriterlerine göre NF1 tanısı için aşağıda gösterilen bulgular dan en az ikisinin olması gereklidir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 NF1 tanı kriterleri (NIH, 1988).

En az altı veya daha fazla café au lait makülü (en büyük çapı ergenlik öncesi bireylerde ≥ 5 mm ve ergenlik sonrası bireylerde ≥ 15 mm)
Aksiller veya inguinal çillenme
Optik gliom
İki veya daha fazla Lisch nodülü (iris hamartomaları)
Herhangi bir türden iki veya daha fazla nörofibrom veya bir pleksiiform nörofibrom
Özgün kemik lezyonları (sfenoid kanat displazisi, tibiada psödoartroz gibi)
Bu bulguları gösteren 1. derece akrabanın olması

2.4.1. Klinik Özellikler

2.4.1.1. Deri bulguları

NF1'de en sık görülen deri bulguları olan Café au lait lekeleri, çiller ve nörofibromlar bu hastalığa tanı koymak açısından önemlidir ve hastalığın en erken klinik bulgular dandır (Nunley KS ve ark, 2009).

2.4.1.2. Café au lait lekeleri

Bu lekeler, açıktan koyukahve renge kadar değişiklik gösteren, homojen ancak bazen homojen olmayan pigmentasyon ile atipik formları görülen maküllerdir (Şekil 2.2). Bu lekeler vücutta rastgele dağılır ancak saçlı deri ve avuç içinde gözlenmemektedir. Atipik Café au lait lekelerinin vücudun aynı bölgesinde çok sayıda olması veya vücudun bir tarafında diğer tarafa göre kümelenme göstermesi, mozaik NF1'i yansıtır olabilir. Yapılan çalışmalarda Café au lait lerin boyut ve sayıları ile NF1'in şiddetinin göstergesi olmadığını ancak NF1 in tanısında önemli olduğunu bildirilmiştir. Doğumdan itibaren Café au lait lekeleri görülmekle olup bazen de ilk 2 yılda gelişebilmektedir (Nunley KS ve ark, 2009).



Şekil 2.2. Café au lait lekeleri (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).

2.4.1.3. Çiller

Çiller Café au lait lekelerinin gelişmesinden daha sonar meydana gelen temel tanı kriterlerinden biridir. Görünümleri güneşten kaynaklı olan çillere benzer ancak tamamen güneş ışığı görmeyen bölgelerde de görülen çok sayıda küçük boyutta (1-3 mm'lik) maküllerdir. Olguların %80'inde aksilla ve inguinal bölgede ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.3). Bazı hastalarda boyun, göğüslerin altı, dudakların çevresinde ve yetişkinlerin gövdesinde de görülebilir. Bu çiller genellikle küçük yaşta derinin kıvrımında başlar. Bu bulguların ortaya çıkma sebebi bilinmemektedir ancak kıvrım bölgelerinde artmış olma nedeninin, bu bölgelerde sürtünme, sıcaklık veya nem artışı olabileceği düşünülmektedir (Hirbe AC ve ark, 2014).



Şekil 2.3. Çillenme (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).

2.4.1.4. Nörofibromlar

Nörofibromlar, NF1'in en belirgin bulgularından biridir. NF1 olgularda çok sayıda nörofibrom görülebilir, bu yüzden hastalığa Nörofibromatozis ismi verilmektedir. Nörofibromlar periferik sinir kılıflarını saran Schwann hücrelerinden köken alan benign tümörlerdir ve Schwan hücreleri, perinöral hücreler ve fibroblastlar, mast hücrelerinden oluşmaktadırlar (Şekil1.4) (Williams ve ark, 2009). Nörofibromlar, NF1 hastalığının önemli bir morbidite kaynağıdır (Page ve ark, 2006).



Şekil 2.4. Nörofibromlar (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).

Tümörlerin yeri nedeniyle, kutanöz nörofibromlar (genellikle çok sayıda ve asemptomatik), sub kutanöz (deri altı) (sert tümörler, nörolojik semptomlar veren, genellikle malign tümörlere ilerlemez) ve pleksik (birkaç sinir demeti ve bağlantıları dahil) formlarından oluşmaktadır. Pleksus nörofibromları artma eğilimindedir, bu da önemli vücut deformitelerine, sinir sıkışmasına ve kemik hasarına ve ilgili komplikasyonlara yol açabilir. Sık hücre bölünmesinin sonucu, tümör transformasyonu ve iyi huylu maligniteye ilerlemesi ve bu durumda benign periferik sinir kılıflarından Malign Periferik Sinir Kılıf Tümörlerinin (MPNST) oluşumuna sebep olmaktadır.

2.4.1.5. Pleksiform nörofibromlar (PNF)

Pleksiform nörofibromlar, çoklu sinir fasikülünden kaynaklanan ve sinirin uzunluğu boyunca büyüeyebilen neoplazilerdir (Hirbe ve ark, 2014; Nguyen ve ark, 2011). PNF'lar daha derin dokulara infiltre edilip; deri ve kas dışında iç organlarda yayılabilmekte. Bu yapılar sinirler üzerine baskı yaparak nörolojik endikasyonlar oluşturabilmektedir (Page ve ark, 2006). PNF'lar diğer nörofibromlardan farklı olarak doğuştan itibaren gelişip ancak yaşamın ilk 4-5 yılında fiziksel olarak görülebilmektedirler (Mautner ve ark, 2006). Yapılan çalışmalar *NF1* tüm gen delesyonu olan hastalarda MPNST gelişme riskinin daha küçük boyutlu mutasyonlara göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Hirbe ve ark, 2014). Geniş nörofibromları olan vakalarda bağ dokusu malignitesi gelişme riski diğer valakalara göre daha yüksek olup ayrıca *NF1* hastalarında PNF'lerin MPNST'e dönüşme riski olduğu tahmin edilmiştir (Mautner ve ark, 2006) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. PNF (İstanbul Tıp Fakültesi, iç hastalıkları ABD, Tıbbi Genetik BD arşivinden).

2.4.1.6. Nevus anemikus

Nevus anemikus yüzeysel dermiste kan damarlarının katekolaminlere duyarlılığının artması sonucu oluşmaktadır (Mountcastle ve ark, 1986; Greaves ve ark, 1970). Genellikle asemptomatikler ve en sık gövdede bulunurla (Şekil 1.6). 2 yaşın altında olan NF1 hastalarda Nevus anemikus bulgusu daha az belirgin olduğundan, bu bulgunun tanı için önemli bir deri bulgusu olduğu düşünülmektedir (North ve ark, 2009).



Şekil 2.6. Nevus anemikus (<https://www.dermatologyadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/>).

2.4.1.7. Jüvenil ksantogranülom (JXG)

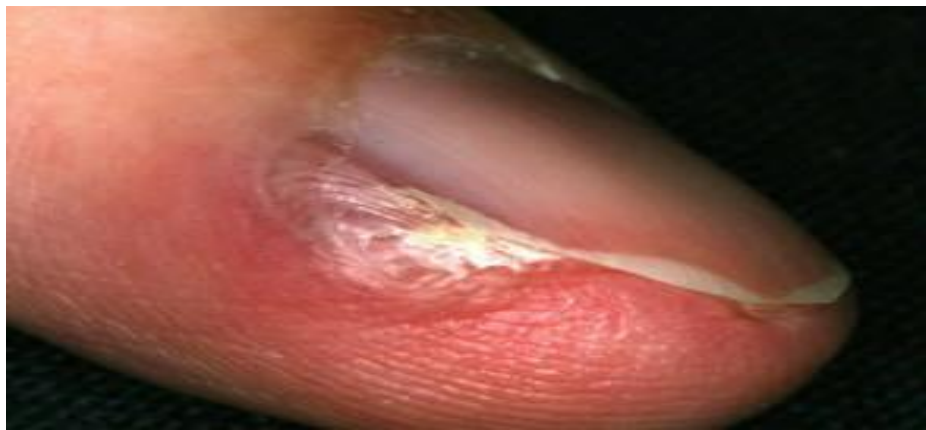
Jüvenil ksantogranülom NF1 hastalarında gözükebilen, turuncu ve iyi sınırlı papülonodüler lezyonlardır. Jüvenil ksantogranülom (JXG) vücudun tüm bölgelerinde ortaya çıkabilir ancak baş ve boyun bölgesinde daha sık görülmektedir (Chu ve ark, 2012). NF1 hastaların yaklaşık %18'inde yaşamın ilk yıllarında bir veya çok sayıda JXG gelişebilir (Ferrari ve ark, 2014). Yapılan araştırmalar JXG'ü olan NF1 hastalarında JMML (jüvenil miyelomonositik lösemi) gelişme riski daha yüksek olduğunu göstermiştir (Zvulunov ve ark, 1995). JMML gelişen çocuk hastalarda anemi, trombositopeni, lökositoz, hepatosplenomegali ve lenfadenopati görülme riski yüksektir. JXG'un JMML ile olan ilişkisinin etiyopatogenezi halen bilinmemektedir (Paulus S ve ark, 2017) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Jüvenil ksantogranülom (<https://www.aad.org/dw/dw-insights-and-inquiries/dermatopathology/neurofibromatosis-type-1-juvenile-xanthogranuloma-and-leukemia-wasting-a-good-worry>).

2.4.1.8. Glomus tümörleri

Son zamanlarda NF1 hastalarında glomus cisimlerinden oluşan tümörlerinin görüldüğü bildirilmiştir (Brems ve ark, 2009). Bu cisimler vücut ısını kontrol eden küçük dermal arteriyovenöz anastomozlardır. Çoğunlukla el ve ayaklarda tırnak yatağının altında bulunmaktadırlar (Şekil 2.8). Glomus tümörleri her yaşta görülebilir ancak 20-40 yaş arasında görülme sıklığı daha yüksektir. Glomus tümörü genel olarak benign seyirli olmakla birlikte birkaç olguda malign transformasyon ayrıca metastaz yaptığı bildirilmiştir (Watanabe ve ark, 1998).



Şekil 2.8. Glomus tümörü(<https://dermnetnz.org/topics/glomus-tumour/>).

2.4.2. Deri Dışı Bulgular

2.4.2.1. Göz bulguları

NF1'in tanı kriterlerinden biri olan Lisch nodülleri sarı-kahve renkli ve 1-2 mm çapında olan papüllerdir. Bu lezyonlar, irisin alt yarısında yoğunlaşmakta olup, çocuk hastaların %10'unda görülürken erişkin hastaların %90'ında bulunmaktadır (Otsuka ve ark, 2001; DeBellave ark, 2000) (Şekil 2.9). Yapılan çalışmalarda Lisch nodüllerin sayısı ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir. NF1 hastalarında diğer göz bulgularından olan konjenital ve kalıtsal glokom, koroid anomalileri ve etiyolojisi bilinmeyen bilateral konjenital pitozis gibi anomaliler nadir olarak rastlanmaktadır.



Şekil 2.9. Lisch nodülleri (Abaloun Y ve ark, 2017).

2.4.2.2. Nörolojik Bulgular

NF1 hastalarında periferik ve merkezi sinir sistemi tutulumları ve buna bağlı komplikasyonlar önemli morbidite ve mortaliteye sebep olabilmektedir (Korf ve ark, 2002). Gliomlar, merkezi sinir sisteminin herhangi bir lokasyonunda ortaya çıkabilir ancak en çok yerleştikleri yer optik yolak olarak bilinmektedir. Optik gliom genellikle 6 yaş altında ortaya çıkmakta ve hastaların %5'inde basınca bağlı görme bozukluğu, optik sinir atrofisi, erken puberteye yol açabilmektedir (Rosser ve ark, 2002).

Optik yolak dışındaki gliomlar, NF1 'li hastaların %5'inde görülür ve en sık beyin sapı, diensefalon ve serebellumda yerleşilmektedir.

Diğer Nörolojik Bulgular arasında yer alan epilepsi, çocuk ve yetişkin NF1 hastaların yaklaşık %5'inde görülmekte olup bu hastalarda epilepsiden kaynaklanan nöbetler; beyin travması, enfeksiyon yanısıra temporal skleroz ve NF1 ile ilişkil gliomlar gibi çeşitli nedenlerle oluşmaktadır (Ferner ve ark, 2007).

Hafif mental retardasyon NF1 hastalarının %30-50'sinde saptanabilmektedir (Thiagalingam ve ark, 2004).Yapılan araştırmalar, NF1 yakınında bulunan 13 geni kapsayan büyük delesyonları olan hastalarda (NF1 mikrolelesyonları) öğrenme güçlüğü ve sendromik olmayan mental ve motor fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir (Frayling ve ark, 2018; De raedt ve ark, 2003; Pinna ve ark, 2015; Rojnueangnit ve ark, 2015; Pasmant ve ark, 2010; Upadhyaya ve ark, 2007).

MPNST nörolojik bulguların arasında yer alan, yüksek dereceli bir yumuşak doku tümörüdür ve subkutan nörofibrom veya PNF'dan kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu tümörler tek başına nörofibrom olmadan da gelişebilir ve NF1 hastalarında önemli morbidite ve mortaliteye sebep olabilen bulgulardan biri olarak değerlendirilmektedir (Ferner ve ark, 20027).

2.4.2.3. İskelet Sistemi Bulguları

Makrosefali ve skolyoz NF1 hastalarında en sık görülen iskelet anomalileri arasında yer almaktadır. Bunun yanısıra bu hasta gurubunda orantılı boy kısalığı görülmektedir (Ferner ve ark, 2007). Psödoartroz NF1'de konjenital olarak görülen diğer bir iskelet anomalisidir ve bu anomali tibiada eğrilmeye neden oala bilir. NF1'in diğer iskelet deformitelerinden biri de sfenoid kanat displazisidir. Bu bozukluk genellikle konjenital ve bilateral olarak ortaya çıkmaktadır (White ve ark, 1986).

2.4.2.4. Kardiyovasküler Sistem Bulguları

Nörofibromin proteini vasküler endotel ve düz kasta bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, NF1 gen mutasyonundan kaynaklan nörofibromin eksikliğinin, vaskülopatiye sebep olabileceğini göstermektedir.

NF1'in kardiyovasküler bulguları arasında konjenital kalp hastalığı, vaskülopati ve hipertansiyon yer almaktadır. NF1 hastalarında koroner kalp hastalığı popülasyonun

geneline göre daha sıktır. Dolaşım sisteminin işleyişinde, kan damarlarının iç zarındaki hücrelerin aşırı çoğalmasından kaynaklanan daralmalara ve bunun sonucunda hipertansiyon, felç veya koroner arter hastalığına yol açan bozukluklar *NF1* gen mutasyonlarının sonucunda ortaya çıkan en önemli bulgulardandır(Oderich ve ark, 2007).

2.4.2.5. Solunum Sistemi Bulguları

NF1 hastalarında şiddetli skolyoz veya Pleksiform nörofibromların göğüse bası yaptığından restriktif akciğer hastalığı oluşa bilmektedir. Ayrıca akciğerler, malign periferik sinir kılıfı tümörlerinin (MPSSKT) metastaz yaptığı en önemli organlardan biridir.

2.4.2.6. Gastrointestinal Sistemi Bulguları

Nörofibromatoz ile ilişkili çeşitli gastrointestinal system (GİS) maligniteleri görülebilmekte olup ve vücudun diğer bölgeleri gibi nörofibromlar ve malign periferik sinir kılıfı tümörleri ile tutulabilir. Gastrointestinal stromal tümörler (GİST), *NF1* hastalarının %25'inde bildirilmiştir. GİST benign bir seyir izlemektedir ve gastrointestinal kanaması ve devamında anemiye neden olabilmektedirler (Agaimy ve ark, 2012).

2.4.3. *NF1* İle İlişkili Tümörler

NF1 gen mutasyonunu taşıyan bireylerde çok sayıda benign veya malign tümör riski artmaktadır. Bu hastalarda yaşam boyu kanser gelişme riski genel popülasyona göre 2,7 kat artmış olup bu risk 50 yaş ve üstünde kümülatif bir etki ile %20'ye yükselmektedir (Hirbe ve ark, 2014; Neumann ve ark, 2011; Upadhyaya ve ark, 2009; Mannelli ve ark, 2007; Stewartve ark, 2007; Stewartve ark, 2007; Brems ve ark, 2007; Niemeyer ve ark, 2006; Takazawa ve ark, 2005; Stiller ve ark, 1994; Yamazaki ve ark, 1988). Aşağıdaki tabloda *NF1* geninde oluşan somatik mutasyonundan kaynaklanan kanserler özetlenmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 NF1 ile ilişkili benign ve malign tümörlerde somatik mutasyonlar.

Tümör tipi	Benign ve ya Malign (İyi huylu veya kötü huylu)	Mutasyon tipi
Kutanöz nörofibromlar	Benign	<i>NF1</i>
Tümör yükü yüksek olan hastalarda (kutanöz nörofibromlar)	Benign	<i>NF1, TP53, RB1</i>
Pleksiform nörofibromlar	Benign/Malign Potansiyel	<i>NF1, TP53, RB1, CDKN2A</i>
Spinal nörofibromlar	Benign	<i>NF1</i>
MPNSTs	Malign	RAS/MAPK yolağındaki somatik ve/veya germline mutasyonlar sonucunda
Evre IV astrositomlar (glioblastoma multiforme)	Malign-Yüksek Dereceli	% 50 EGFR aktivasyonu
	Malign-Düşük Sınıf	<i>PTEN</i>
Paragangliomalar ve Feokromositomalar	Malign	<i>NF1</i>
		Tirozin kinaz mutasyonu
		(HIF) indüksiyonu
		<i>TMEM127</i>
Gastrointestinal Stromal Tümörler	Malign	ICC (interstitial cells of Cajal) hücrelerinde NF haploetersizliği
		5% <i>PDGFRA</i>
		% 90-95 oranında aktive edici mutasyonlar (<i>c-kit</i>)
Glomus Tümörleri	Benign	<i>NF1</i>
Gastrik Karsinoid Tümörler	Malign	<i>NF1, CTNNB1</i>
JMML	Hematolojik malinite	RAS/MAPK yolağındaki somatik ve/veya germline mutasyonlar sonucunda

2.5. NF1 ilişkili sendromlar

2.5.1. NF1 in değişken formları

Neurofibromatozis hastalığının, ailesel spinal Nörofibromatozis (FSNF) ve segmental NF1 (SNF1) olmak üzere bilinen iki varyant formu bildirilmiştir. Bu sendromların yanı sıra Nörofibromatozis tip 2 (NF2), ailesel Schwannomatoz ve Watson sendromu dahil olmak üzere NF1'e benzer özelliklere sahip olan birçok sendrom rapor edilmiştir. Bu

bozukluklar Tablo 2.3'de özetlenmektedir. Bütün bu hastalıklar için altta yatan ortak genetik temel aydınlatılmış olup, bu hastalık grubu RASopatiler olarak adlandırılmıştır.

2.5.2. Rasopatiler

RASopatiler sinir sistemi, kardiyovasküler system ve cildi ilgilendiren, dismorfik yüz özelliklerine neden olan, ortak ve ayırt edici klinik özelliklerin belirli kombinasyonlarını sergileyen bir grup hastalıktır. Bu hastalık grubundan sorumlu genlerin her biri RAS-MAPK (mitojenlerle aktive olan protein kinazlar) sinyal yolağının bir bileşenini kodlar. RAS-MAPK yolağının elemanlarının oluşturduğu RASproteinleri karmaşık hücre içi sinyal ağının son derece merkezi üyeleridir. Bunlardan biri olan nörofibromin hücre gelişiminde ve düzenlemesinde rolü olan, RasMAPK moleküler sinyal yolağının önemli bir parçasıdır. Bu bilgiler bu yolağın sadece onkogeneizde önemli olmadığı ve aynı zamanda büyüme, gelişme, bilişsellik, bağışıklık sistemi ve vasküler gelişimde kilit rol oynadığını göstermektedir (Denayer ve ark., 2008; Review by Bennett ve ark, 2009) (Tablo 2.4). Rasopatilerin ve teşhisi RasMAPK yolundaki genler arasındaki etkileşimler ve yüksek düzeyde klinik örtüşme nedeniye zor olabilmektedir. Teşhis sadece klinik özelliklere dayanamaz ve moleküler karakterizasyon da eşit derecede bu hastalıkların ayırımı için gereklidir (Messiaenve ark, 2011; Erickson ve ark, 2010; Upadhyaya ve ark, 2009; Li ve ark, 2009a; Cordeddu ve ark, 2009; Spurlockve ark, 2009; Pasmantve ark, 2009; Hulsebos ve ark, 2007; Razzaqueve ark, 2007; AI-Rahawan ve ark, 2007; Schubbertve ark, 2007; Navave ark, 2007; Roberts ve ark, 2007; Kontaridis ve ark, 2006; Korf ve ark, 2005; Mazzanti ve ark, 2003; Legius ve ark, 2002; Rouleau ve ark, 1993; Tassabehji ve ark, 1993; Watson ve ark, 1967). Aşağıdaki tabloda Rasopatiler; klinik bulguarı ve ilişkili genleri (Tablo 2.3) ve ardından Ras yolağı ile ilişkili genler/ kromozomal lokasyonları ve fonksiyonları özetlenmektedir (Tablo 2.4).

Tablo 2.3 Rasopatiler; klinik bulguarı ve ilişkili genler

Disorder	Fenotip	Etken Gen
Ailesel Spinal Nörofibromatozis (FSNF)	Bu hastalıkta NF1'in klinik özellikleri nadir olarak bildirilmiştir. FSNF hastalarında birden fazla bilateral spinal tümörler görülmekte ve bazı hastalarda MPNST'e yaygın olarak rastlanmaktadır. FSNF'de farklı progenitör hücre tiplerinde nörofibrominin anormal ekspresyonuna bağlı olarak farklı klinik bulgular ortaya çıkmaktadır.	NF1 mutasyonlarının spesifik spektrumu: missense veya splice bölge değişiklikleri olmaktadır.

Segmental NF1 (SNF)	Yaklaşık ~% 0.0006 -% 0.0018 oranda ortaya çıkmaktadır. Genellikle hastaların vücudunun dörtte birinde veya yarısında ortaya çıkar.	Embriyogenez döneminin farklı evrelerinde meydana gelen postzigotik NF1 mutasyonlarının oluşum zamanına bağlı olarak farklı fenotipler ortaya çıkar. Periferik kanda NF1 mutasyonları, SNF1 hastalarında nadir olarak gözlenmiştir.
Nörofibromatozis Tip 2 (NF2)	Sıklığı 25.000'de 1 olarak bilinmektedir. NF2'nin ayırt edici özelliği, yalnızca Schwann hücrelerinden oluşan, genellikle iyi huylu olan Schwannomlardır. Hem akustik sinirlerin vestibüler dallarında hem de çevresinde meydana gelebilirler.	Schwannomin 'i kodlayan NF2 geninin (110 kb), mutasyonları ile meydana gelir.
Schwannomatosis	NF2'den ayırt etmesi zor bir hastalıktır. İnsidans. 30.000'de yaklaşık 1 olarak belirtilmiştir. Schwannom vestibüler sinirden gelişmemektedir.	Tümör baskılayıcı gen <i>IN/1/SMARCB1</i> ve NF2 geninin somatik mutasyonları ile gerçekleştiği gösterilmiştir
Watson Sendromu	Klinik özellikleri hem NF1 hem de Noonan sendromuna benzerlik gösterir. Bu hastalıkta CAL sayısı düşüktür. Lisch nodülü ve nörofibrom, kısa boy, kognitif bozukluk ve pulmoner darlık bu hastalığın belirtilerindendir ancak diğer NF1 komplikasyonları bu hastalıkta görülmemektedir.	NF1 mutasyonları
Noonan Sendromu	Konjenital kalp hastalığı, fasyal dismorfizm, kısa boy, iskelet defektleri, mental gerilik ve hematolojik anormallikler bu hastalıkta gözlenir.	<i>PTPN11, SOS1, RAF1, MEK1, KRAS, NRAS, BRAF</i>
Noonan benzeri sendrom (NS / LAH)	Gevşek anagen saç	<i>SHOC2</i>
LEOPARD Sendromu	Lentijinler, elektrokardiyografik anormallikler, oküler hipertelorizm, pulmoner kapak darlığı, anormal genital organ, büyüme ve gelişme geriliği ve sağırılık bu hastalığın belirtilerindendir.	<i>PTPN11, RAF1</i>
Legius Sendromu	NF1 Benzeri Sendrom: cafe au lait maküller, aksiller çillenme, hafif nörobilişsel bozukluk ve makrosefali görülmektedir	<i>SPRED1</i>
Costello Sendromu	Makrosefali, cutis laxa, nazal ve perioral papillomlar, derin palmar ve plantar kırışıklıklar, yaygın cilt hiperpigmentasyonu ve tırnak distrofileri görülmektedir. Artmış malignite riski vardır: rabdomyosarkom, transisyönel hücreli karsinom ve nöroblastom	<i>HRAS, KRAS, BRAF, MEK1</i>
Kardiyo-facio- kutanöz Sendrom	Kraniyofasiyal dismorfoloji, ektodermal anomaliler ve kardiyak defektler. Kaba yüz, konjenital kalp defekti, ektodermal anomaliler (foliküler ve palmar hiperkeratoz), kısa boy, mental retardasyon (orta - ağır). NS ve Costello sendromuna benzerlik gösteren yüz özellikleri.	<i>KRAS, BRAF, MEK1, MEK2, SOS1</i>

Tablo 2.4. Ras yolağı ile ilişkili genler/ kromozomal lokasyonları ve fonksiyonları

Gen	Genin fonksiyonu	Kromozomal lokalizasyonu
<i>PTEN</i>	Çift yönlü işleve sahip bir protein fosfatazdır (Tümör baskılayıcı) AKT / PKB sinyal yolunu negatif olarak düzenler.	10q23.3
<i>PTPN11</i>	Protein Tirozin Fosfataz. Hücrel süreçleri düzenler: hücre büyümesi, farklılaşma, mitotik döngü ve onkogenik dönüşüm gibi mekanizmalarda yer almaktadır.	12q24
<i>SOS1</i>	RAS (GEF) için guanin nükleotid değişim faktörüdür. GTPyi GDP ye çevirerek Ras yolağını düzenler.	2p22-p21
<i>BRAF</i>	Serin / treonin protein kinazı. MAP kinaz / ERK sinyal yolağını düzenler: hücre bölünmesini, farklılaşmayı, sağkalımını etkiler.	7q34
<i>RAF1/CRAF</i>	MAP3K. Membranla ilişkili GTPazlara doğrudan bağlanır ve ras ailesini negative yönde regule eder. Hücre bölünmesi, apoptoz, hücre farklılaşması ve hücre göçünde rol oynayan genlerin ifadesini kontrol eder.	3p25
<i>HRAS</i>	GTPase süper ailesinin üyesidir. GTPase aktivitesini tetikler. GTP ve GDP'ye bağlanarak RAS Sinyal yolağında işlev görmektedir.	11p15.5
<i>KRAS</i>	GTPase süper ailesinin protein üyesidir. GTPase aktivitesini tetikler. GTP ve GDP'ye bağlanarak RAS Sinyal yolağında işlev görmektedir.	12p12.1
<i>MAP2K1/MEK1</i>	Özgün mitojenlerle aktifleştirilmiş protein kinazlar arasında yer almaktadır. Hücre bölünmesi, farklılaşma, transkripsiyonel düzenleme, hücre gelişimi gibi süreçlerde işlev yapmaktadır.	15q22.1-q22.33
<i>MAP2K2/MEK2</i>	Özgün mitojenlerle aktifleştirilmiş protein kinazlar arasında yer almaktadır. Mitotik büyüme faktörü sinyal yolağında kritik rolü vardır.	19p13.3
<i>SMARCB1</i>	(tümör baskılayıcı) kromatin yapılarının üzerindeki baskıyı hafifleterek transkripsiyonel faktörlerin hedeflerine daha etkili bir şekilde ulaşmasını sağlar.	22q11
<i>P/3Ky</i>	pi3 / pi4-kinaz protein ailesinde yer almaktadır. Hücre dışı sinyallerin modülatörüdür: E-kaderin-aracılı hücre-hücre adhezyonu ile aktifleşmektedir. Epitelin yapısal ve işlevsel bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadır.	7q22.3
<i>SPRED1</i>	Bu gen Ras/MAPK yolağında Ras'ın negatif regülatörü olarak görev almaktadır.	15q14

2.6. Mutasyon tespit teknikleri

NF1'de tumor oluşumunun moleküler mekanizmaları hakkındaki mevcut bilimiz halen sınırlıdır. Farklı hastalardan elde edilen tumor dokularında saptanan germline ve somatic mutasyonların karakterizasyonu, NF1 gen mutasyonunun tipi, doğası ve sıklığı hakkında bilgiler sağlamıştır. Bu araştırmalardan elde edilen veriler NF1'de ve NF1 ile ilişkili tümörlerde etkilenen ilgili biyolojik yolakların tanımlanmasında ve genotip-

fenotip ilişkilerini anlama yönünde önemli bir adımdır. Aşağıda, NF1 somatik ve germline mutasyon analizi için en sık kullanılan analiz yöntemlerinden (bizim araştırmamız dahilinde) bazılarına genel bir bakış yer almaktadır.

2.6.1. Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) (Multiple Ligation - dependent Probe Amplification)

MLPA, DNA ve RNA dizisinde oluşan doz değişimlerini saptayabilen bir yöntemdir. Bu yöntem multipleks PZR yöntemine dayalı bir teknik olarak belirtilmiştir. MLPA Tekniği ile nokta mutasyonları ve dengeli translokasyonlar ayırt edilememektedir. Ayrıca bu yöntemin hedefe yönelik olması ve daha az çözünürlükte tarama yapılması bu tekniği sınırlandırmaktadır (Bainbridge ve ark, 2011). Bir MLPA probu, hedef diziyile birleşen iki oligonükleotid dizisinden oluşmaktadır. İki probun DNA bölgesine bağlanması ayrıca hibridizasyonun gerçekleşmesi DNA da hedef dizinin olması anlamına gelmektedir. Bu aşamada probun iki kısmının arasında fosfodiester bağı oluşur. Sonrasında ligasyon işlemi ile bu iki oligonükleotid zinciri birleşerek reaksiyon gerçekleşir. Ligasyonu tamamlanan iki oligonükleotid zinciri prob multipleks PZR ile çoğaltılmaktadır. Tek bir çift PZR Primer ile hedef bölgeye hibridize olan MLPA problemleri çoğaltılıp ve amplikonlar elde edilir. Görüntüleme, ileri Primerdeki floresan boyanın varlığından dolayı kapilerel elektroforez sonrası yapılabilir. Çalışmada her prob için farklı boylarda oluşan diziler, aynı test tüpünde maksimum 50 farklı hedefin çoğaltılmasını ve birbirinden ayrılmasını sağlar. Bu yöntemde, veri analizi örneklerdeki hedef dizilerden elde edilen amplikonların dozu karşılaştırılarak yapılmaktadır (Schouten ve ark, 2002).

2.6.2. array-CGH

Array CGH (a-CGH), karşılaştırmalı genom hibridizasyon analizlerini, microarray teknolojisiyle birleştiren ve genomik dengesizlikleri DNA düzeyinde tanımlayan bir tekniktir. NF1 geni ile ilgili İlk olarak, Mantripragada ve arkadaşları, (2006) 17q11.2'de 2.24 Mb'lık bir bölgeyi kapsayan 183 prob içeren bir array geliştirmiştir (Mantripragada ve ark, 2006). Bu tekniğin esası floresan boyalı hasta ve farklı floresan boyalı olan kontrol DNAlarının cam slide üzerine immobilize olan bir DNA ile hibridizasyonuna dayanmaktadır. Böylelikle çok sayıda farklı genomik bölgelerde insanlar arasında varolan SNP ve CNV'ler karşılaştırmalı olarak incelenebilmiştir. CNV mutasyonları, hem klasik Mendel tipi hastalıklarda hemde kompleks hastalıklarda

gözlenmektedir. Gen anlatımını düzenleyen bölgelerde yer alan CNV'ler gen dozajının ve anlatımının olumsuz etkilenmesine neden olabilirken, genomun bazı bölgelerindeki CNV'ler belirgin bir fenotipe yol açmayabilir. CNV'ler çok sayıda geni, bir genin tamamını veya parçalarını, regulator elementleri içerebilir veya gen içermeyen bölgelerde bulunabilir. Array-CGH *NF1* geninde büyük yeniden düzenlemelerin saptanmasında ayrıca mikrodelyasyon tiplerinin ayırt edilmesi için önemli bir yöntemdir. array-CGH tekniğinin çalışmasında, izole edilen test DNA Cy5 (Siyanin5), control DNA Cy3 (Siyanin3) olmak üzere farklı renklerdeki florokrom boyalarla işaretlenir ve işaretlenen ürünler aynı anda slayt üzerine sabitlenmiş problerle hibridize edilmektedir. Hibridizasyon tamamlandıktan sonra non spesifik bağlanmaları uzaklaştırma amaçlı yıkama aşamasına geçilir. İşlemin devamında Array slaytları tarayıcı cihazına taratılır ve tarama işleminden elde edilen görüntülerin analizi çeşitli yazılım programları ile gerçekleştirilir (<http://www.agilent.com/genomics/protocolvideos>).

2.6.3. Sanger Dizileme

1977 yılında Maxam ve Gilbert'in kimyasal degradasyon ve aynı zamanda Sanger ile ekibinin zincir sonlandırma yöntemini keşfetmesiyle, DNA dizileme araştırmaları hız ve önem kazanmıştır. Dizileme yönteminin, DNA dizilerinin ortaya çıkmasının yanı sıra nonsense, missense ve splice site gibi nokta mutasyonlarının ve küçük insersiyonlar, delesyonlar ve SNP'ler gibi çok çeşitli mutasyonlarının tanımlanmasında önemli bir rolü vardır. *NF1* geninin analizinde, dizileme yöntemi tek başına %95'e kadar *NF1* germline ve somatik mutasyonları tanımlamak için yaygın olarak kullanılmıştır (Sanger ve ark, 1977).

NF1 gibi büyük genlerin dizilenmesinde en büyük dezavantajlarından biri, dizilemek için PZR'a bağlı yöntemler kullanarak kısa boyda dizilerin üretilmesine dayalı olmasıdır.

Sanger DNA dizileme yönteminin esası, dideoksinükleotid (ddNTP) analogları ile DNA zincirinin uzamasının sonlandırılması dayanmaktadır. Bu yöntem günümüzde altın standart olarak kabul edilmiştir (Sanger ve ark, 1977). Primer uzama aşamasında, normal nükleotidlerin (dNTP) eklenmesi ile yeni sentezlenen zincir elde edilir. Buna ek ddNTPlerin yeni sentezlenen zincire eklenmesiyle, her basamakta sentezi sonlanan fragmanlar elde edilir. Farklı uzunluktaki yeni sentezlenen ve sonlanan zincirler (Floresan işaretli), Kapiller jel elektroforezinde dizi uzunluklarına (boyutlarına) göre

ayrılır ve taşıdıkları floresan sinyallerle ölçülür. Sanger dizileme çalışmasında farklı mikro plakların her bir kuyusuna konulan farklı örnekler in aynı zamanda dizileme reaksiyonuna girmesi ve elektroforetik ortamdan izlenerek dizilenmesi mümkün olmuştur. Bu yöntem kapiler sistemlerin kullanılması ve bilgisayar sistemine entegre edilmesiyle gerçekleşmektedir.

2.6.4. Yeni Nesil Teknolojiler (Next Generation Technologies)

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin, NF1 hastalığı ile ilişkili tümörlerde, tümörigenez ve maligniteden sorumlu olan moleküler mekanizmalar hakkında önemli bilgiler sağlayabileceği düşünülmektedir.

2.6.4.1. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil Dizileme yöntemi, bir örnekten elde edilen DNA'nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak ve yüksek sayıda dizilenmesi esasına dayanır. Dizileme teknolojileri, genel olarak kalıp hazırlama, dizileme, görüntüleme ve veri analizi basamaklarından oluşmaktadır. Kalıp hazırlama aşamasında tek DNA molekülü klonal olarak çoğaltılmaktadır. Tek DNA molekülü çoğaltmak amaçlı iki farklı yöntem kullanılabilmektedir (Fan ve ark, 2006).

Emülsiyon PZR (Dressman ve ark, 2003) ve katıfaz amplifikasyonu klonal olarak çoğaltılmış kalıpların hazırlanmasında kullanılan en yaygın yöntemlerdir (Fedurco ve ark, 2006).

EmPZR, dışı yağ ve içi PZR reaksiyonununun gerçekleştirdiği reaktif sıvı ile dolu olan mikroskopik boncukların her bir tanesinde tek tip bir Primerin varlığında buna eşleşen kalıp DNA'nın klonal biçimde çoğaltılması yöntemidir. Katı faz amplifikasyon metodu cam bir slayt üzerinde fragment veya komplementer kalıplardan elde edilen rastgel birleşerek dağılmış ve klonal olarak çoğaltılmış kümelerin elde edilmesi timelin'e dayalıdır (Shendure ve ark, 2008).

Dizileme yöntemlerinin geri dönüşümlü zincir sonlanması, ligasyon bazlı, ve gerçek zamanlı dizileme gibi çeşitleri vardır (Metzker ve ark, 2010). Farklı platformlar hem kalıp hazırlama hem de dizileme aşamasında farklı yöntemleri kullanmaktadır.

Yeni nesildizileme ile elde edilen veriler, kısa okuma uzunluklarına sahip olduklarından dolayı, ileri biyoinformatik araçlarla bu kısa dizilerin referans genoma haritalanması ve ardışık olarak sıralanmasını gerektirmektedir. Kısa okuma uzunlukları (~400bp) nedeniyle YND yöntemleri tekrar dizilerinin, büyük delesyon ve duplikasyonlarını net

olarak tesbit edemez. Ayrıca dengeli translokasyonların kırık bölgelerin ampikon sınırları içinde bulunması durumuna bağlı olarak ayırt edilmesinde uygun bir metod değildir (Goodwin ve ark, 2015).

YND ile elde edilen varyantların çokluğu ve o varyantların anlamlandırılmasındaki zorluklar, ko-segregasyon analizleri, hedef bölgelerin motif veya GC baz içeriği açısından zengin olması gibi nedenlerden kaynaklı, düşük okuma alınan ampikonların yeniden taranması gerektirmektedir.

2.6.4.2. YND Teknolojisindeki Yeni Gelişmeler

YND, hedefe yönelik gen panelleri ile hastalıklarla ilişkili birçok genin eşzamanlı olarak dizilenmesini sağlar, ayrıca tüm ekzom dizileme (TED), tüm genom dizileme (TGD), ve ekspresyon çalışmaları için RNA dizilemesi ve metagenomik çalışmalar gibi çok çeşitli klinik ve araştırma alanlarında kullanılabilir. Genom dizileme, tüm genomun bütünüyle dizildiği, genomik bilginin en kapsamlı halini araştırmayı amaçlar. Eksom dizileme ise genin kodlayan ekzonlarını ve fonsiyonel elementlerini hedefleyen bir yöntemdir (Majewski ve ark, 2011). Her bir yöntem, sınırlarına ve üstünlüklerine bağlı olarak farklı durumlarda tercih edilmektedir.

2.6.4.3. Ion Torrent Platformu

Ion Torrent platformu, Yeni nesil dizileme yöntemlerinde en sık kullanan platformlardan biridir. Ion Torrent platformunda Kütüphane ve taslak hazırlama aşamaları; DNA'nın multipleks Primer lerle ampikon temelli çoğaltılması, elde edilen fragman uçlarının enzimatik olarak modifikasyonu (end repair) ve adaptörlerin bağlanması, adaptörbağlı Kütüphane ürünlerinin emülsiyon PZR ile çoğaltılmasından oluşmaktadır. Uçlarına adaptor bağı DNA fragmanları, üzerlerinde adaptor dizilerin tamamlayıcı bazlarından oluşan dizilerin kovalent olarak bağı bulunduğı boncuklarla eşleştirilir ve içerisinde PZR için gerekli reaktiflerin ve polimerazın bulunduğı yağ miçelleri oluşturularak her bir DNA fragmanı emPZR ile amplifiye edilir. Zenginleştirme aşamasında amplifiye edilmiş DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, yağ parçacıkları, reaktifler ve amplifikasyona katılmamış boncuklardan ayrıştırılır.

Ion Torrent Platformunda milyonlarca kuyucuğa sahip çip üzerinde dizileme yapılmaktadır. Dizileme sırasında ampikonlara dNTP bağlandığı anda ortama salınan H⁺ iyonları çipin altında bulunan iyon sinyal alıcısı tarafından algılanarak ham veriye dönüştürölmektedir (Merriman ve ark, 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Grubunun Oluşturulması

Araştırma grubumuz, 1990-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Genetik Bilim Dalı Polikliniği'nde muayene edilen ve önceden bildirilmiş tanı kriterleri doğrultusunda Nörofibromatozis tip1 tanısı kesinleşmiş ve çalışmaya dahil olmayı yazılı onayları ile kabul etmiş 18 yaş üstünde olan hastalardan oluşmaktadır. Bu hasta grubunda, YND ile tüm *NF1* gen analizi, Sanger analizi, MLPA ve array-CGH yöntemleri uygulandı. Çalışmada hastalığa neden olan mutasyonların saptanması ve genotip/fenotip ilişkilerinin ortaya konması araştırıldı.

Çalışmanın uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (30.06.2017, 825 sayı). Çalışmaya alınan hastaların çalışma konusunda bilgilendirmesi ve onayının alınmasından sonra anamnez, pedigrî çizimi ve fizik muayene yapıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hastaların klinik Değerlendirmeleri

Çalışmaya alınan hastaların anamnez ve fizik muayene bilgileri NF1 hastalarına ait oluşturulan forma göre değerlendirildi ve kaydedildi (bununla ilgili bilgiler sayfa 158). Pedigrî çizimi en az üç kuşağı kapsayacak şekilde yapıldı. Hasta fotoğrafları, diğer gerekli olan tetkikleri (ultrasonografi, MR, ekokardiyografi vd.) ve aboratuvar sonuçları (endokrinolojik, vd.) dosyalarına eklendi.

3.2.2. Moleküler Yöntemler

3.2.2.1. DNA Eldesi

Bu aşama hastalardan alınan 6 ml K3EDTA'lı periferik venöz kan (stril) numunelerinden yapıldı. İzolasyon *DNA Isolation Kit for Mammalian Blood*, Roche11796828001 KIT ile, firmanın uygun gördüğü protokole dayanarak yapıldı (**Tablo 3.1**).

Tablo 3.1 ROCHE Kit İle Dna İzolasyonu.

1. Hibridizasyon fırını +70°C'ye ayarlanır.
2. Elution buffer +70°C'ye konur.
3. 1,5 ml'lik ependorf içerisine:
➤ 200 µl Kan
➤ 200 µl Buffer (2-Yeşil Kapak)
➤ 40 µl Proteinaz K
4. Vortekslenerek, 10 dk+70°C'de bekletilir.
5. Üzerine 100 µl izopropanol eklenir ve iyice çalkalanır.
6. Filtreli (spin column) tüpe aktarılır.
7. <u>8000 rpm'de 1 dk</u> santrifüj edilir.
8. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
9. Üzerine 500 µl 4a (Removel Buffer-Siyah Kapak) konur.
10. <u>8000 rpm'de 1 dk</u> santrifüj edilir.
11. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
12. Üzerine 500 µl 4 (Washing Buffer-Mavi Kapak) konur.
13. <u>8000 rpm'de 1 dk</u> santrifüj edilir.
14. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
15. Üzerine 500 µl 4 (Washing Buffer-Mavi Kapak) konur.
16. <u>8000 rpm'de 1 dk</u> santrifüj edilir.
17. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
18. <u>14000 rpm'de 15 sn spin yapılır.</u>
19. Toplama tüpleri atılır. Altlarına 1,5 ml'lik ependorf konur.
20. Spin column tüplerde filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 100 µl Elution buffer eklenir.
1. <u>8000 rpm'de 1 dk</u> santrifüj edilir.
2. Filtreye takılı DNA aşağıya geçer.
3. DNA elde edilmiş olur.

3.2.2.2. DNA Kalitesinin Değerlendirilmesi, Seyreltmesi Ve Ölçümü

Hastalardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, elde edilen örneklerin kalitesi, konsantrasyonu ng/μL, absorpsiyon değeri ise (A260/280~1,80-1,89) spektrofotometrede ölçüldü (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). Kullanılacak olan DNA konsantrasyonu YND tekniği için 1,6-2 ng/μl olacak şekilde MmiliQ su ile seyreltilti. Hedef konsantrasyona ulaşan DNA'lar YND yönteminde kullanılmadan önce ölçülmeye alındı. Seyreltilmiş DNA'lar önce kalibrasyon ölçümüne alındı. Bunun için dsDNA HS Assay Kit'te var olan standart 2 farklı örnek kullanılarak, kalibrasyon ölçümü yapıldı. Çalışmanın bu kısmında herbir standart örnek için 199 μL Qubit® dsDNA HS Buffer ve 1 μL Qubit® dsDNA HS Reagent kullanılıp, solüsyonu kullanılacak hale geldi. 10 μL standart +190 μL hazırlanan solüsyonu karıştırılarak 2 dakika inkübe edildi (oda sıcaklığında). Sonrasında Qubit®3.0 Florometrede karışımdan ölçüldü. Kalibrasyon ölçümü yapıldıktan hemen sonra, her 1 örneğe aynı şekilde hazırlanmış solüsyonu kullanılarak istenilen karışım (198 μL solüsyon+2μL seyreltilmiş olan DNA) çalışmaya hazır hale geldi. Ölçüm öncesi karışımımız iki dakika oda sıcaklığına bırakıldı. DNA'ların konsantrasyonu (1,6-2 ng/μL) aralıkta oluncaya kadar aynı işlem defalarca tekrar edildi.

3.2.2.3. YND Yöntemi ile NF1 Gen Analizi

YND tabanlı NF1 gen çalışması Ion Torrent PGM platformunda gerçekleştirildi. İlk başta OMIM, HGMD gibi profesyonel veritabanlarını kullanarak, Neurofibromatozis tip1 kliniği ile genotip-fenotip ilişkisi kesin olan NF1 genihedef olarak seçildi. NF1 geni: (17q11.2, NM_001042492.3). Bu genin NM_001042492.3 transkriptlerinin kodlayan var olan ekzonik, 5-10 bazlık intron ve ekzon ve derin intronik sınırları, 5'UTR, 3'UTR bölgeleri dikkat edilerek araştırıldı. Yeni nesil dizileme tabanlı panel gen çalışması Ion Torrent PGM platformunda yapıldı.

Primer Havuzlarının Oluşturulması

Hedef bölgenin tamamı için, Ion Ampliseq sistemi kullanılarak (<https://www.ampliseq.com>) özgün Primer tasarımı yapıldı.

Kütüphane Hazırlanması

Bu amaçla Life Technologies'in, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 protokolüne uygun şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, Ion Xpress Barcode Adapters Kit ile barkodlandı. Daha sonra ürünlerin saflaştırılma işlemi % 70'lik etanol ve Agentcourt AMPure XP reagent kullanılarak firma protocollerine uygun bir şekilde yapıldı.

Hedef DNA Bölgelerinin Çoğaltılma İşlemleri

Bu bölgelerin çoğaltılması, iki değişik Primer havuzu kullanarak gerçekleştirildi. Her örnek için tabloda gösterildiği gibi iki değişik karışım hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Farklı primer havuzu (2X) için hazırlanan karışım.

Malzeme	Miktar
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	4 µl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	10 µl

Polimeraz zincir reaksiyonuun gerçekleşmesi için Tablo 3.3'de gösterilen iki değişik karışım hazırlanıp kullanıldı. Tabloda gösterildiği gibi örnek başına *pool 1* ve *pool 2* koşulu ile iki ayrı (farklı) solüsyon hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Kütüphane PZR için hazırlanan karışım.

2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks	14 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	6 µl
Total hacim	20 µl

MicroAmp® adhesive film kullanarak plate kapatılıp daha sonra vortekslendi. Vortekslendikten sonra kısa süreli santrifüj yaparak örnekler çöktürüldü. Bu işlem tamamlandıktan sonra hedef bölge amplifikasyonu (PZR) Tablo 3.4'teki termal döngü programına göre yapıldı.

Tablo 3.4 Hedef bölge amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.

Basamak	Adım	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	Enzimi aktiveştirmek için Denatürasyon	99 °C	2dk
Döngü	Bağlanma ve Uzatma	99 °C	15sn
Bekleme	-	60 °C	4dk
Döngü sayısı	19 tekrar(<i>amplikon sayı esas alınarak belirlenir</i>)	10 °C	Tutma

Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi

İki değişik primer havuzu kullanarak toplam final hacim 20 µL olacak şekilde Amplifiye edilmiş her bir DNA örneklerinden 10'ar µL kullanıldı. Final birleştirilmiş Amplifiye edilen ürünlere 2 µL FuPa Reagent eklenip MicroAmp® adhesive film ile plate kapatıldıktan sonra vortekslendi. Vortekslendikten sonra kısa süreli santrifüj yaparak örnekler çöktürüldü. Bu işlem tamamlandıktan sonra Hedef bölge amplifikasyonu (PZR) Tablo 3.5 teki termal döngü programına göre yapıldı.

Tablo 3.5 PrimerDizilerinin Kısmen Kesilme aşamasında kullanılan termal döngüprogramı.

Sıcaklık	Süre
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

Adaptörlerin Bağlanması Ve Ion Express TM Barcode İle Barkodlanması

Tablo 3.6'da gösterildiği gibi her barkod ve Ion P1 Adapterü, 1:4 orana gelmesi ve seyreltilmek üzere su ile karıştırıldı (nukleazdan arındırılmış olan su kullanılmalı).

Tablo 3.6 Barkod-adaptör karışımı.

İçerik	Hacim
Ion P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress TM Barcode X ¹	2 µl
Nukleazdan arındırılmış su	4 µl
Toplam hacim	8 µl

¹: Seçilmiş barkod

Primer dizilerinin kısmen kesilmesi için yapılan işlem sonrasında elde edilen her 22 µL ‘lik ürün için, Tabloda gösterildiği miktarlarda Switch solüsyonu, barkod veadaptor karışımı, DNA Ligaz eklendi (Tablo 3.7). Daha sonra plate MicroAmp® adhesive film ile kapatılıp sonrasında vortexlendi. Vortex yaptıktan sonra damlacıkları toplamak amaçlı yapılan ksa süreli santrifüj aracılığı ile çöktürüldü. Barkod adaptorlere yapılacak olan ligasyon işlemi Tablo 3.7’de gösterilen termal döngü programını kullanmak amaçlı cihaza yerleştirildi.

Tablo 3.7 Barkod-adaptör ligasyon karışımı ve termal döngü programı.

Malzeme	Hacim
Switch solusyonu	4µl
Barkod-Adaptör Karışımı	2µl
DNA ligaz	2µl
Toplam Hacim (22 µl ürün ile birlikte)	30 µl

Sıcaklık	Süre
22 C	30 dk
72 C	10 dk
10 C	Bekleme (1 saate kadar)

Barkodlanan Kütüphane ürünlerinin ligasyon işleminden sonra enzimlerin ve DNA materyalinin uzaklaştırması için saflaştırılma aşamasına geçildi.

Barkodlanmış Olan Kütüphane Ürünlerinin Purifikasyon Aşaması

Bu aşama Agencourt® AMPure® XP Reagent ve %70'lik etanol kullanılarak yapıldı. Toplam final hacminin 1.5 katı olmak üzere her bir örneğe 45 µL Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi. Daha sonra pipetleyerek karıştırılıp ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada plate (örnekleri içeren) manyetik bir rafa (DynaMag™-96 Side Magnet) alındı. Manyetik raf üzerinde olan solüsyon şeffaflaşmaya kadar (~2 dakika) oda sıcaklığında bekletilip ve böylece inkübe edildi. 2 dakika bitince supernatant uzaklaştırılıp sonrasında örnekler 150 µL hazırlanmış olan % 70lik etanol karıştırıldı. Barkodlanmış ampliconları içeren plate, manyetik özellikte olan raf üzerinde iki yana hareket ettirildi. Böylece ürünün bağlanmış olduğu manyetik boncuklar etanol ile yıkanıp uzaklaştırıldı. Ardından supernatant atıldı. Bu işlemi ikinci defa için tekrarladıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve bu şekilde alkol tamamen uzaklaştırılmış oldu. Bu işlem bittikten sonra normalizasyon aşaması Kütüphane ürünleri için gerçekleştirildi. Amplifiye edilmiş Kütüphaneler Qubit® 2.0 Fluorometer cihazında ölçüldü.

Saflaştırma Aşamasından Sonraki Aşamalar (Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçüm Ve Sulandırma Faktörünün Hesaplanması)

Oluşan Kütüphanenin çoğaltılma ve Saflaştırması işlemi Platinum® PZR SuperMix High Fidelity ile yapıldı. Ardından Kütüphane Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı ile ölçüm yapıp ve taslak reaksiyonu için hazırlıkları yapıldı.

ölçümden sonra, Ion Template Kit kullanımı için sulandırma faktörünün konsantrasyonu ~15-22 ng/mL olacak şekilde düşünüldü. Daha sonra plate (Kütüphane içeren) magnetten alındı ve 50 µL Platinum® PZR Super Mix High Fidelity ve 2 µL Library Amplification Primer Mix bead pelletlerin tümüne eklendi. Ion Ampliseq™ Kütüphanesi içeren plate MicroAmp® adhesive film ile kapatıldı. Daha sonra kısa süreli santrifüj yaparak çöktürüldü. Daha sonra plate 2 dakika magnet üzerine alınıp ve bekletildi. 2 dk bittikten sonra ~50 µL e pelletten ayrılan süpernatant alınıp ve kullanılmamış bir plate içine aktarıldı. Daha sonra plate Termal döngü cihazına kondu (Tablo 3.8).

Tablo 3.8 Kütüphanenin amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.

Evre	Sıcaklık	Zaman
Tutma	98 °C	2 dk
5 Döngü	98 °C 64 °C	15 sn 1 dk
Tutma	10 °C	Tutma

Saflaştırması Agencour® AMPure® XP Reagent ile iki aşamada gerçekleştirildi:

İlk Aşama için gerçekleştirilen protocol:

.5X örnek hacmi olmak üzere 25 µL Agencourt® AMPure® XP Reagenti platin kuyularına eklendi. Pipetaj yaparak DNA ile beadler suspense oldu. Plate daha sonra MicroAmp® adhesive film kullanarak kapatıldı. Kapatılan plate oda ısısında 4-5 dakika inkubasyona bırakıldı. Platin içindeki solüsyon berraklaşana dek magnet üzerine bırakıldı. Bu süreç en az 5 dakika olmak üzere devam etti. Daha sonra Süpernatant pelletten ayrıldı. Bu aşamda her kuyuda olan supernatant kullanmamış olan platein tek bir kuyusuna aktarıldı. Yeni kuyadaki supernatant çalışmada kullanılması gereken amplikonları içermektedir.

ikinci Aşama için gerçekleştirilen protocol:

protocolun birinci aşamasında elde edilen supernatanta 60 µL Agencourt® AMPure® XP Reagent eklenip ve böylece örnek hacmi 1.2x olarak kayd edildi. 5-6 defa pipetaj sonrası DNA ile bead suspense edildi. Daha sonra MicroAmp® adhesive filmi kullanarak plate kapatıldı. Sonrasında karışım 5 dakika oda sıcaklığına bırakıldı. Platein içinde olan solüsyon berraklaşana dek magnet üzerine alındı. Bu aşmada supernatant pelletten ayrılıp, atıldı. Sonrasında amplikonların beadlere bağlanarak oluşturdukları pellet saklandı. Bu aşamada solüsyon berraklaşana dek (az 3 dakika) magnet üzerine konulup bekletildi. Süpernatant berraklaştıktan sonra pelletten ayırıp daha sonra atıldı. İşlem sonucunda beadlere bağlanmış olan amplikonların oluşturduğu pellet saklanır. 150 µL hazırlanmış olan %70'lik etanol tek tek kuyulara eklenip, plati magnet

üzerinde kenarlara doğru hareket ettirerek magnet beadleri yıkandı. Süpernatant pelletten ayrılıp ve atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Dikkat edilmesi gereken nokta etanol damlalarının tamamının kuyulardan ayrılmasıdır. Bu sebepten dolayı beadler 5-6 dakika magnet üzerinde aşırı kurutulmama şartıyla hava kurutmasına bırakıldı. Daha sonra magnetten alınan platein üzerine 50 μ L e kadar LowTE eklendip ve MicroAmp® adhesive film ile kapatılıp kısa süreli santrifüj yapıldı. Bu aşamada supernatant istenilen ampliconları içermektedir. Sonrasında 2 dakika kadar Plate magnetin üzerine konuldu. Bu aşama bittikten sonra Qubit® 2.0 fluorometre ile Kütüphane ölçümü yapıldı. Amplifiye edilmiş her kütüphaneden 10 μ L e kadar Qubit® 2.0 Fluorometer ve Qubit® dsDNA HS Assay Kit kullanılarak analiz edilir. Amplifiye edilmiş kütüphane genel olarak 300–1500 ng/mL yoğunluktadır. Amplicon yoğunluğunu belirlemek için:

- a) Çalışma için sulandırma işlemi, Qubit® dsDNA HS, Qubit® dsDNA HS Buffer kullanılarak 1:200 oranında gerçekleştirildi.
- b) Çoğaltılmış Ion Ampliseq™ kütüphanesinden 10 μ L e kadar alıp, 190 μ L boyalı reaktif ile karıştırılıp daha sonra 2 dk kadar inkübe edildi.
- c) İnkubasyon sonrası Qubit®2.0 Fluorometerde karışımın konsantrasyonu ölçüldü ve belirlendi.
- d) sonrasında 20 ile çarpılarak dilue edilmiş kütüphanenin yoğunluğu hesap edildi.

İşlem otomatik olarak Qubit ölçüm cihazında hesaplandı. Örnek hacmi 10 μ L olacak şekilde girildi. Qubit ölçüm cihazında Calculate Stock Concentration seçeneği bu işlem için kullanılır. Dilue edilen amplicon (kütüphane) ~100 pM kadar belirlenip ve amplicon birleştirme aşaması başlatıldı (taslak hazırlama).

Taslak (Template) Hazırlanması

Yoğunlukları eşit hale getirilmiş Kütüphanelere emülsiyon esaslı PZR işlemi yapıldı. Her bir amplicona tek bir beade bağlanarak yağ küreciği içerisinde klonal olarak çoğaltıldı. Bu işlem için önce taslak oluşturma protokolü yapıldı.

Emülsiyon PZR

Yoğunlukları eşit düzeye gelmiş Kütüphaneler aşağıdaki Tabloya göre dilue edildi (Tablo 3.9).

Tablo 3.9 Kütüphane seyreltilmesi.

	Ion AmpliSeq™ DNA Kütüphanesi	Ion AmpliSeq™ RNA Kütüphanesi	gDNA Fragment veya Amplikon Kütüphanesi	Ion Total RNA-Seq kütüphanesi
Kütüphane konsantrasyonu	100 pM	100 pM	100 pM	100 pM
Kütüphane hacmi	2 µL	4 µL	6.5 µL	5 µL
Nükleazdan arındırılmış suyun hacmi	23 µL	21 µL	18.5 µL	20 µL
Amplifikasyon solüsyonuna eklenecek total seyreltilmiş kütüphane hacmi	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

2 µL Alınan Kütüphane ürününe nükleazdan arındırılmış su ekleyip final hacim 25 µL'ye tamamlandı. 12pM 'e dilue edilen Kütüphane ürünlerine (amplikon) Tablo 3.10'da gösterildiği gibi Emülsiyon PZR yapılması için çözelti hazırlandı.

Tablo 3.10 Hazırlanan emPZR çözeltisi.

Malzeme	Hacim
Ion PGM Template Hi-Q™ View Reagent Mix	800 µl
Ion PGM Template Hi-Q™ View Enzyme Mix	50 µl
Nükleazdan arındırılmış su	25 µl
Seyreltilmiş kütüphane	25 µl
Toplam hacim	900 µl

Hazırlanan amplifikasyon çözeltisi vortex yaparak karıştırıldı. Daha sonra, üzerine 100 µL Ion PGM Template Hi-Q™ View Ion Sphere Particles eklenip ve böylece final hacim 1000µL olarak kaydedildi. Yapılan çözelti vortexlendikten sonra karışımın Ion

PGMO neTouchPlus Reaction Filter Assembly'e yüklendi. Filtreleme sonrasında 2 kez (850+850 µL olma kaydı ile) reaksiyon yağı konuldu. Daha sonra Ion OneTouch 2 cihazı kullanarak em PZR gerçekleştirildi.

Em PZR Ürünlerinin Zenginleştirme Aşaması

Emülsiyon PZR işlem bittikten sonra ampikon yüklü partiküllerin çöktürülme amacı ile 10 dakika santrifüj yapıldı. Bunun ardından her iki tüp teki supernatant kısım uzaklaştırıldı. Bu işlem ürünün final hacmi 100µL olacak şekilde gerçekleştirildi. Dipe çöktürülmüş olan ürünlerin üstlerine 500 µL yıkama solüsyonu olan IonOne Touch ilave edildi. Pipetaj sonrası her iki tüpten elde edilen ürünler, yeni bir ependorf tüpte birleştirildi. Bu aşamada birleştirilmiş ürünler 2,5 dk santrifüj edildi. Sonrasında supernatant, renkli görülen pelletten çekilip atıldı. Bu işlemden sonra öncelikle çözeltiler hazırlanır.

Melt-Off Çözeltisinin Hazırlanma Aşaması

Melt-Off çözeltisi, 1M NaOH+Tween®Solution kullanarak yapıldı. Çözeltinin son konsantrasyonu; 125 mM NaOH+%0.1 Tween® 20deterjan+280 µL Tween® Solution +40µL 1M NaOH birleştirilip 320 µL olarak hazırlandı.

StreptavidinC1 Boncuklarının Yıkama Aşaması

DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads karışımından 13 µL alınıp tüpe aktarıldı. Ependorfta bulunan karışım, DynaMag™-2 Magnet' e alınıp oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Bu işlemle boncuklar ependorf duvarına yapıştı. Ependorftaki supernatant dikkatlice alınıp döküldü. İşlemin devamında ependorf'a 130 µL MyOne™ Beads Wash Solution eklendikten sonra ependorf tekrardan manyetik özellikteki raftan kaldırıldı. Rafın üzerinde pipetaj ile eklenen MyOne™ Beads Wash Solution karıştırıldı. Bu aşamadaki yapılan işlemler stok çözeltiden Streptavidin C1 boncuklarının arınmasını sağladı. Tüm hazırlanan çözeltiler ve emPZR ürünü, Tablo3.11'deki gibi 8 Kuyulu levhaya yüklendi. Yükleme aşamasının devamında zenginleştirme işlemi gerçekleştirildi. Bunun için IonOneTouch™ ES cihazına yerleştirildi. Zenginleştirme işleminden sonra oluşan ürün üzerine 10µL nötralizasyon

çözeltisi eklenip cihazakonulur.

Tablo 3.11 Zenginleştirme aşamasındaki yapılan işlemler.

Kuyu Numarası	Yüklenen malzeme
Kuyu 1	Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)
Kuyu 2	DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl)
Kuyu 3	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 4	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 5	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)
Kuyu 8	Boş

Zenginleştirme reaksiyonu bitince ürün çipe yüklendi.

Zenginleştirilmiş Olan Ürünlerin Dizilenmesi

Dizileme işlemi Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit ile yapıldı. Ion PGM dizileme cihazına uygulanan kalibrasyon ve yıkama sonrası zenginleştirilmiş ürünler Ion 318™ Chip v2'ye yüklendi. Tablo 3.12'de gösterildiği şekilde Kit, barkod ve analiz için program ve ek program bilgileri oluşturulup daha sonra dizileme başlatıldı.

Tablo 3.12 Dizileme planı.

Ion Reporter	Version: 5.6
Örnek	DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion reporter iş akışı	DSD_workflow v2
Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Template Kiti	Ion PGMTM Hi-QTM View OT2
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit
Çip Tipi	Ion 318™ Chip v2
Barkod	IonXpress

Referans Kütüphane	Hg 19 (<i>Homo sapiens</i>)
Eklentiler	Coverage analysis FileExporter, RunTransfer, variantCaller (germline_low_stringency)
proje	NF1

veri Analizi

Bu aşamada verilere ait BAM dosyaları, Torrent Server yazılımına aktarıldı. Daha sonar IonReporter 'de analiz akış şeması, gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, oluşturuldu. Çalışmada her hasta, bu akış şemasına dayanarak analiz edildi. hastalarda saptanan varyantlar birçok veritabanlarında araştırıldı. Fenotip ile uyumlu bulunan variantlar hem hastada hemde ailede Sanger dizileme ile tarandı.

3.2.2.4. Sanger Dizileme Çalışması

Çalışmanın Sanger dizileme bölümünde hastalarda tesbit edilen varyantların doğrulanması ve segregasyon çalışmalarının yapılması amaçlı hedefe özgün perimerler tasarlanıp sentezlendi. Ayrıca bu çalışmanın YND bölümünde kapsanmayan bölgeler belirlenip ve bu yöntemi uygulanarak incelendi.

Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması

Sanger dizileme için primerlerin tasarlamasında dikkat edilen önemli noktalar; seçilen Primerlerde, dbSNP veri tabanında daha önceden saptanmış SNP'lerin olmamasıdır. Ayrıca bu bölgeler, tekrarlayan dizi içermemelidir. Primerin tasarlandığı bölgelerde ileri, ger Primerlerin bağlanma ısıları birbirlerine yakın olmamalıdır. Primerlerin içerdiği purin ve primidinler mümkünse eşit dağılımı ve boyut olarak 17 nükleotid'den az ve 24 nükleotid'den fazla olmamasına dikkat edilmelidir. Tasarlanan primerlerin gen bölgesinde beklenen varyantları analiz edilmesine ve varyantların bulunduğu bölgeleri kapsamamasına (dizi analizinde varyantın olduğu bölgeye en az ~30-50 bazın iyi okunamayabileceği göze alınmalı) dikkat edildi. Özgünlük farklı veritabanlarında test edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu reaksiyonların yapılması, PZR master miks (Thermo Scientific), ileri ve geri Primerler (Thermo Scientific) 0,8 μ M olacak şekilde kullanıldı ayrıca bu reaksiyon için gDNA 20-30 ng olacak şekilde hazırlandı. Belirtilen reaksiyon karışımı bidistile su kullanarak 25 μ L ye tamamlanıp hazır hale geldi. PZR çalışmasında aynı anda, DNA içermeyen ve DNA'nın çalıştığından emin olduğumuz örneklerle birlikte çalışılmasına özen gösterildi. PZR programı tablodaki gibi uygulandı (Tablo 3.13).

Tablo 3.13 Hedef Bölgelerin Çoğaltılmasında Kullanılan Termal Döngü Programı.

	Sıcaklık	Süre
	95°C	4 dk
Döngü (35 X)	95°C	1 dk
	64°C	0:30 sn
	72°C	1 dk
	72°C	5 dk
	4°C	∞

İşlem devamında PZR ürünlerinden 5 μ L ve ürünün paralelinde 50 bç lik merdiven markörü (Sigma), 8 μ g/ml etidyum bromür içeren %2'lik agaroz (Sigma) jelde, 120 Voltda, 70 dk yürütölüp ayrılması sağlandı. Daha sonraa ultraviyole ışık altında ayrılan bantların görüntüsü alındı.

PZR Saflaştırılma Aşaması

Elde edilen PZR ürünleri, dizianalizi yapılmadan önce saflaştırıldı. Bu saflaştırma enzimatik yöntemi kullanarak gerçekleştirildi. Saflaştırması Exonuclease-I (Lot:00173016- Thermo Scientific) ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001- Roche) enzimleri ile sağlandı. Termal döngü cihazında 37 °C ısıda 30dak, 85°C de 15dak kadar ve sonunda 4°C ye varıncaya kadar bekletildi.

Dizi Analizi

Analiz ABI3500 otomatik elektroforez (Applied Biosystem) ve dizi analiz işlemi termal döngü cihazlarında gerçekleştirildi.

Dizi PZR Reaksiyonu

Saflaştırılmış PZR ürününün **dizi PZR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için** Big Dye Buffer 5X tampon solüsyonu (gerekli kimyasalları içerir), Big Dye v3.1 (gerekli ddNTP + Ampli TaqDNA polimeraz) kullanıldı. Bu karışım üzerine dH₂O ilave ederek final hacmi 10 µL olup ve plate (plate–USA Scientific-800-522-8477) üzerine aktarıldı. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için hazırlanan karışım, termal döngü cihazına alındı. 96°C ısıda 10sn kadar, 50°C ısıda 5sn, 60°C ısıda 4 dk olacak şekilde 25 döngüde yapıldı. Sonrasında 4°C ısıya düşen cihazdan ürünler alındı.

Dizi PZR Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılma Aşaması

Önceki işlem bitince reaksiyonda kullanılmayan Primer ve kimyasalların arınması amacıyla plateteki her ürüne 1µL %2’lik glikojen+1µL 3M sodium asetat +1µL 125mM EDTA+25µL %100 etanol (soğuk olma koşulu ile) ilave edildi. Ardından plate seal ile kapatılıp ve oda ısısında 15 dakika bekletildi. 15 dakikalık bekleme aşaması bittikten sonra 3810 rpm hızda 45 dakikalık santrifüj edildi. Daha sonra platein üzerindeki koruyucuyu alınıp ters çevrilerek 1100 rpm hızda 30sn santrifüj yapıldı. Santrifüj bittikten sonra kuyucuklara %70’lik etanoldan 35µL ilave edildip kapatıldıktan sonar 3460 rpm hızda 15 dakika kadar santrifüj edildi. Santrifüj bittikten sonra plateten koruyucu alınıp ters çevrilerek 1170 rpm hızda 60 sn kadar santrifüj edildi. Ardından kuyucuklara 10µL HiDi formamid eklendi. Örnekler denatürasyon amaçlı 95 °C ısıda 5 dakika kadar sonrasında 2 dk kadar buzda bekletildi. Sonrasında saflaştırılmış plate yürütme amacı ile ABI3500 cihazına yerleştirildi. İşlemden elde edilen FASTA dosyası bilgisayar ortamında analiz edildi. Bunun için ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v.3.0 (34) programları kullanıldı.

Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İşlemden elde edilen FASTA dosyası bilgisayar ortamında analiz edildi. Bunun için ABI Sequencing Analysis v5.4 SeqScape v.3.0 (34) programları kullanıldı. Analizden önce SeqScapev.3.0 programına referans dizi ve ardından olgu dizisi yüklenerek karşılaştırmalı bir şekilde analize başlandı. Çıkan variantlar NCBI+ SNP+ENSEMB+Gene SNP View+HGMD’ye göre programda işaretlenerek belirlenip, araştırmanın sonuçları ile kıyaslandı.

3.2.2.5. MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Çalışmamızda MLPA testi, SALSA® MLPA® Probemix P081-D1 (Lot D1-0617) NF1 mix1 & P082-C2 (Lot C2-0317) NF1 mix2 Kitleri ile uygulandı. MLPA kitlerinin NF1 tüm gen (NM_000267.3) ile ilgili bölgelerde delesyon/duplikasyon araştırılması gerçekleştirildi.

MLPA Çalışması

Bu işlem ortak bir PZR protocolü kullanarak DNA Engin (BIORAD)-T100 termal döngü cihazında yapıldı. İşlemin devamında (Lize 500(GS500-250) size standardı kullanarak, Kapiller elektroforez cihazında fragman yürütülmesi başlatıldı.

MLPA Çalışmasında Hibridizasyon Aşaması

Denatürasyon işlemi yapılmadan, stok DNA'nın yoğunluğu 30 ng/μL olana kadar seyreltilmesi gerekmektedir. Bunun için DNA ~25 μL TE tampon içerisinde çözündürüldü sonrasında gereken hacim oluşturuldu. İşlemin devamında SALSA Probmixs ve SALSA MLPA tampon, Prob Kitinden çıkartılıp ve oda ısısında çözülmeye bırakıldı. Çözöldükten sonra tampon vortexlenerek karıştırıldı ve kısaca santrifüj yaparak çöktürüldü. Her bir örnek DNA'nın üzerine 5μL DNA çözeltisi eklendi. Bu aşamada 98°C'de 5 dakika kadar termal döngü cihazında denatürasyon işlemi yapıldı. Önce farklı örnekler için 1,5 μL MLPA tampon ve 1,5 μL prob olma koşuluyla karışım hazırlandı. Daha sonra tüpler 25°C'de cihaz üzerinde beklerken aynı anda 3 μL yapılan karışımdan eklendi. Dağıtım işlemi pipetaj yaparak ve iyice karıştırarak gerçekleştirildi. Karıştırıldıktan sonra prob denatürasyonu yapıp (95°C de 1 dakika) daha sonra hibridizasyon işleminin sağlanması amacı ile 37 °C de 16 saat, cihazda bekletildi. Hibridizasyon bittikten hemen sonra ligasyon aşaması başlatıldı.

Ligasyon Aşaması

Bu aşamada önce kimyasalların hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla dondurucuda saklanan Ligasyon tampon A ve Ligasyon tampon B oda ısısında çözödürüldü. Ardından farklı örnekler için karışım hazırlandı. Bu karışım 25 μL dH₂O+3μL tampon A+3μL tampon B+1μL Ligaz 65 enzimi kullanarak yapıldı. İşlemin bu aşamasında Termal döngü cihazını 54°C'de ayarlayıp ve o sıcaklığa gelene kadar farklı tüplere 32

μ L ligasyon karışımı ilave edildi ve 15 dakika cihazda bekletildi. Bu aşamadan elde edilen ürün 4°C de saklandı.

MLPA'de PZR Aşaması

Bu aşama için dondurucuda bekleyen SALSA PZR tamponu, FAM boyalı olan SALSA PZR Primeri çıkartılıp ve çözündürüldü (PZR karışımı hazırlanırken, Primerler floresan işaretli olduğundan ışığa maruz kalmamasına dikkat edildi). PZR aşamasının gerçekleştirilmesi için önce her örnek için ayrı bir tüpe 7,5 μ L dH₂O +2 μ L SALSA PZR Primeri ve 0,5 μ L SALSA polimeraz enzimi ilave edilip ve iyice pipetaj yapılarak homojen bir hale geldi. Hazırlanan bu karışımdan 10'ar μ L Ligasyon ürünlerinin üzerine ekleyip ve pipetaj ile karıştırıldı. 20°C'de bekleme aşamasındaki termal döngü cihazı, sonraki basamağa geçmesi amaçlı ayarlandı. Cihaz 95°C'de 30 saniye , 60°C'de 30 saniye ,72°C'de 60 saniye , 72°C'de 20 dakika ve 4°C'de bekleme aşamalarında 35 döngü olarak ayarlandı. 35 döngünün sonuna gelen örnekler Kapiller elektroforez cihazına yükletilip ve böylece fragmanların yürütülmesi başlatıldı.

Kapiller Elektroforez Cihazı İle Fragmanların Yürütülmesi

Bu aşamada yürütülecek her bir örnek için 0.2 μ L LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9.5 μ L formamid (Highly Deionized- HiDi) karışımı hazırlanıp ve örnek başına 9,7 μ L ilave edildi (herbir kuyu içine). Bu işlem Kapiller elektroforez cihazına uygun plate kullanarak (USA Scientific-800-522- 8477) gerçekleştirildi. Daha sonra eklenen karışımın üzerine olgu numaralarına göre 0,3 μ L PZR ürünü, plate kuyularına aktarılıp ve uygun septayla (AB Applied Biosystems-182901S9R) kapatıldı. Kapatılan plate, santrifüjde (BIOSAN LMC300) 4000 rpm de 2 dakika çevrilerek çöktürüldü. Sonrasında plate ABI3500 cihazına yerleştirilip Kapiller elektroforez cihazında fragmanların yürütme işlemi başlatıldı. fsa formatındaki ham veri Coffalyser.net (v.1400701.0000) programında değerlendirildi.

Verilerin Analiz Aşaması

veri analizi için Kapiller elektroforez cihazından fsa formatında elde edilen fragmanlar Coffalyser.Net (MRC-Holland) programına tanıtıldı. Bu veriler tanıldıktan sonra

programa aktarıldı. Bu programda gerekli olan analiz ayarları, örnek türü, prob türü, Kitin Lot numarası ve analiz türü, yapılp ve örnekler yüklendi. Analiz aşamasında referans örnekler seçilerek, öncesinde fragman analizi ve sonrasında karşılaştırmalı istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Analiz sonrası pik değeri araştırıldı ve daha sonra bar grafikleri değerlendirilmesi yapıldı. İşlem sonucunda kopya sayısı değişiklikleri araştırılarak tanımlandı.

3.2.2.6. array-CGH Çalışması

a-CGH, hasta ve referans DNA'nın işaretlenmesi, hibridizasyonu, yıkama ve daha sonra tarama ve analiz aşamalarını içeren bir çalışmadır.

Hasta Ve Referans DNA'nın İşaretlenmesi ve Hibridizasyon Aşamaları

Çalışmanın her örnek için 500 ng DNA olacak şekilde gerçekleştirildi. Kan numunelerinden elde edilen DNA'ların konsantrasyonları 500'e bölünüp, çıkan değer nucleasadan arındırılmış su ile 20,2 μL 'ye tamamlanarak, her bir hasta için PZR tüplerine, konulur. Aynı zamanda kontrol DNA'larından 2,5 ng/ μL alınıp nucleasadan arındırılmış su ile 20,2 μL 'ye tamamlanarak, PZR tüplerine, konulur. Daha sonra başka bir ependorf tüpte, digestion mix karışımı tablo 3.14'de gösterildiği konsantrasyonlarda hazırlanır. Hazırlanan digestionmix'ten 5,8 μL hastalar ve kontroller için hazırlanan tüplere konulup elle yavaşça karıştırılıp ve sonrasında santrifüj edilir. Digestion mix içeren tüpler PZR cihazına konulur (Tablo 3.15).

Tablo 3.14 Her bir hasta için hazırlanan Digestion mix karışımı.

Nücleazdan arındırılmış su	2 μl
10X Restriction Enzyme Buffer	2.6 μl
BSA	0.2 μl
Alu I	0.5 μl
Rsa I	0.5 μl
Final hacim	5.8 μl

Tablo 3.15 Digestion mix içeren tüplere uygulanan PZR programı.

Sıcaklık	Süre
37°C	2 saat
65 °C	20 dk
4°C	hold

İşlemin devamında termal döngüden çıkan tüpler hemen buza alınır. Sonrasında hafifçe karıştırılıp ve santrifüj edildikten sonra tekrar PZR cihazında 95⁰ C 4 dk'dan oluşan bir programa konulur. Cihazdan çıkan tüpler hemen buz kabına alınarak 5 dk buzda bekletilir. İşlem devamında (buzun üstünde olma koşulu ile) PZR ürününe 5 µL Random Primer konulup yavaşça karıştırdıktan sonra santrifüj edilir. Santrifüj sonrası 95⁰ C 4dk'lık bir PZR programına taabi tutulur. Cihazdan çıkan tüpleri buz da 5dk bekletip sonrasında işlem devam ediyor. Bu aşamada Labelling mix hazırlanır (tablo Tablo 3.16). Hazırlanan Labelling mix'ten tüm tüplere 21 µL eklenir. Bir sonraki aşamada tüpler PZR cihazına konulur (Tablo 3.17).

Tablo 3.16 Her bir Cy3 (kontrol) için hazırlanan Labellin gmix karışımı.

Nükleazdan arındırılmış su	2 µl
5X Reaction Buffer	10 µl
10X dNTPs	5 µl
Cyanine 5-dUTP	3 µl
Exo (-) Klenow	1 µl
Final hacim	21 µl

Tablo 3.17 Her bir Cy5 (hasta) için hazırlanan Labellin gmix karışımı.

Nükleazdan arındırılmış su	2 µl
5X Reaction Buffer	10 µl
10X dNTPs	5 µl
Cyanine 5-dUTP	3 µl
Exo (-) Klenow	1 µl
Final hacim	21 µl

Tablo 3.18 Digestion mix içeren tüplere uygulanan PZR programı.

Sıcaklık	Süre
37°C	2 saat
65°C	10 dk
4 °C	hold

PZR ürünleri purifiye edilmek üzere filtreli tüpler aktarılıp üzerine 430 µL TE Buffer eklenir. TE Buffer içeren tüpler 14.000 rcf 'de 10 dk santrifüj edilir. Sonrasında santrifüjden çıkan tüplerin altı sıvısı atılır ve ikinci kez pürifikasyon filtresine 480 µL TE Buffer eklenir. Daha sonra ikinci kez aynı santrifüj programına tabi tutulur. Program bitince üçüncü kez için yeni filter konulup ve filterleri ters bir şekilde kapatılır. Daha sonra 1.000 rcf'de 1dk santrifüj edilir. Çıkan ürünler nanodropta mikro-array'e özgün seçenekte, ölçülür. Tüm örnekler Cy3-Cy5 absorpsiyonları ve yield değeri hesaplandıktan sonra tek bir tüpte birleştirilir. Birleştirilen tüp distile su ile 39µL'ye tamamlandıktan sonra her tüpün içine 5 µL Cot-1DNA, 11 µL 10X aCGH Blocking Agent ve 55 µL 2X HI-RPM Hybridizaiton Buffer yavşça karıştırılıp daha sonra santrifüj edilir. Daha sonra tüm tüpler 33 dk olmak üzere 95⁰C'de 3dk ve 37⁰C' sıcaklıkta 30dk lık PZR programına tabi tutulur. Örneklerin herbirisinden 100'er µL chamber base'in içine uygun bir şekilde yerleştirilmiş olan gasket'e yüklenir. Daha sonra SureHyb chamber cover, Sandwich-pair oluşturan Mikroarray slayt ve gasket slayte'ın üzerine konulup sıkıca kapatılır. Daha sonra cihazın rotator rafına yerleştiririp 20 saat içinde 67⁰C ısıda ve 20 rpm 'de hibridizasyon un yapılması tamamlanır.

Hibridizasyon Sonrası Yıkama

Cihazıdan çıkartılan ikili slaytı ayırmak amaçlı Wash I solüsyonuna konulup ve Böylece microarray slaytı oda ısısında 5dk kadar Wash I solüsyonununa konulur. Daha sonra mikroarray slaytı Wash II solüsyonu konulduğu cihazada (cihaz 50⁰C'de 2,7 hızına ayarlanmıştır) 1dk bekletilip çıkartılır. Hemen sonra slayt 10sn beklemek üzere cihaza önceden konulan asetonitrile'de bekletilip çıkartılır. Çıkartılan slayt 30 sn olmak üzere

oda ısısında, aynı hıza ayarlanan cihaza konulup çıkartılır.

Slayt Tarama

Çıkartılan slayt slayt tutucuya yerleştirilerek tarayıcıya konulur ve bilgisayarda tarama parameterlerini ayarlayarak işlemi başlatılır.

Verlerin Analizi

Cihazdan elde edilen görüntü önceden ayarladığımız dosyaya aktarılır. Daha sonra taramadan elde edilen görüntü Agilent Feature Extraction for CytoGenomics programına yüklenip ekstraksiyon işlemi başlatılır. Diğer aşamada CytoGenomics programına hasta bilgileri girilir. Bu programda tüm kromozomlar, araştırmanın kalite düzey ve çoğu bilgi sağlanır. Kromozomların farklı lokuslarındaki görülen varyantlar Pubmed, DECIPHER ve diğer veritabanlara bağlanarak araştırılır.

4. BULGULAR

Bu araştırmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakóltesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı polikliniğine 1990-2018 yılları arasında, başvuran, NIH tanı kriterlerine dayanarak Tip 1 Nörofibromatozis tanısı konmuş, 27 aileden klinik olarak 47 etkilenmiş olduğunu düşündüğümüz olgular değerlendirildi. Olguların erkek/dişi oranı 1.6 (erkek:18, dişi:29) idi. Çalışma kapsamında 27 ailenin indeks olgularında, Tip 1 Nörofibromatozis için tasarladığımız hedefe yönelik yeni nesil dizileme, MLPA ve array-CGH yöntemleri ile dış merkez laboratuvar olanakları kullanılarak, *NF1* gen analizleri yapıldı ve 27 ailenin 39 klinik kesin tanılı olgusunda, 22 farklı *NF1* gen mutasyonu saptandı. Saptanan mutasyonlardan üçü yanlış anlamlı, dördü kırılma hatası, beři anlamsız, dokuzu küçük in/delve üçü ise *NF1* geni ile birlikte 23 geni içeren 1.4 MB'lık delesyon tipinde mutasyon idi. Bu mutasyonlardan onbiri daha önce tanımlanmış mutasyon, onbiri ise ilk kez bu çalışmada tanımlanan yeni mutasyonlardı.

Tablo 4.1 Çalışma grubunda değerlendirilen olgulardaki klinik bulgular.

	A1-II- 10	A1-III- 4	A1-III- 3	A1-III- 2	A1-III- 1	A1- I-3	A1-II- 12	A1-II- 13	A2-II- 7	A2-III- 3	A3-III- 2	A3-II- 8	A3-II- 9	A3-III- 1	A4-II- 11	A4-III- 1	A4-III- 4
Başvurudaki yaşı	50	20	23	26	28	80	46	40	66	34	18	58	45	20	49	18	9
Yetiştirilen cinsiyet	E	E	K	K	E	K	E	K	E	K	K	K	E	E	E	K	K
Akraba evliliği	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ailede etkilenmiş olgu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+
BAŞ VE BOYUN																	
Kafa																	
Makroeksefali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Sfenoid displazi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gözler																	
Lisch nodülleri (iris hamartomaları)	-	?	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Glokom																	
{ICD10CM:H40.9,H40-H42,H40}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelorizm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Arka kutupta hiperreflektif koroid lekeleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KALP-DAMAR																	
Renal arter stenozu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertansiyon																	
{ICD9CM:401-405.99,997.91}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
İSKELET Omurga																	
Skolyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Spina bifida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uzuvlar																	
psödoartroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uzun kemik korteksinde incelme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yerel aşırı kemik büyümesi	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CİLT, TIRNILAR & SAÇ																	
Nörofibromlar	+	+	+		-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Pleksiform nörofibrom	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Cafe-au-lait lekeleri	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+

[illegible]

	A12-III-1	A13-II-8	A14-II-3	A15-II-4	A16-III-4	A17-III-5	A18-III-4	A19-III-5	A20-III-9	A21-III-2	A22-III-1	A23-III-1	A24-III-4	A25-III-6	A26-III-1	A27-III-3
Başvurudaki yaşı	50	44	54	57	24	48	26	38	34	35	35	20	25	54	18	24
Yetiştirilen cinsiyet	E	K	K	E	K	K	K	E	K	K	E	E	K	K	k	E
Akraba evliliği	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	?	-	-	-	-
Ailede etkilenmiş olgu	-	-	+	?	-	+	?	-	+	-	-	+	-	-	-	-

Tablo 4.2 Çalışma grubunda değerlendirilen olgulardaki moleküler bulgular.

	A1-II-10	A1-III-1	A1-III-2	A1-III-3	A1-III-4	A1-II-12	A1-II-13	A1-I-3	A2-III-3	A2-II-7
Gen	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>
Referans										
Transkript	NM_000267	NM_000267	NM_000267	NM_000267	NM_000267	NM_000267	NM_000267	NM_000267	NM_001042492.2	NM_001042492.2
Ekzon	37	37	37	37	37	37	37	37	İntron 34	İntron 34
Zigozite	Het.	Het.	Het.	Het.	Het.				Het.	Het.
Nükleotid	c.5294C>A	c.5294C>A	c.5294C>A	c.5294C>A	c.5294C>A	N	N	N	C.4662-2 A>C	C.4662-2 A>C
Protein	p.ser1765*	p.ser1765*	p.ser1765*	p.ser1765*	p.ser1765*				-	-
MLPA										
P081-D1 (lot D1-0617) NF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P082-C2 (lot C2-0317) NF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A3-III-2	A3-III-1	A3-II-8	A3-II-9	A4-II-11	A4-III-1	A5-V-1	A5-IV-8	A6-IV-4	A6-IV-3
Gen	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>
Referans										
Transkript	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2	NM_001042492.2
Ekzon	2	2	2	2	2	2.2	2	2.2	52	52

Zigozite					Het.	Het.	Het.	Het.	Het.	Het.
Nukleotid	N	N	N	N	c.2799_2800insT	c.2799_2800insT	c.1260+1G>A	c.1260+1G>A	c.7684_7685delAG	c.7684_7685delAG
Protein					P.Asn935*	P.Asn935*	-	-	p.Arg2562Aspfs*12	p.Arg2562Aspfs*12
MLPA										
P081-D1(lot D1-0617) NF1	DEL	-	N	-	-	-	-	-	-	-
P082-C2 (lot C2-0317) NF1	DEL	-	N	-	-	-	-	-	-	-
	A6-III-3	A7-II-4	A7-III-1	A7-III-2	A7-III-3	A8-III-2	A8-IV-1	A9-III-3	A9-IV-1	A10-II-3
Gen	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1
Referans	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_00104249	NM_001042492.	NM_00104249	NM_001042492.2	NM_001042492.2
Transkript	2	2	2	2	2	2.2	2	2.2		mozaik?
Ekzon	52	37	37	N	37	26		14	14	
Zigozite	Het.	Het.	Het.		Het.	Het.		Het.	Het.	
Nukleotid	c.7684_7685delAG	c.4931_4931delT	c.4931_4931delT		c.4931_4931delT	c.3456_3459 delACTC	N ?	c.1555C>T	c.1555C>T	N
Protein	p.R2562Dfs*12	P.Pro1646Leufs*31	P.Pro1646Leufs*31		P.Pro1646Leufs*31	p.Leu1153METfs*4		P.Gln519*	P.Gln519*	
MLPA										

P081-D1(lot D1-0617) NF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P082-C2 (lot C2-0317) NF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	A10-III-2	A11-III-4	A12-III-1	A13-II-8	A14-II-3	A15-II-4	A16-III-4	A17-III-5	A18-III-4	A19-III-5
Gen	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF1</i>
Referans	NM_000267	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_000267	NM_001042492.	NM_00104249	NM_001042492.	NM_00104249	NM_001042492.4	NM_001042492.2
Transkript		2	2		2	2.2	2	2.3		
Ekzon		N	N	54	5	8	31	16	46	N
Zigozite	Het.			Het.	Het.	Het.	Het.	Het.	Het.	
Nükleotid	c.2033dupc			c.8007C>G	C.564delA	c.746T>C	c.4168C>T	c.1756_1759 delACTA	c.6862 delTT	
Protein	p.ile679aspsfs*21			p.Tyr2669*	P.Lys189Asnfs*2	P.Leu249Pro	p.leu1390phe	P.Thr586valfs *18	P.ser2288Argfs*10	

MLPA										
P081-D1(lot D1-0617) NF1	-	DEL.	N	-	-	-	-	-	-	DEL
P082-C2 (lot C2-0317) NF1	-	DEL.	N	-	-	-	-	-	-	DEL

	A20-III-9	A21-III-2	A22-III-1	A23-III-1	A24-III-4	A25-III-6	A26-III-1	A27-III-3		

Gen	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1	NF1
Referans	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_001042492.	NM_00104249	NM_001042492.	NM_00104249
Transkript	2	2	2	2	2	2.2	2	2.2
Ekzon	37	32	Intron 22	34	int18	9	N	4
Zigozite	Het.	Het.	Het.	Het.	Het.	Het.		Het.
Nükleotid	c.5312_5313insC	c.4277A>G	c.2991-1G>A	c.4486_4487delA A	c.2252-1G>A	c.910C>T		c.407delA
Protein	P.Leu1772Profs* 4	p.Gln1426Arg	-	P.Lys1496Asnfs* 12	-	P.Arg304*		P.Asn136Phefs*19
MLPA								
P081-D1(lot D1-0617) NF1	-	-	-	-	-	-	N	-
P082-C2 (lot C2-0317) NF1	-	-	-	-	-	-	N	-

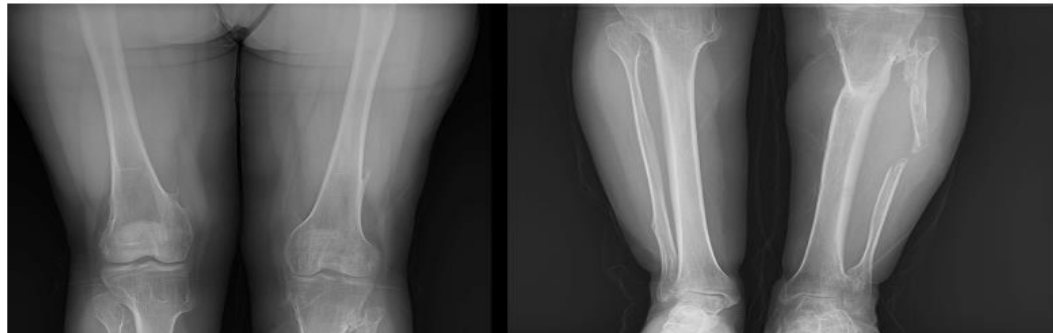
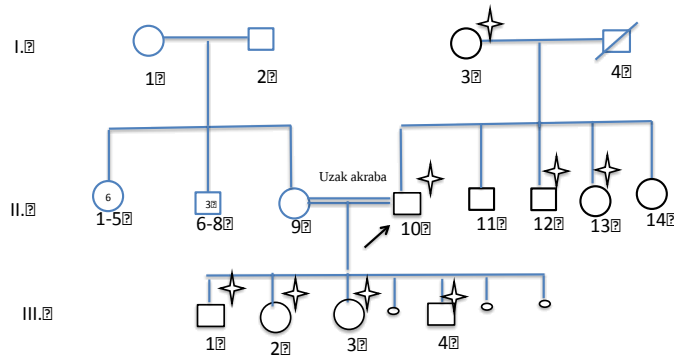
4.1. Aile (NF1-1):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detayli bir şekilde tablo 4.1'de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak (III-3)'te multipl eksositoz görülmektedir.

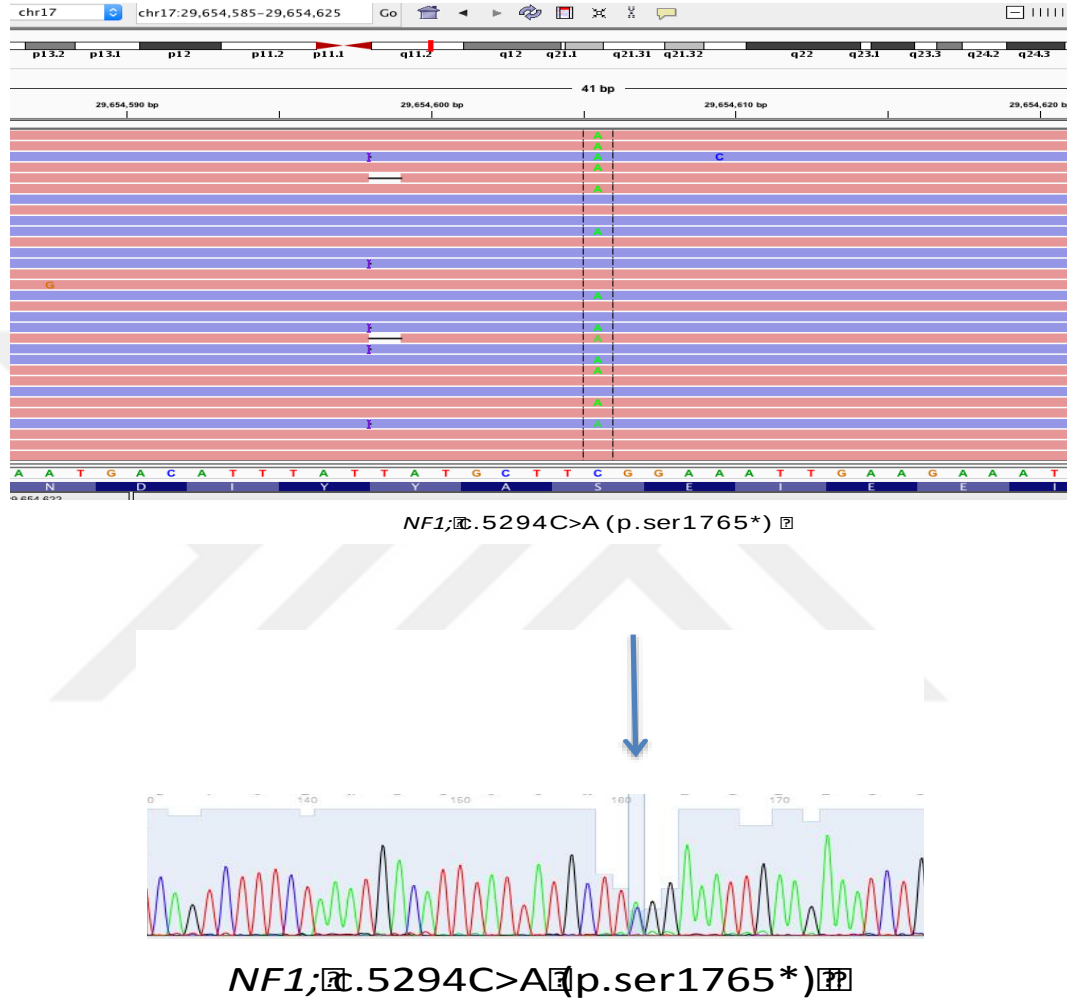
4.1.1. Aile (NF1-1):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.1, II-10) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM 000267; NP_000258) c.5294C>A (p.ser1765*) [hg19] heterozigot varyant saptandı. Saptanan variant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı ve aile segregasyon analizi yapıldı (şekil 4.2). Saptanan bu varyant daha önce nörofibromatozis'de anlamsız bir varyant olarak bildirilmiştir (Cassiman ve ark, 2017)



Şekil 4.1. Aile (NF1-1). Aile ✦ ağacı, Moleküler analiz yapılan olgular, İndeks (III-2)'ye ait görüntüler, İndeks (III-5)'e ait röntgen görüntüleri.



Şekil 4.2. Aile (NF1-1). İndeks(II-10)'a ait YND ile saptanan varyasyon (*NF1*: c.5294C>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve sanger dizileme ile confirmasyonu, aile segregasyon analizi; (II-10), (III-1), (III-2), (III-3) ve (III-4)'e ait elektroferogram.

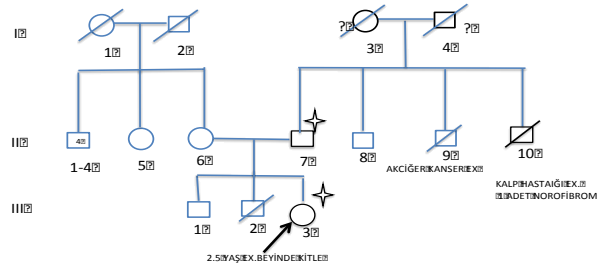
4.2. Aile (NF1-2) :

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1'de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (III-3)'te meme ve akciğer kanseri tesbit edilmiştir.

4.2.1. Aile (NF1-2) :

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.3, III-3) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492; NP_001035957) C.4662-2 A>C [hg19] heterozigot varyasyonu saptandı. Saptanan varyasyonu Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı ve aile segregasyon analizi yapıldı. Saptanan bu varyant daha önce nörofibromatozis’de kırılma hatasına yol açan bir varyant olarak bildirilmiştir (Sabbagh ve ark, 2013).



Şekil 4.3. Aile ağacı. ✦

Moleküler analiz yapılan olgular.

4.3. Aile (NF1-3):

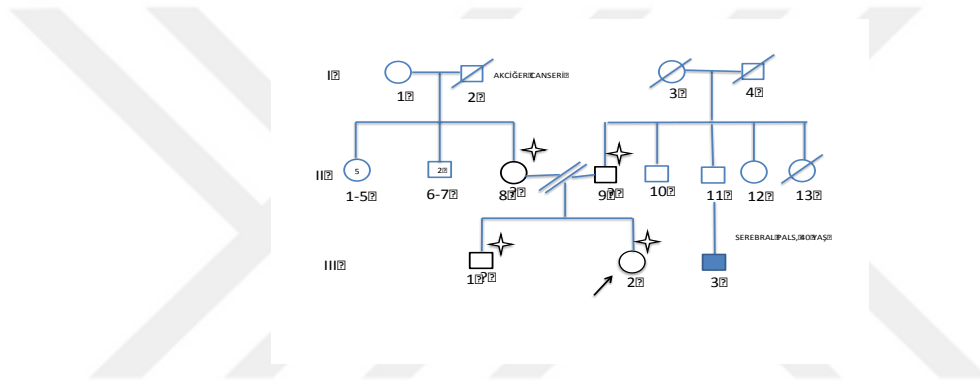
Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki klinik bulgulara ek olarak indeks (III-2)’de hafif mikrognati, bilateral kubitus valgus, dirsekte ve metakarpofalangeal (MKF) ve dizlerde hiperekstansibilite ve genu recurvatum anomalileri tesbit edilmiştir. Bu hastada korpus kallozumun spleniumu (KKS) görülmekte olup ayrıca hamartom ve sinirde serebellar tonsillerin ektopisi görülmektedir. Diğer bulgulara ek olarak hastada hipotiroidi ve tiroidit öyküsü vardı.

4.3.1. Aile (NF1-3):

Moleküler Bulgular

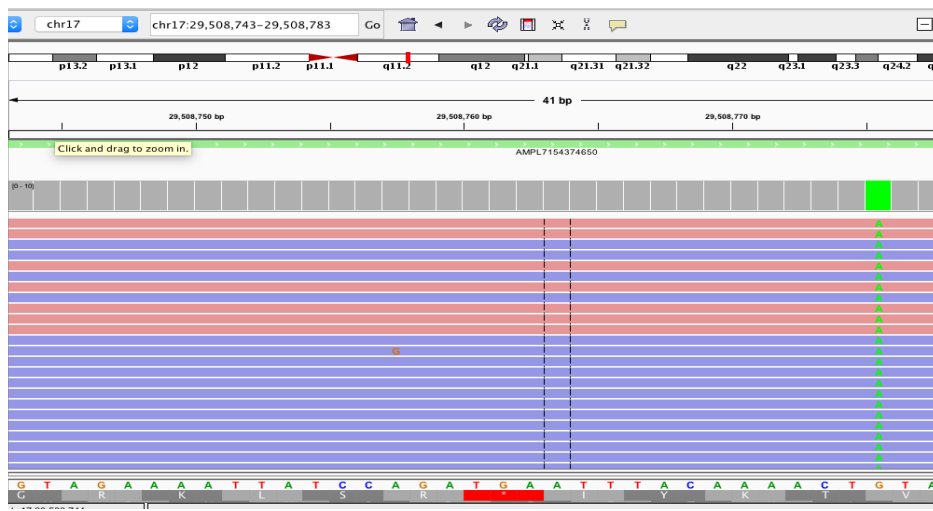
İndekste (şekil 4.4, III-2) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) ([hg19] herhangi bir varyant saptanmadı. Ancak MLPA analizinde *NF1* geninde heterozigot tüm gen delesyonu gösterildi (Şekil 4.5). Segregasyon analizinde anne ve babada delesyon saptanmadı. *NF1* tüm gen delesyonu literatürde bildirilmiş olup olguda saptanan değişim klinik ile uyumlu olarak değerlendirildi. *NF1*

tüm gen delesyonu olgularının bir kısmında NF1'i içeren mikrolelesyon sendromları bildirildiğinden olguda array-CGH analizi yapıldı. (A3-III-2)'de bu amaçlı yapılan array-CGH çalışmasında arr[GRCh37]17q11.2(28941066_30367214)x1 baz çiftleri arasında *CRLF3*, *ATAD5*, *TEFM*, *ADAP2*, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2B*, *EVI2A*, *RAB11*, *FIP4*, *MIR193A*, *SUZ12*, *LRRC37B*, *LOC107133515*, *SH3GL1P2*, *SUZ12P1*, *DPRXP4*, *LOC107984974*, *LOC646030*, *MIR4733*, *MIR4724*, *MIR4725*, *MIR365B*, *COPRS*, *UTP* 6 Genlerini içeren 1.426,149 kb büyüklüğünde bir delesyon saptandı. Hastada saptanan bu mikrolelesyon sendromu, klinik bulguları doğruladı, ayrıca literatür bilgileri ile uyumlu bulundu (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Aile (NF1-3). Aile ağacı, ✦

Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1;NORMAL



Şekil 4.5. Aile (NF1-3), Indeks (III-2)'de YND ile herhangi bir varyant saptanmadı, IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile heterozigot tüm gen delesyonu sonucu) analiz görüntüsü. Olgu III-2'ye ait 17. Kromozomdaki delesyon gösteren a-CGH görüntüsü.

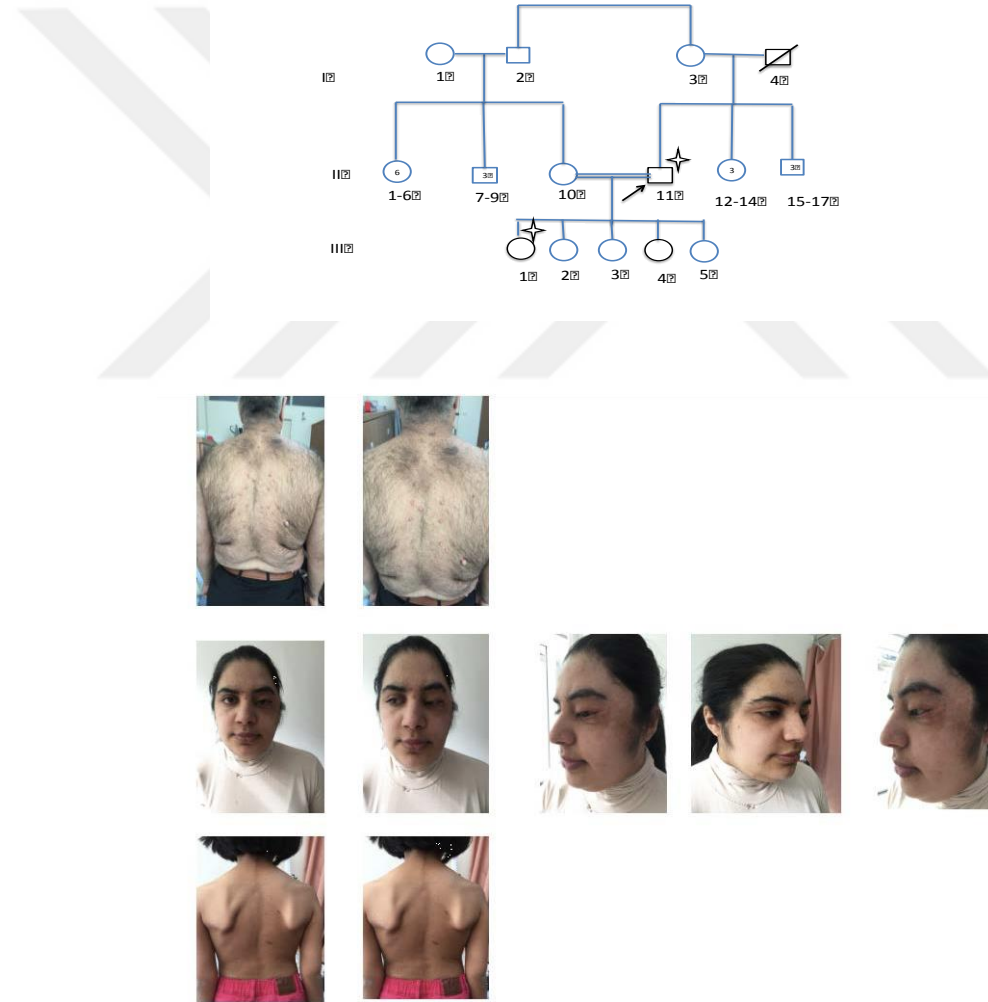
4.4. Aile (NF1-4):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Bu ailede (III-1)'de tablodaki klinik bulgulara ek olarak temporal baskınlık, sol zigome üzerinde olan ameliyat izi, periorbital şişkinlik sol ptozis, fasyal asimetri, eksik ve çürük diş ve dar yüksek damak anomalileri görülmektedir.

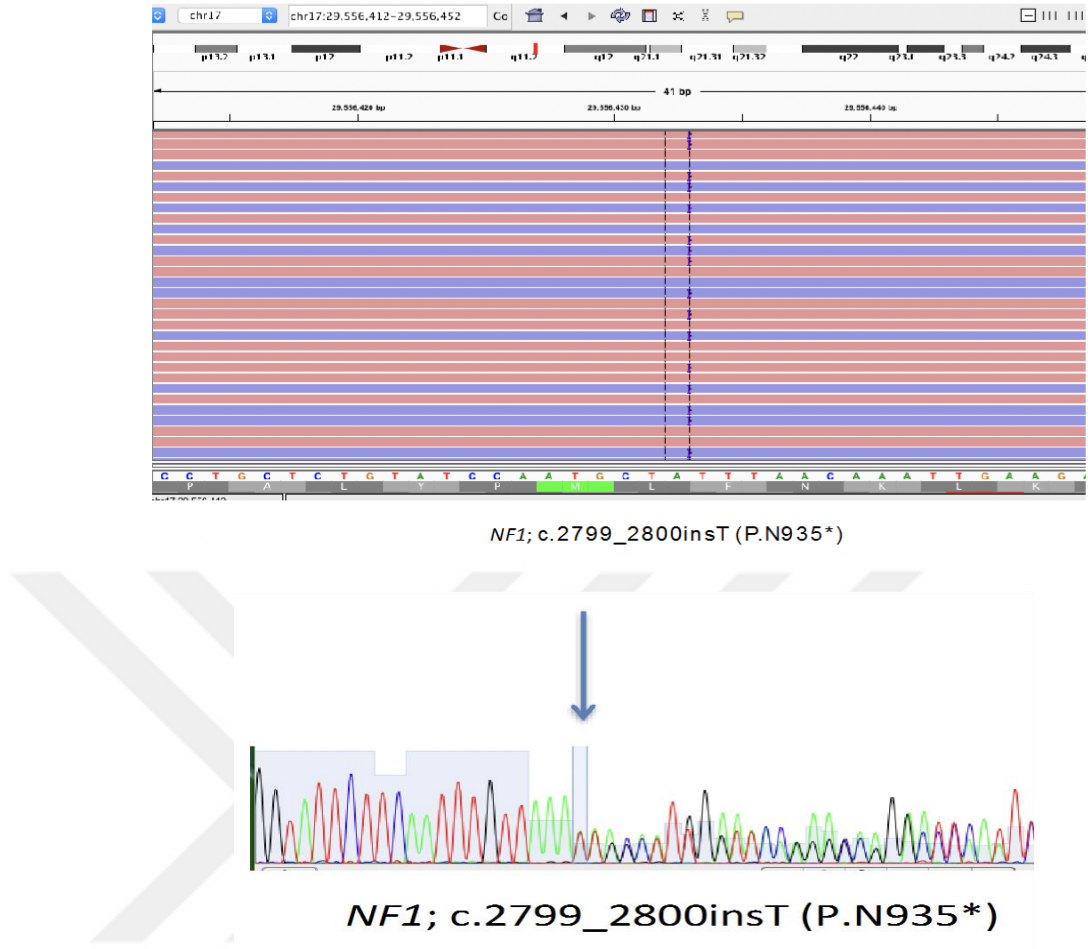
4.4.1. Aile (NF1-4):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.6, II-11) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.2799_2800insT (P.N935*) [hg19] hetrozigot varyasyon saptandı. Saptanan mutasyon Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulanıp aile segregasyon analizi yapıldı (şekil 4.7). Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda gösterilmiş olup ve daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.6. Aile (NF1-4) . Aile ağacı. ✨ moleküler analiz yapılan olgular, olgu (II-11) ve (III-1) ve (III-4) 'e ait görüntüler.



Şekil 4.7. Aile (NF1-4). İndeks (II-11)'e ait YND ile saptanan varyasyonun (NF1: c.2799_2800insT) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile konfirmasyonu, aile segregasyon analizi ve (III-1)'e ait elektroferogram görüntüsü.

4.5. Aile (NF1-5):

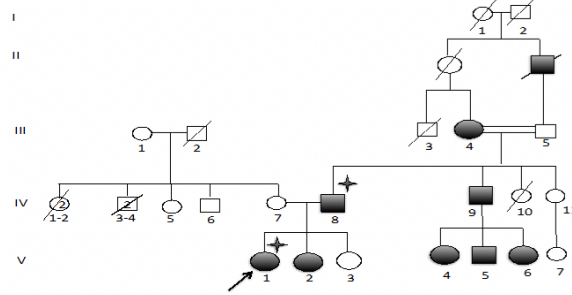
Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Bu ailede tablodaki klinik bulgulara ek olarak (IV-3)'te ventrikülomegali, ayrıca olgu (IV-8)' de C5-T1 arası vertebral füzyon (opere) görülmektedir.

4.5.1. Aile (NF1-5):

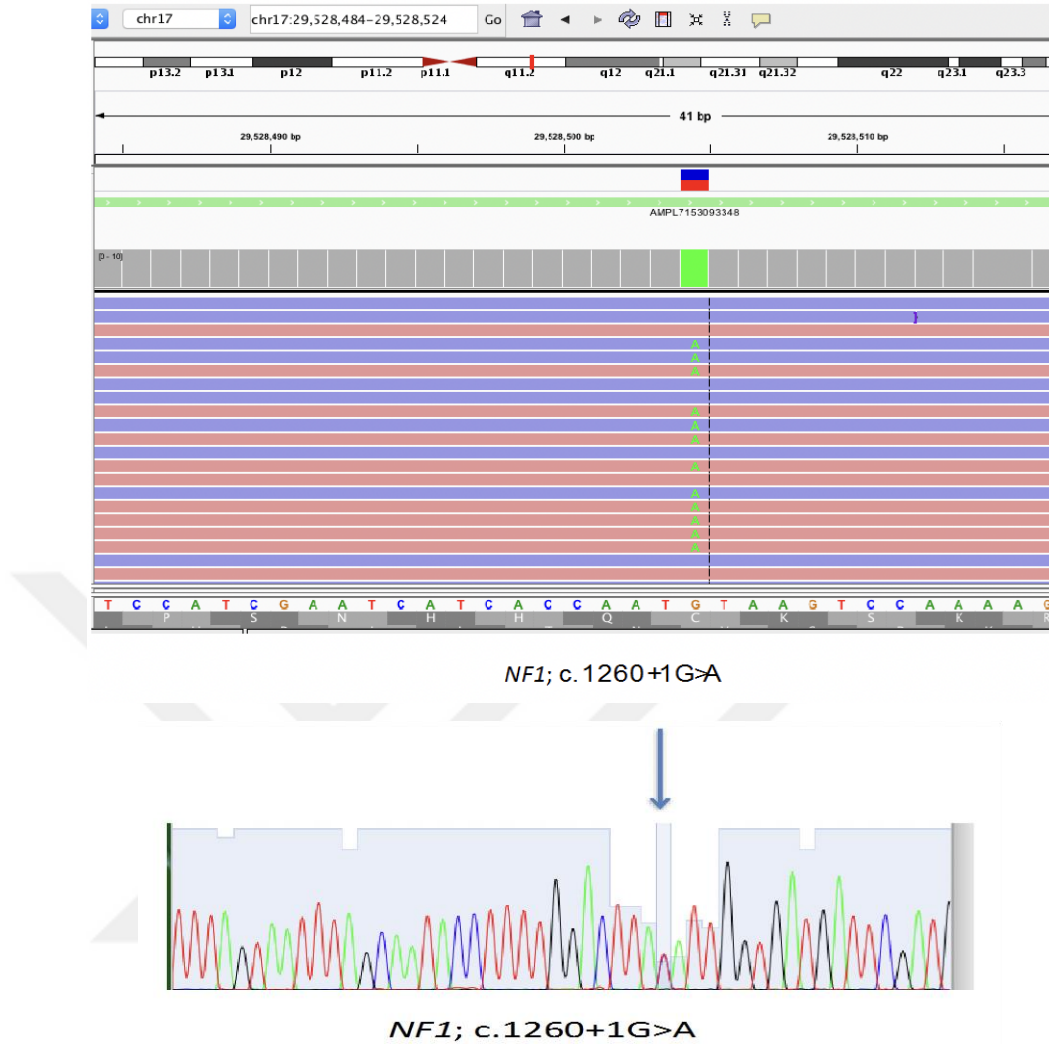
Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.8, V-1) yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.1260+1G>A[hg19] hetrozigot variant saptandı. Saptanan varyasyon Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulanıp ve aile segregasyon analizi yapıldı (şekil 4.9). Saptanan bu değişim daha önce

nörofibromatozis’de kırılma hatasına yol açan bir varyasyon olarak bildirilmiştir (Xiong ve ark, 2015; Maertens ve ark, 2006; Eisenbarth ve ark, 2000).



Şekil 4.8. Aile (NF1-5). Aile ağacı. moleküler analiz yapılan olgular. Olgu (IV-8) ve (V-1)’ e ait görüntüler.



Şekil 4.9. Aile (NF1-5). İndeks (V-1)'e ait YND ile saptanan varyasyon (*NF1*: c.1260+1G>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile doğrulanması, aile segregasyon analizi; (IV-8)'ye ait elektroferogram görüntüsü.

4.6. Aile (NF1-6):

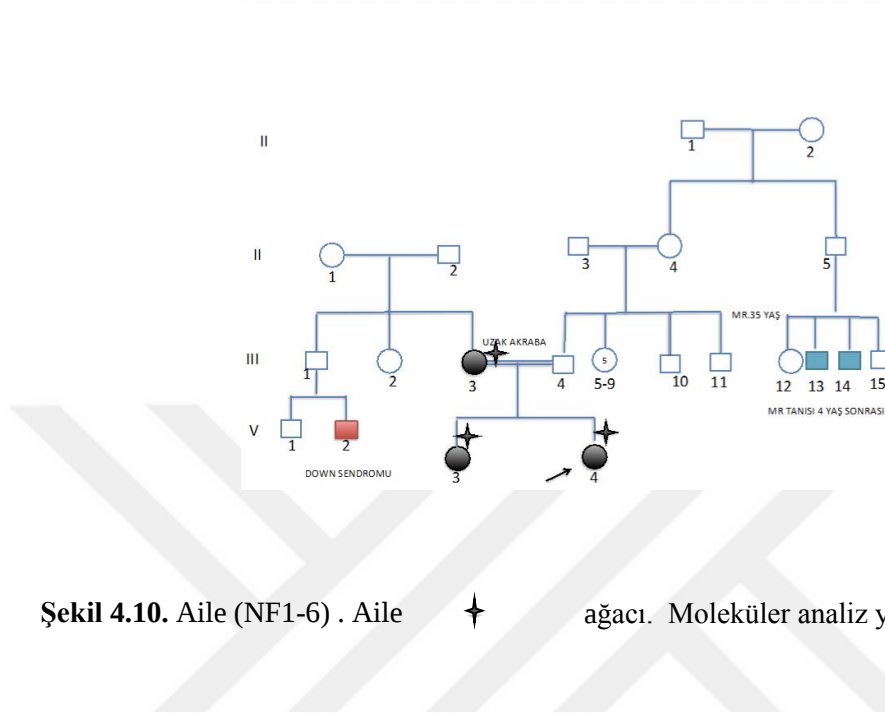
Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4-1 de gösterilmektedir.

4.6.1. Aile (NF1-6):

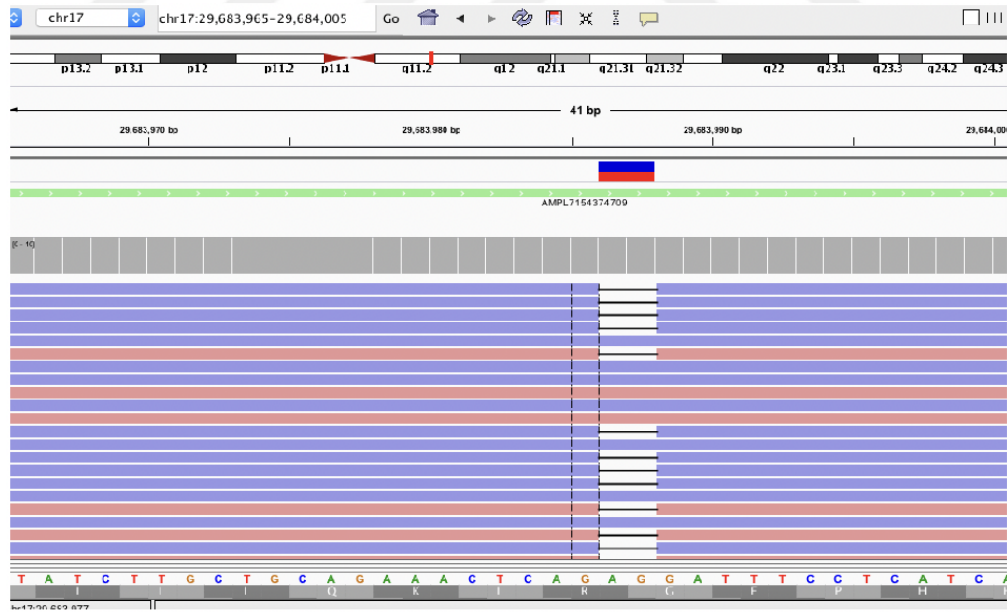
Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.10, IV-4) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.7684_7685delAG (p.R2562Dfs*12) [hg19] heterozigot varyasyonu saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulanıp aile segregasyon analizi yapıldı (şekil 4.11). Saptanan bu değişim daha önce N1 geni 52. ekzonunda, çerçeve kaymasına yol açan heterozigot

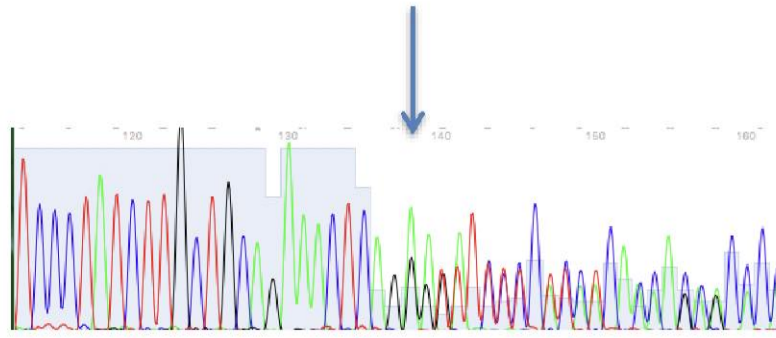
c.7684_7685delAG (p.R2562Dfs*12) bir varyant olarak bildirilmiştir. Olguda saptanan bu varyant klinikle uyumluluk göstermektedir (Xu ve ark, 2014).



Şekil 4.10. Aile (NF1-6) . Aile ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1; c.7684_7685delAG (p.R2562Dfs*12)



***NF1*; c.7684_7685delAG (p.R2562Dfs*12)**

Şekil 4.11. Aile (NF1-6). İndeks IV-4'e ait YND ile saptanan varyantın(NF1: c.7684_7685delAG) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile konfirmasyonu, ailesegregasyon analizi; (IV-3) ve (III -3)'e ait elektroferogram görüntüsü.

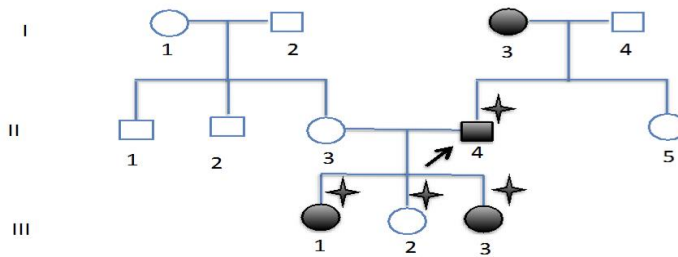
4.7. Aile (NF1-7):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak (III -1) ve (III -3)'te beyin ve beyincikte nörofibromlar görülmektedir.

4.7.1. Aile (NF1-7):

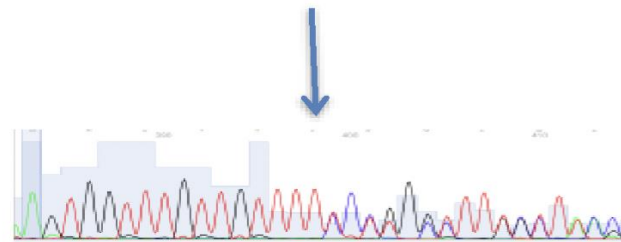
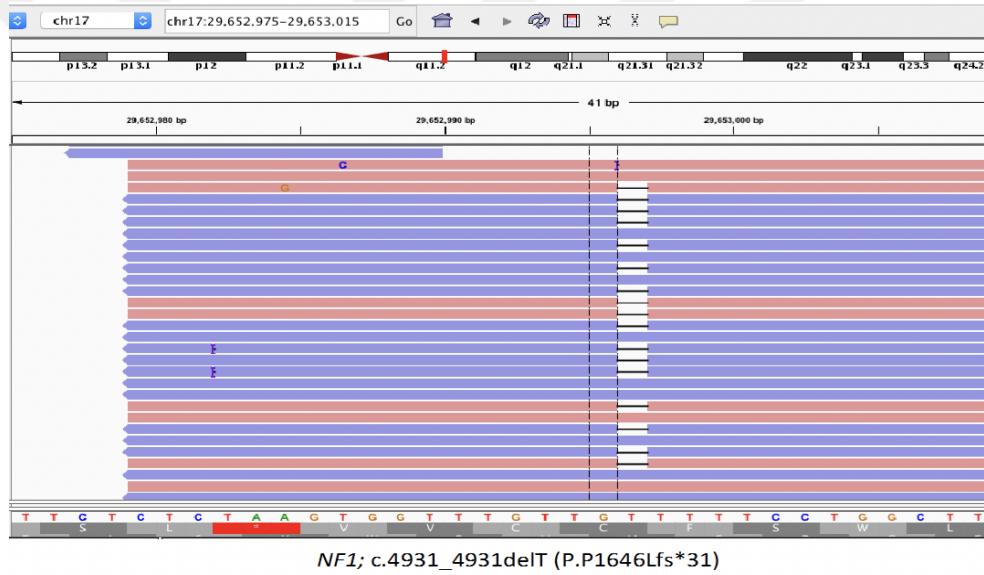
Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.12, II-4) yeni nesil dizileme yöntemi ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.4931_4931delT (P.P1646Lfs*31) [hg19] hetrozigot mutasyon saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulanıp aile segregasyon analizi yapıldı (şekil 4.13). Saptanan bu variant ilk kez bu olguda gösterilmiştir ve daha önce literatürde bildirilmemiştir.





Şekil 4.12. Aile (NF1-7). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular. Olgu (II-4)'e ait görüntü



NF1; c.4931_4931delT (P.P1646Lfs*31)

Şekil 4.13. Aile (NF1-7). İndeks II-4'e ait YND ile saptanan varyasyon (NF1: c.4931_4931delT) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile konfirmasyonu, aile segregasyon analizi; (III-1) ve (III-3)'e ait elektroferogram görüntüsü.

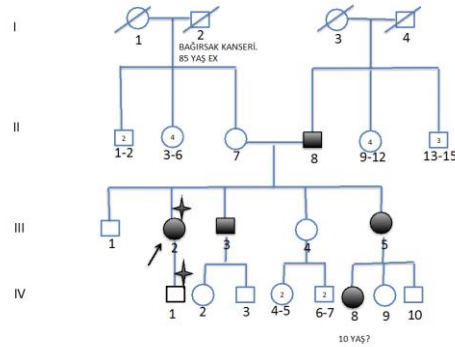
4.8. Aile (NF1-8):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4-1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (III-2)'de lipid depo miyopatisigörölmektedir.

4.8.1. Aile (NF1-8):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.14, III-2) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_000267; NP_000258.1) c.3456_3459 delACTC (p. Leu1153METfs*4) [hg19] hetrozigot varyantı saptandı. Saptanan varyantSanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulanıp aile segregasyon analizi yapıldı. Saptanan bu değışim ilk kez bu olguda saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.14. Aile (NF1-8).Aile ağacı.



Moleküler analiz yapılan olgular.

4.9. Aile (NF1-9):

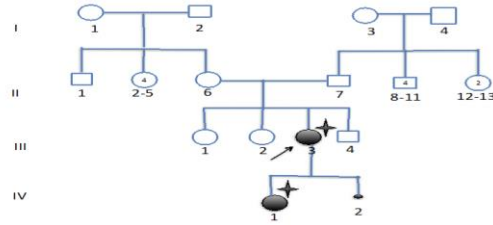
Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir.

4.9.1. Aile (NF1-9):

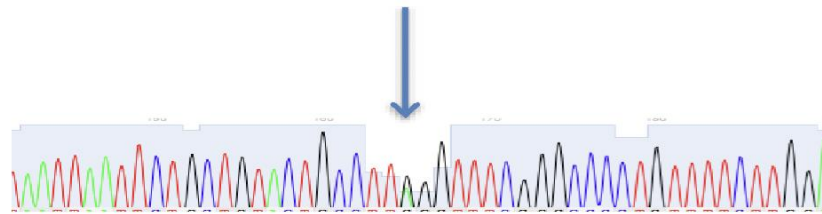
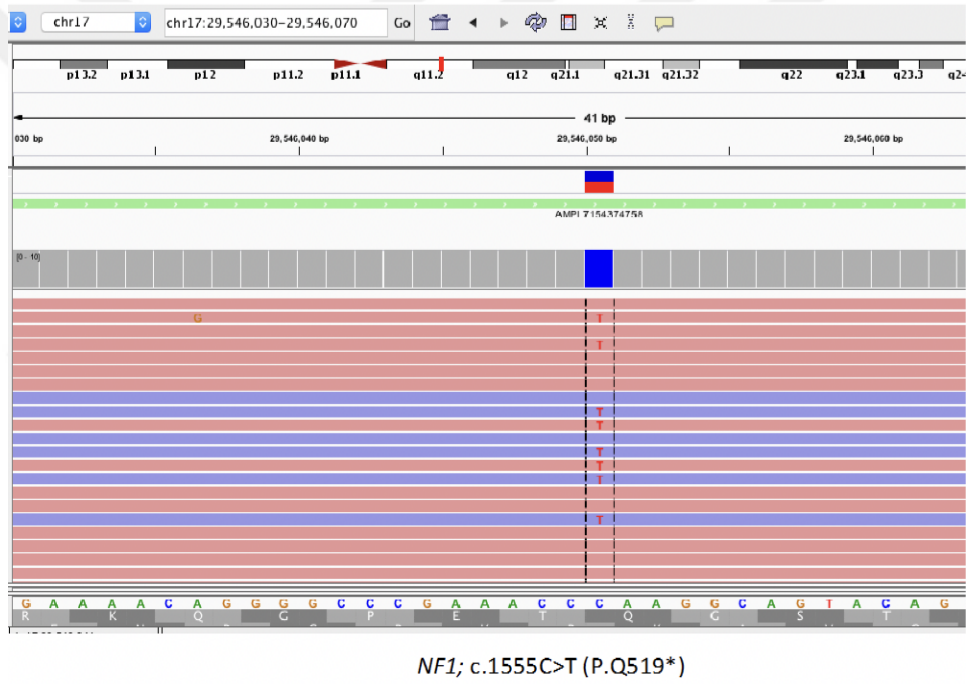
Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.15, III-3) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.1555C>T (P.Q519*)[hg19] heterozigotvaryant saptandı. Saptanan variant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulanıp aile segregasyon analizi yapıldı (Şekil 4.16). Saptanan bu varyant daha önce

nörofibromatozis’de anlamsız bir mutasyon olarak bildirilmiş olup ve klinik ile uyumluluk göstermektedir (Momozawa ve ark, 2018).



Şekil 4.15. Aile (NF1-9). Aile ağacı. ✦ moleküler analiz yapılan olgular.



Şekil 4.16. Aile (NF1-9). İndeks III-3’e ait YND ile saptanan varyantın (NF1: c.1555C>T) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü ve Sanger dizileme ile doğrulaması, aile segregasyon analizi; (IV-1)’e ait elektroferogram görüntüsü.

4.10. Aile (NF1-10):

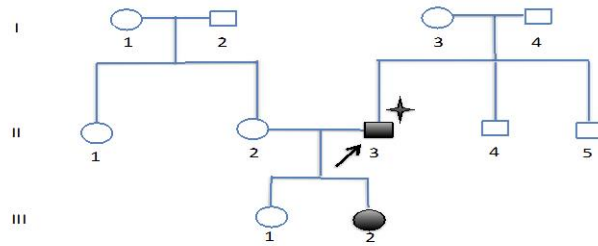
Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak (II-3)'te yüksek damak, hafif belirgin/öne dönük ve up lifted kulaklar ve helikslerde düzleşme anomalileri görülmektedir.

4.10.1. Aile (NF1-10):

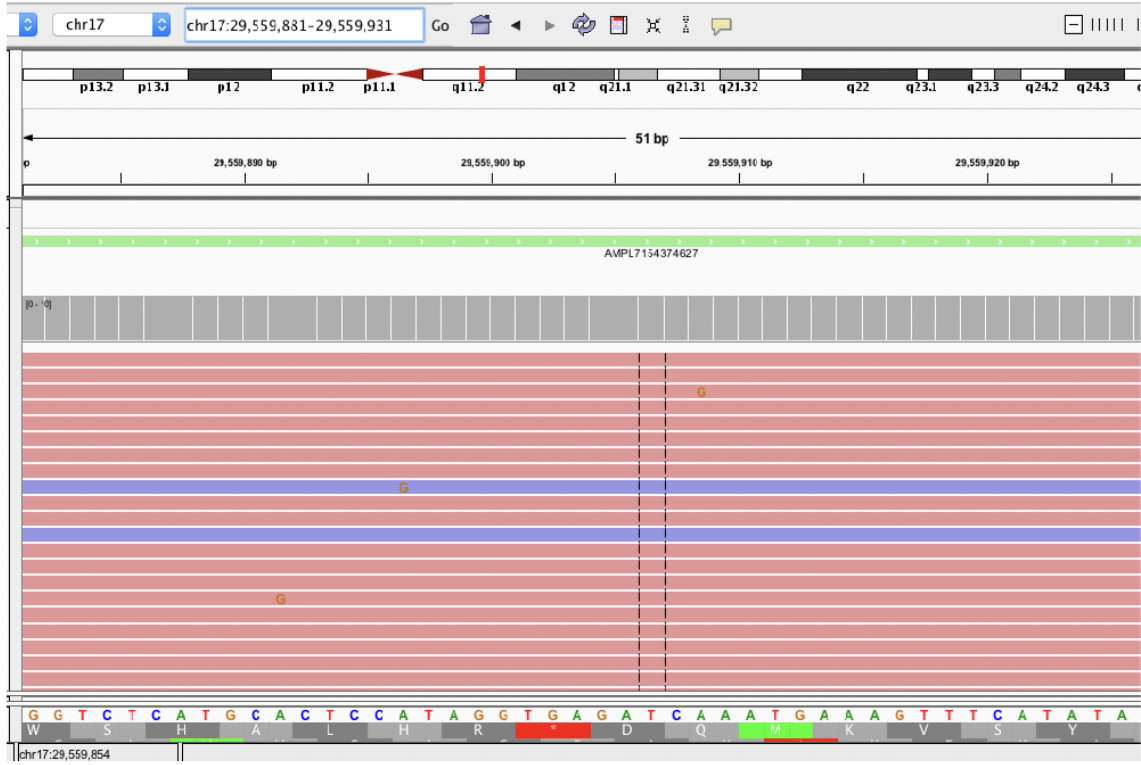
Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.17, II-3) yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) [hg19] herhangi bir varyant saptanmadı. Araştırmanın devamında indekse ait MLPA analiz sonucu normal olarak değerlendirildi (Şekil 4.18). Ancak indeks olgunun kızında (III-2)'de dış merkezde yapılan nörofibromatozis sendromu yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_000267; NP_000258) c.2033dupC (p.Ile679aspfs*21)[hg19] heterozigot varyantın saptandığı gösterildi. Saptanan bu varyant daha önce nörofibromatozis'de çerçeve kaymasına yol açan bir varyant olarak bildirilmiş olup klinik ile uyumluluk göstermektedir (Tsipi ve ark, 2018; LaDuca ve ark, 2017; Heim ve ark, 1995).

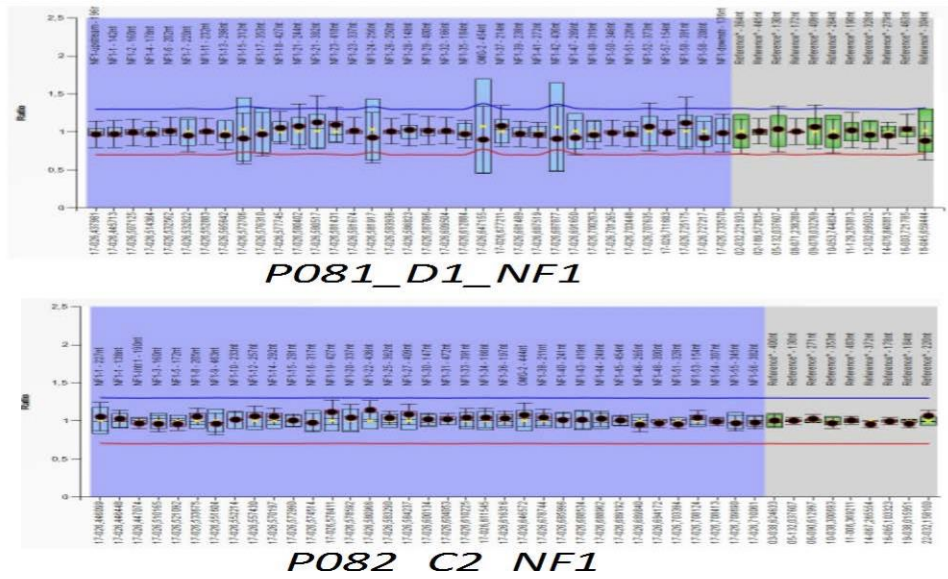
Saptanan bu varyant nedeni ile ve ayrıca indeks olguda nörofibromatozis 'e dair bulunan klinik endikasyondan dolayı araştırmanın birdiğer aşamasında indeks olguda, mozaiklik durumunun değerlendirilmesi planlandı.



Şekil 4.17. Aile (NF1-10) . Aile ✦ ağacı. Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1; NORMAL



Şekil 4.18. Aile (NF1-10). İndeks (II-2)'de YND ile herhangi bir varyant saptanmadı, IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü. İndeks II-2'e ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile normal sonuç) analiz görüntüleri.

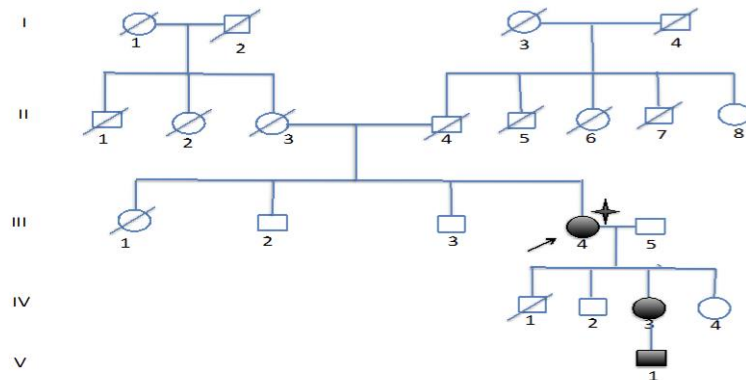
4.11. Aile (NF1-11):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (III-4)'te sürrenal adenom ve hiperparatiroidi tesbit edilmiştir.

4.11.1. Aile (NF1-11):

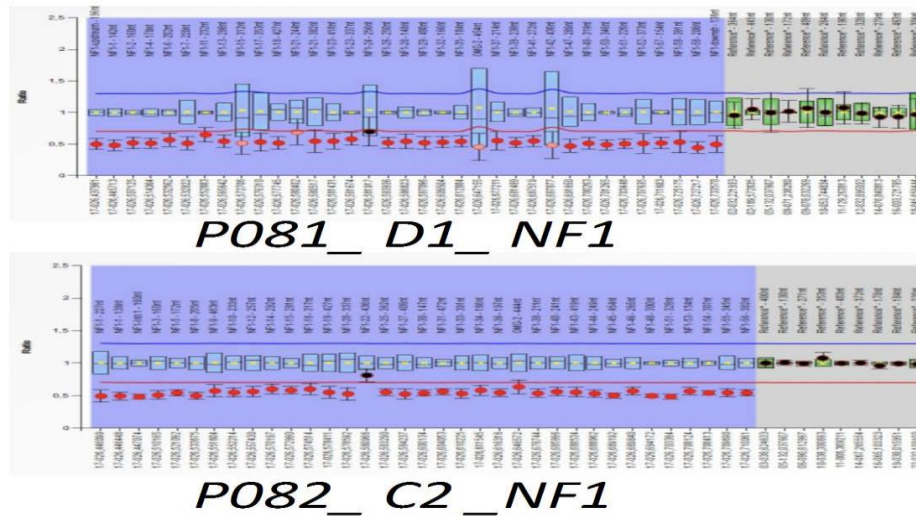
Moleküler Bulgular

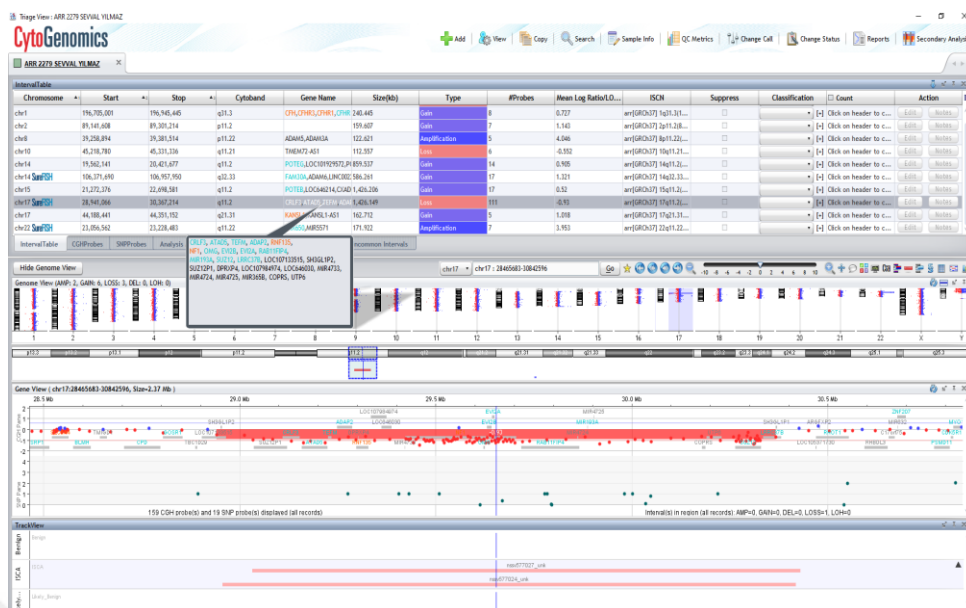
İndeks olguda (Şekil 4.19, III-4) yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) ([hg19] herhangi bir varyant saptanmadı. Ancak indekse ait MLPA analiz sonucunda *NF1* geninde heterozigot olarak tüm gen delesyonu saptandı (Şekil 4.20). *NF1* tüm gen delesyonu literatürde bildirilmiş olup olguda saptanan değişim klinik ile uyumlu olarak değerlendirildi. İndeks olgunun torununda (Şekil 4.19, V-1), dış merkezde yapılan array-CGH sonucunda *NF1*'i içeren mikrolelesyon sendromu saptanmıştır. *NF1* tüm gen delesyonu olgularının bir kısmında *NF1*'i içeren mikrolelesyon sendromları bildirildiğinden olguda array-CGH analizi yapıldı. (A3-III-2)'de bu amaçlı yapılan array-CGH çalışmasında arr[GRCh37] 17q11.2(28941066_30367214)x1baz çifleri arasında *CRLF3*, *ATAD5*, *TEFM*, *ADAP2*, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2B*, *EVI2A*, *RAB11FIP4*, *MIR193A*, *SUZ12*, *LRRC37B*, *LOC107133515*, *SH3GL1P2*, *SUZ12P1*, *DPRXP4*, *LOC107984974*, *LOC646030*, *MIR4733*, *MIR4724*, *MIR4725*, *MIR365B*, *COPRS*, *UTP6* Genlerini içerein 1.426,149 Kb büyüklüğünde bir delesyon saptandı. Hastada saptanan bu mikrolelesyon sendromu, klinik bulguları doğrulayıp ayrıca literature bilgileri ile uyumlu bulundu (şekil 4.20).





Şekil 4.19. Aile (NF1-11). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular. Olgu (III-4), (IV-3) ve (V-1)'e ait görüntüler.





Şekil 4.20. Aile (NF1-11). İndeks (III-4)'de YND ile herhangi bir variant saptanmadı. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile heterozigot tüm gen delesyonu sonucu) analiz görüntüleri. Olgu III-4'e ait 17. kromozomdaki delesyonu gösteren a-CGH görüntüsü.

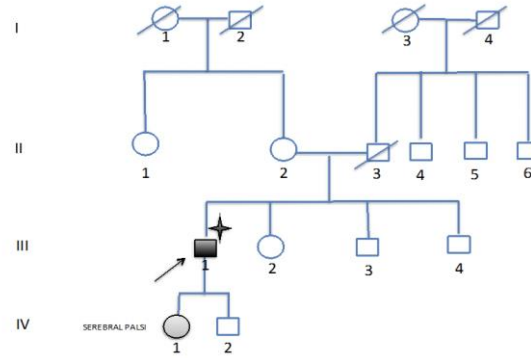
4.12. Aile (NF1-12):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detayli bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir.

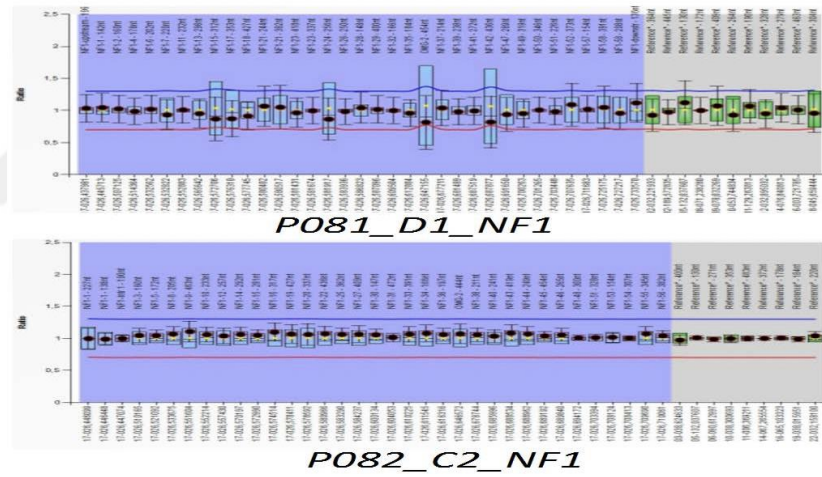
4.12.1. Aile (NF1-12):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.21, III-1) yeni nesil dizileme yöntemi ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) [hg19] herhangi bir varyant saptanmadı. Araştırmanın devamında indekse ait MLPA analiz sonucundada herhangi bir anomali tesbit edilemedi (Şekil 4.22). İndeks olguda nörofibromatosiz’e dair bulunan klinik endikasyondan dolayı bir diğer aşamada indeks olguda muzaiklik durumunun değerlendirilmesi pılanlandı.



Şekil 4.21. Aile (NF1-12) . Aile ağacı. ✨ Moleküler analiz yapılan olgular.



Şekil 4.22. Aile (NF1-12). İndeks (III-1)'de YND ile herhangi bir variant saptanmadı. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile normal sonuç) analiz görüntüleri.

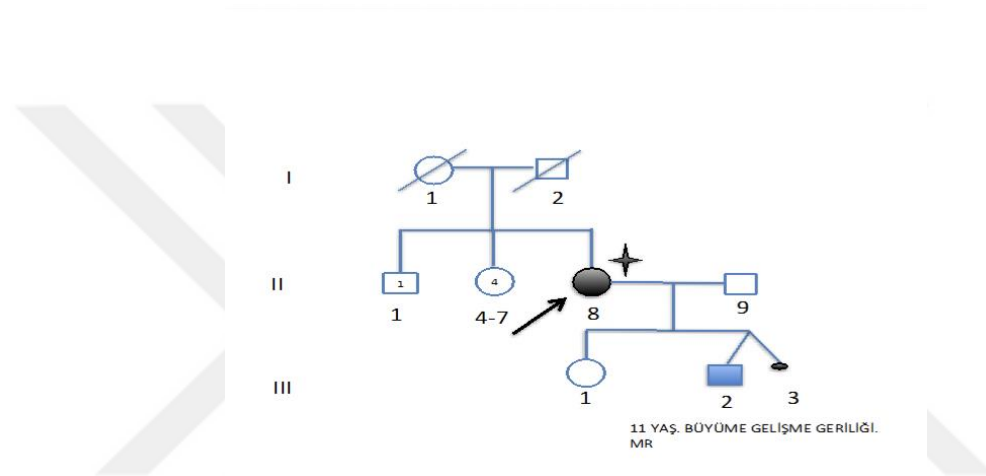
4.13. Aile (NF1-13):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (II-8)'de sefra kesesinde multiple polipler görülmektedir.

4.13.1. Aile (NF1-13):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.23, II-8) yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_000267; NP_000258.1) c.8007C>G (p.Tyr2669*) [hg19] heterozigot varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Saptanan bu varyant ilk kez indeks olguda gösterilmiş olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.23. Aile (NF1-13). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

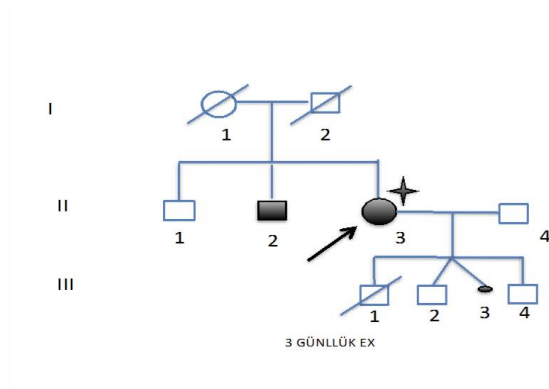
4.14. Aile (NF1-14):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir.

4.14.1. Aile (NF1-14):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.24, II-3) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) C.564delA (P.Lys189Asnfs*2) [hg19] heterozigot varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Saptanan bu varyant ilk kez indeks olguda gösterilmiş olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.24. Aile (NF1-14). Ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

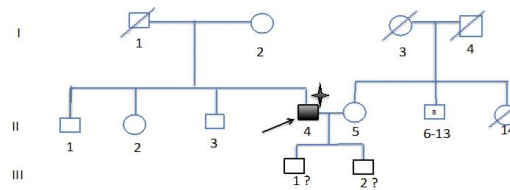
4.15. Aile (NF1-15):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak (II-4)'te hipofiz adenomu tesbit edilmiştir.

4.15.1. Aile (NF1-15):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.25, II-4) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.746T>C (p.Leu249Pro) [hg19] heterozigot varyant saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda gösterilmiş olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.25. Aile (NF1-15). Aile ağacı.: ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

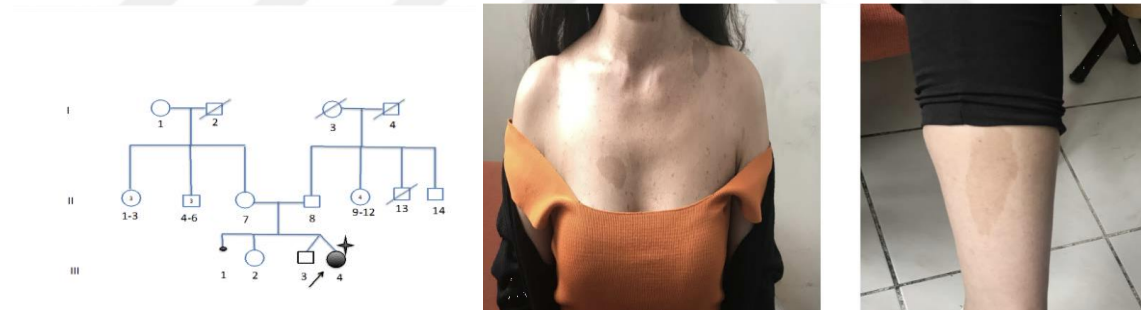
4.16. Aile (NF1-16):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (III-4)'te epilepsi, psiko-motor gelişim geriliği, pulmoner stenoz ve kemik erimesi mevcuttu.

4.16.1. Aile (NF1-16): .

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.26, III-4) yeni nesil dizileme yöntemi ile *NF1* geninde (NM_000267; NP_000258.1) c.4168C>T (p.leu1390phe) [hg19] heterozigot varyantı saptandı. Saptanan variant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı (Şekil 4.26). İndeks olguda NF1 klinik bulguları ile kardiyovasküler anomali (Pulmoner Stenoz) birlikteliği sebebi ile, klinik Watson sendromu ile uyumlu olarak değerlendirildi. İndeks olguda saptanan bu varyant daha önce literatürde bildirilmiş olup hastanın klinik bulgularıyla uyumluluk göstermektedir (Nyström ve ark, 2009).



Şekil 4.26 Aile (NF1-16). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular, olgu (III-4)'e ait görüntüler.

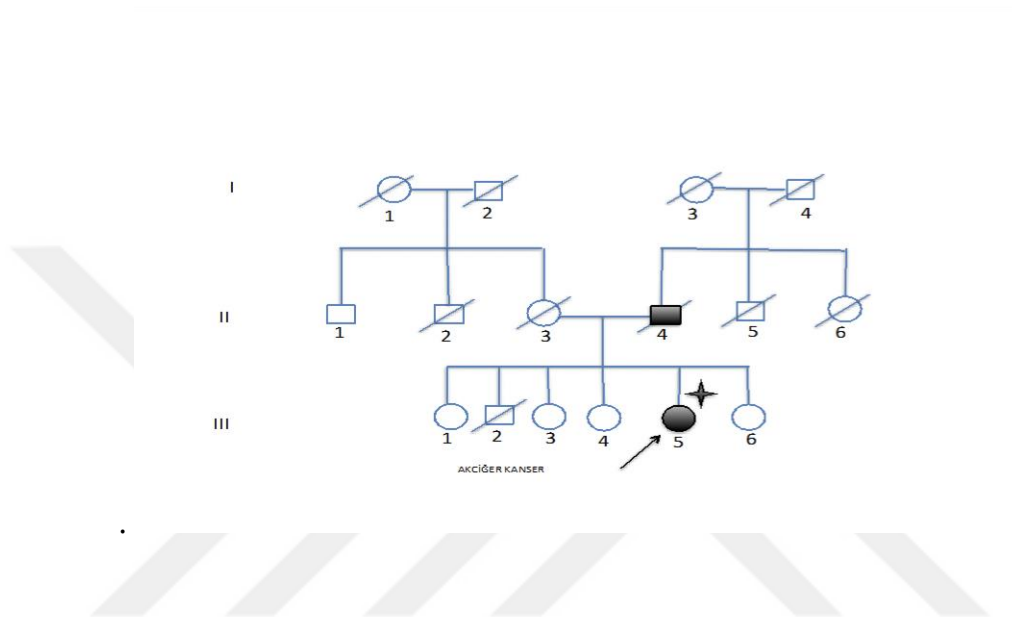
4.17. Aile (NF1-17):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4-1 de gösterilmektedir.

4.17.1. Aile (NF1-17):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.27, III-5) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.1756_1759 delACTA (P.Thr586valfs*18) [hg19] heterozigotvaryant saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Olguda saptanan bu varyant literatürde bildirilmiş olup klinik ile uyumlu olarak değerlendirildi (Yap ve ark, 2016; Anastasaki ve ark, 2015; Parkve ark, 1998)



Şekil 4.27. Aile (NF1-17). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

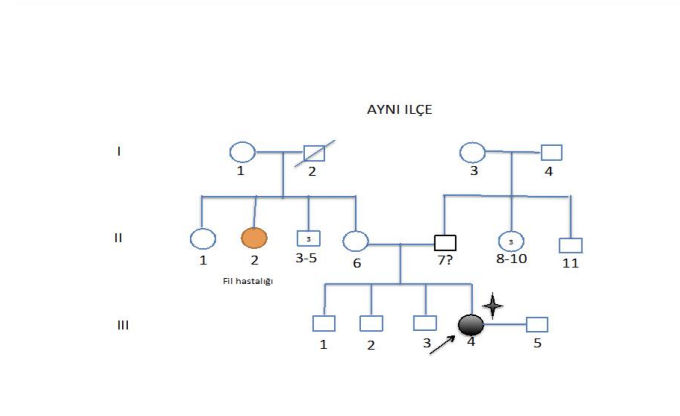
4.18. Aile (NF1-18):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (III-4)'te pektus karinatum, korpus kallosum'da 1X7mm boyutunda kontrast tutmayan hamartoma saptanmış olup ayrıca hasta epilepsiden dolayı tedavi edilmektedir.

4.18.1. Aile (NF1-18):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.28, III-4) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.6862 dellT (P.ser2288Argfs*10) [hg19] heterozigotvaryantı saptandı. Saptanan variant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda gösterilmiş olupdaha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.28. Aile (NF1-18).(I) Aile ağacı. : ✦ moleküler analiz yapılan olgular.

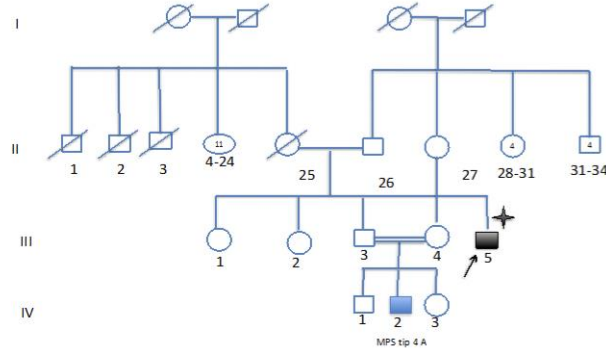
4.19. Aile (NF1-19):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak indeks (III-5)'te malign mezenkimal tümör öyküsü vardı.

4.19.1. Aile (NF1-19):

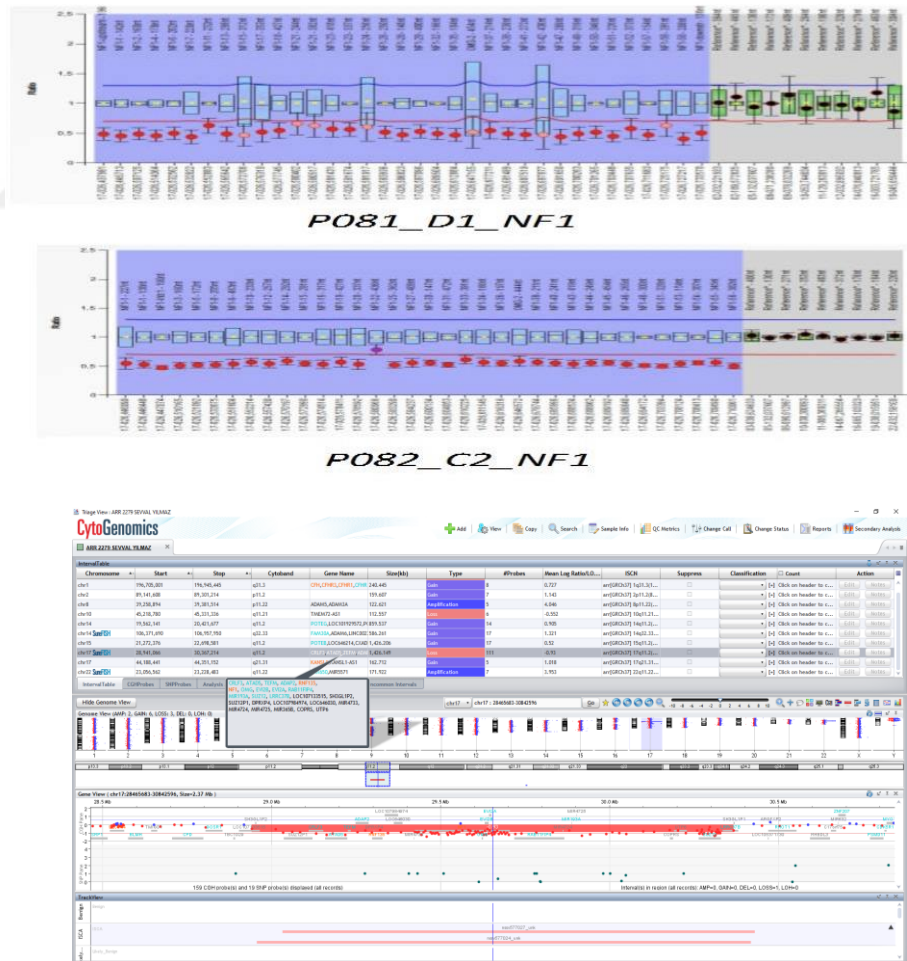
Moleküler Bulgular

İndekste (Şekil 4.29, III-5) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) ([hg19] herhangi bir varyant saptanmadı. Ancak MLPA analizinde *NF1* geninde heterozigot tüm gen delesyonu gösterildi (Şekil 4.30). *NF1* tüm gen delesyonu literatürde bildirilmiş olup olguda saptanan değişim klinik ile uyumlu olarak değerlendirildi. *NF1* tüm gen delesyonu olgularının bir kısmında *NF1*'i içeren mikrolelesyon sendromları bildirildiğinden olguda array-CGH analizi yapıldı. (A19-III-5)'de bu amaçlı yapılan array-CGH çalışmasında arr[GRCh37] 17q11.2 (28941066_30367214) x1 baz çiftleri arasında *CRLF3*, *ATAD5*, *TEFM*, *ADAP2*, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2B*, *EVI2A*, *RAB11FIP4*, *MIR193A*, *SUZ12*, *LRRC37B*, *LOC107133515*, *SH3GL1P2*, *SUZ12P1*, *DPRXP4*, *LOC107984974*, *LOC646030*, *MIR4733*, *MIR4724*, *MIR4725*, *MIR365B*, *COPRS*, *UTP6* Genlerini içeren 1.426,149 kb büyüklüğünde bir delesyon saptandı. Hastada saptanan bu mikrolelesyon sendromu, klinik bulguları doğruladı, ayrıca literatür bilgileri ile uyumlu bulundu (Şekil 4.30).



Şekil 4.29. Aile (NF1-19). Aile ağacı.

Moleküler analiz yapılan olgular.



Şekil 4.30. Aile (NF1-19). İndeks (III-5)'de YND ile herhangi bir varyant saptanmadı. İndekse ait MLPA (P081 D1 ve P082 C2 problemleri ile heterozigot tüm gen delesyonu sonucu)

analiz görüntüleri. Olgu III-5'e ait 17. kromozomdaki delesyonu gösteren a-CGH görüntüsü.

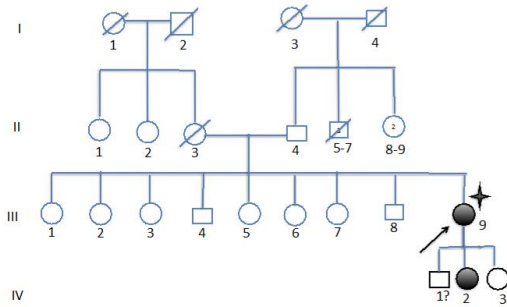
4.20. Aile (NF1-20):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4-1 de gösterilmektedir.

4.20.1. Aile (NF1-20):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.31, III-9) Nörofibromatozis sendromu yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) 5312_5313insC (p.Leu1772Profs*4) [hg19] heterozigotvaryantı saptandı. Saptanan varyantSanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda gösterilmiş olupdaha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.31. Aile (NF1-20). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

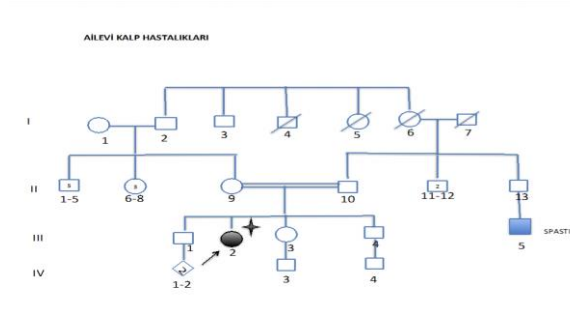
4.21. Aile (NF1-21):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir

4.21.1. Aile (NF1-21):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.32, III-2) yeni nesil dizileme yöntemi ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.4277A>G (p.Gln1426Arg) [hg19] heterozigotvaryant saptandı. Saptanan varyantSanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı. Saptanan bu varyant daha önce nörofibromatozis'de yanlış anlamlı varyasyona yol açan bir varyant olarak bildirilmiş olup klinik ile uyumluluk göstermektedir (Ben-Shachar ve ark, 2013).



Şekil 4.32. Aile (NF1-21). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

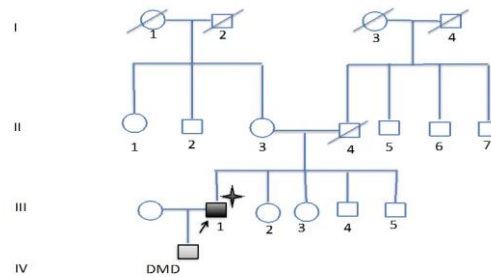
4.22. Aile (NF1-22):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir

4.22.1. Olgu (NF1-22):

Moleküler Bulgular

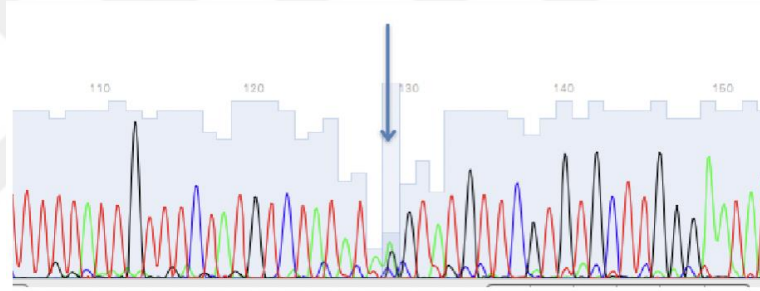
İndeks olguda (Şekil 4.33, III-1) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.2991-1G>A [hg19] heterozigot varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı (Şekil 4.34). Saptanan bu varyant daha önce nörofibromatozis’de 22.intronda kırılma hatasına yol açan heterozigot c.2991-1G>A bir varyant olarak bildirilmiştir (Xiong ve ark, 2015; Ekvall ve ark, 2014; Perrin ve ark, 1996).



Şekil 4.33. Aile (NF1-22). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1; c.2991-1G>A



NF1; (c.2991-1G>A)

Şekil 4.34. Aile (NF1-22). İndeks (III-1)'de YND ile saptanan varyantın (NF1:c.2991-1G>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile konfirmasyonu ve varyanta ait elektroferogram görüntüsü.

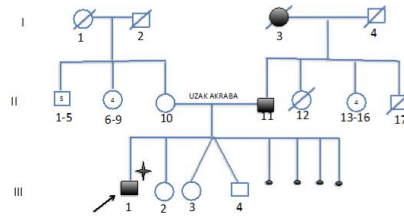
4.23. Aile (NF1-23):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir

4.23.1. Aile (NF1-23):

Moleküler Bulgular

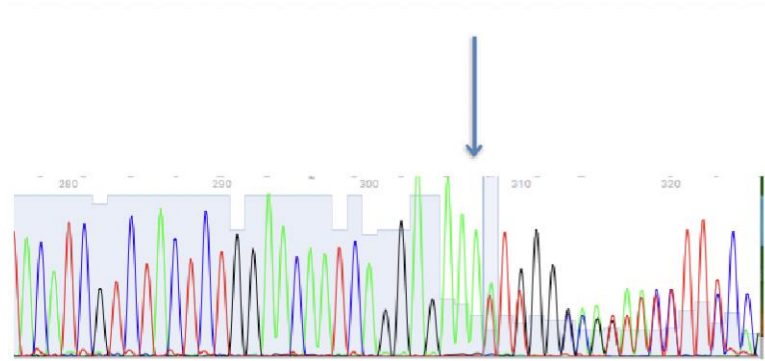
İndeks olguda (Şekil 4.35, III-1) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.4486_4487delAA (p.K1496Nfs*12) [hg19] heterozigotvaryant saptandı. Saptanan varyantSanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı (Şekil 4.36). Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.35. Aile (NF1-23). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1; c.4486_4487delAA (P.K1496Nfs*12)



NF1; (c.4486_4487delAA) (P.K1496Nfs*12)

Şekil 4.36. Aile (NF1-23). İndeks (III-1)'de YND ile saptanan varyantın (NF1:c.4486_4487delAA) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile konfirmasyonu ve varyasyona ait elektroferogram görüntüsü.

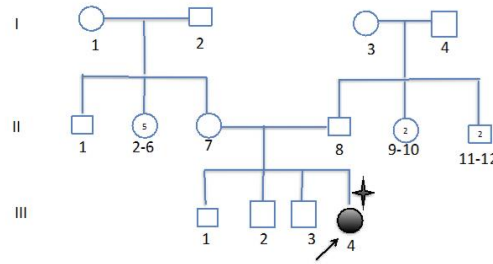
4.24. Aile (NF1-24):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir. Tablodaki bulgulara ek olarak (III-4)'te Hamartomatöz ayrıca hiper pigmente cilt lezyonu tesbit edilmiştir.

4.24.1. Aile (NF1-24):

Moleküler Bulgular

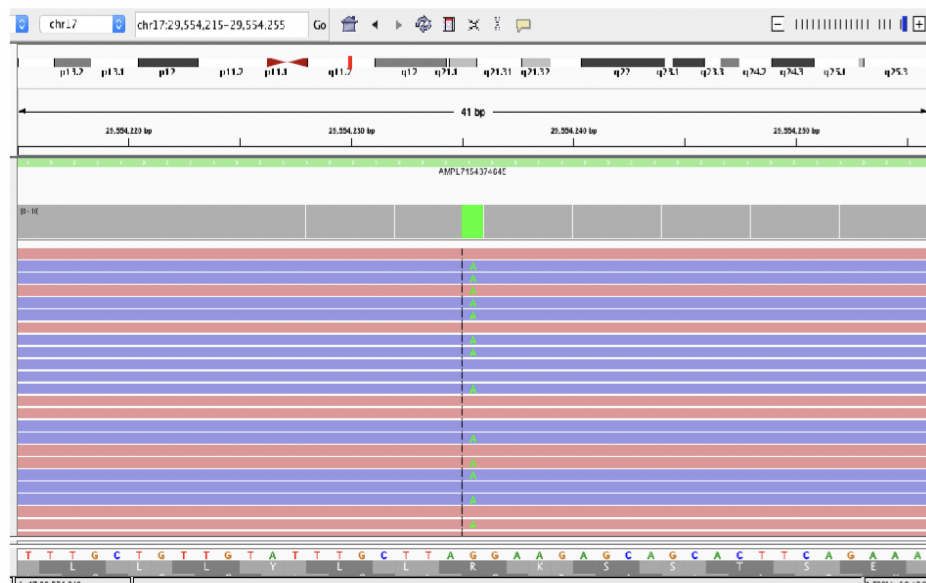
İndeks olguda (Şekil 4.37, III-4) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) c.2252-1G>A [hg19] heterozigotvaryant saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı (Şekil 4.38). Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



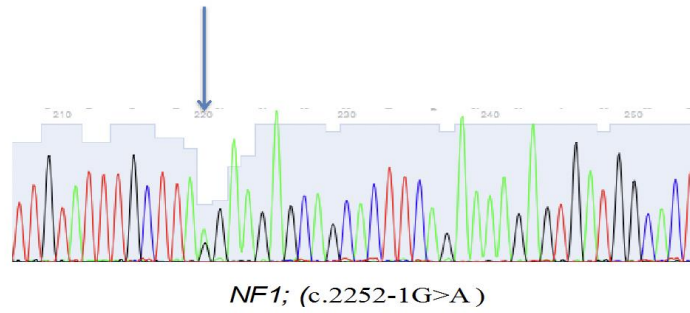
Şekil 4.37. Aile (NF1-24). Aile ağacı.



Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1; c.2252-1G>A)



Şekil 4.38. Aile (NF1-24). İndeks (III-4)'de YND ile saptanan varyantın (NF1: c.2252-1G>A) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile doğrulaması ve mutasyona ait elektroferogram görüntüsü.

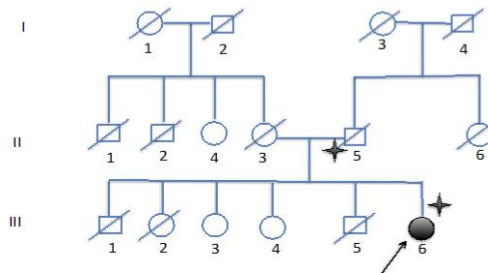
4.25. Aile (NF1-25):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir.

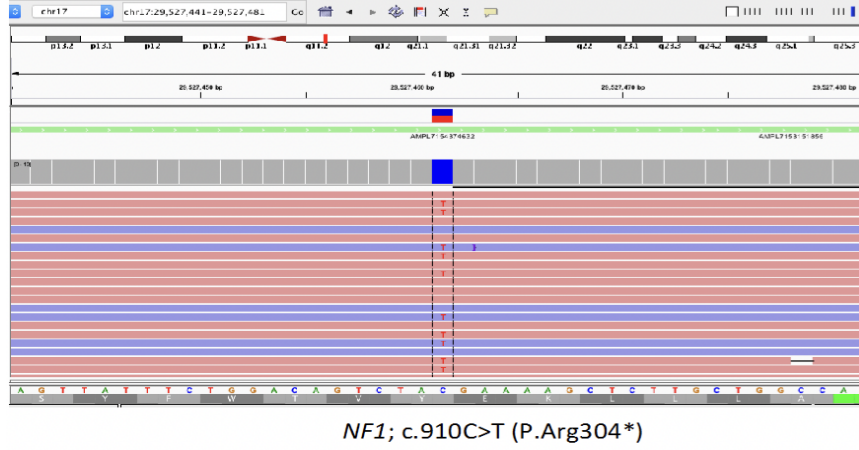
4.25.1. Aile (NF1-25):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.39, III-6) Nörofibromatozis sendromu yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_000267; NP_000258.1) c.910C>T (p.R304Ter) [hg19] heterozigot varyant saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı (Şekil 4.40). Saptanan bu varyant daha önce nörofibromatozis'de anlamsız bir varyant olarak bildirilmiştir (Xiong ve 2015; Ko, 2013; Upadhyaya, 2008).



Şekil 4.39. Olgu (NF1-25). Aile ağacı. ★ Moleküler analiz yapılan olgular.



Şekil 4.40. Aile (NF1-25). İndeks (III-6)'de YND ile saptanan varyantın (NF1: c.910C>T) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü.

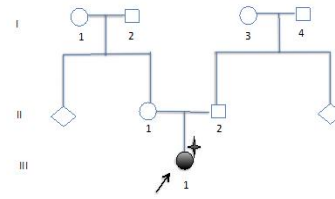
4.26. Aile (NF1-26):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir.

4.26.1. Aile (NF1-26):

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (Şekil 4.41, III-1) yeni nesil dizileme paneli ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) ([hg19] herhangi bir varyant saptanmadı. Araştırmanın devamında indekse ait biyolojik örnek alınamadığından hastaya ait herhangi bir çalışma yapılamadı.



Şekil 4.41. Aile (NF1-26). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.

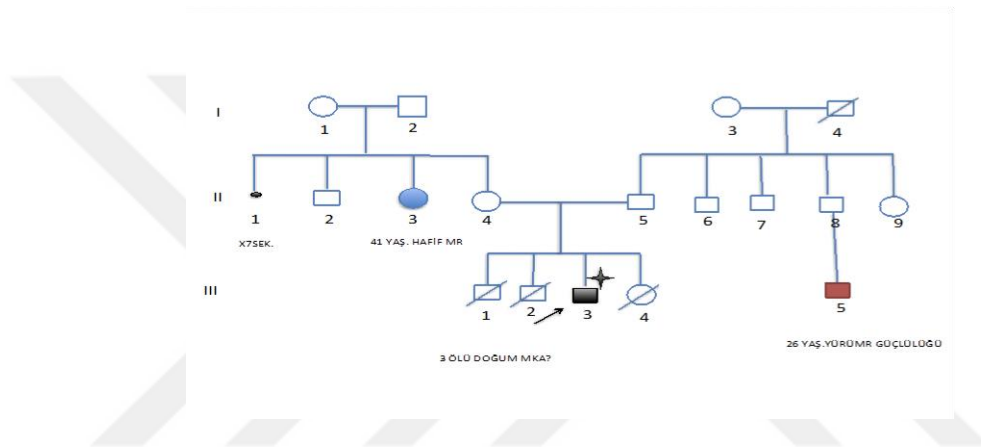
4.27. Aile (NF1-27):

Bu aile ile ilgili klinik bulgular detaylı bir şekilde tablo 4.1 de gösterilmektedir

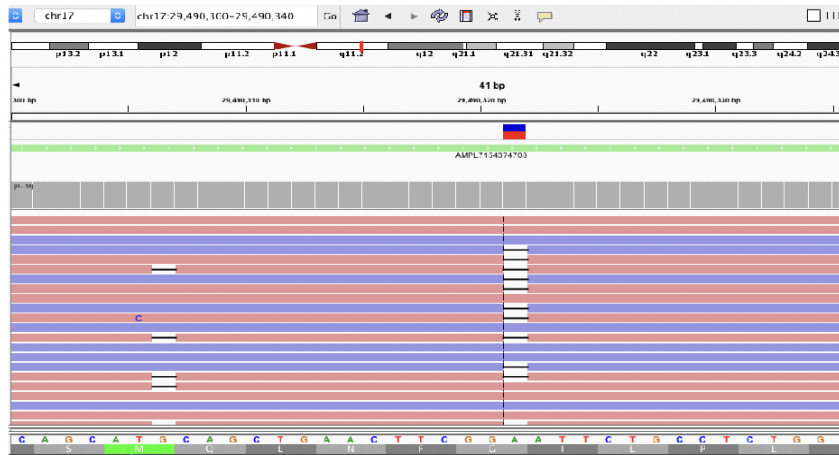
4.27.1. Aile (NF1-27):

Moleküler Bulgular

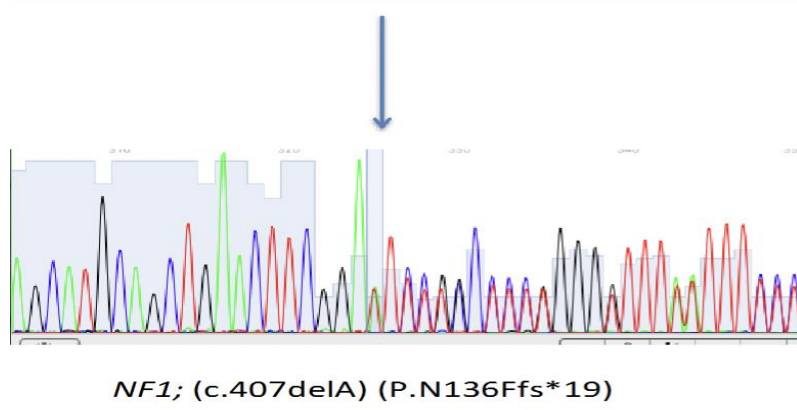
İndeks olguda (Şekil 4.42, III-3) yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) (c.407delA) (p.N136Ffs*19) [hg19] heterozigot varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile olguda heterozigot olarak doğrulandı (Şekil 4.43). Saptanan bu varyant ilk kez bu olguda gösterilmiş olup daha önce literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 4.42. Aile (NF1-27). Aile ağacı. ✦ Moleküler analiz yapılan olgular.



NF1; c.407delA (P.N136Ffs*19)



Şekil 4.43. Aile (NF1-27). İndeks (III-3)'de YND ile saptanan varyantın (NF1: c.407delA) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü, Sanger dizileme ile konfirmasyonu ve varyasyona ait elektroferogram görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Nörofibromatosis Tip 1 (NF1), von Recklinghausen hastalığı olarak da bilinen (MIM # 162200), etnik ve ırksal kökenden bağımsız, dünya genelinde 3000 ila 4000 kişide 1 prevalansına sahip yaygın bir ailevi kanser sendromudur (Barrea ve ark, 2017; Anderson ve ark, 2015). Türkiye’de NF1 hastalığının demografik özellikleriyle ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak dünya genelinde NF1 ile ilgili yapılan araştırmalara göre erkekler ve kadınlar aynı oranda etkilenmektedirler. Bizim çalışmamızda erkek/dişi oranının literatürde belirtilen oranlardan farklı olmasının sebebi çalışmamızın toplum bazlı çalışma olmaması ve sadece araştırma dahilinde NF1 tanısı alan hastalar üzerinde yapılmış olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Bu hastalık, kromozom 17q11.2’de lokalize tümör baskılayıcı bir gen olan *NF1* genindeki dominant mutasyondan kaynaklanan kalıtsal bir bozukluktur (Barrea ve ark, 2017; Online Mendelian, 2017). *NF1* geni, nörofibromin (NM_000267) olarak adlandırılan sitoplazmik bir protein kodlar. Bu protein, dokuların çoğunda düşük düzeyde eksprese (ifade) edilirken, merkezi sinir sisteminde (MSS) en yüksek seviyede eksprese olmaktadır (Barrea ve ark, 2017).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda nörofibrominin farklı fonksiyonel domainleri tanımlanmıştır; CSRD, sistein ve serinden zengini domain; TBD, tubulin bağlanma domaini; GRD, RAS etkileşiminden ve GTP hidrolizinden sorumlu domain; Sec14-PH, çift taraflı lipid bağlanma domaini; CTD, karboksil terminal domaini. Ancak bunlardan bazılarının fonksiyonları halen net olarak aydınlatılamamıştır (Barrea ve ark, 2017; Abramowicz ve ark, 2014; Upadhyaya ve ark, 2007). Nörofibromin, esas olarak GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak işlev görür ve RAS (rat sarkom proteini) aktivitesini inhibe eder. Proto-onkogen olarak işlev gören RAS; iç ve dış uyaranlara bağlı olarak, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını, canlılığını sürdürmesini veya ölümünü tetikler. Nörofibromin, GAP ilişkili domain (GRD) dahil olmak üzere, tüm GAP protein süperailisi (üst ailesi) ile dizi homolojisi göstermektedir (Frayling ve ark, 2018; Scheffzek ve ark 1998). Yapılan araştırmalar, NF1 ile ilişkili tümörlerde, nörofibromin ekspresyon kaybının yüksek seviyelerde aktif RAS ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Hücre tipine bağlı olarak, RAS’ın aşırı aktivasyonu, RAS yolağının devamındaki

proteinleri, AKT/mTOR ve RAF/MEK aracılığıyla sinyalizasyonu artırır. Bu hücreSEL dÜzensizlik NF1'in klinik fenotipinin çoğunu, özellikle NF1'de belirgin olan iyi ve kötü huylu neoplazm riskini açıklamaktadır. Bunun yanı sıra nörofibromin, memelilerde normal embriyonik gelişim için gerekli bir protein olduğundan, bu proteinin yokluğu, esas olarak kan damarlarının anormal gelişimine yol açması nedeniyle yaşamla bağdaşmaz (Barrea ve ark, 2017; Trovó-Marqui ve ark, 2006). Bu gende, çoğunlukla yeni oluşmuş (*de novo*), gen içi delesyon/insersiyon, missens, nonsense tipi ve kırılma bölgesi yerleşimli yüzlerce mutasyon tanımlanmıştır. NF1 geninin büyüklüğü, bu kadar yüksek yeni mutasyon oluşum oranını tek başına tam olarak açıklamamaktadır. Yapılan çalışmalar tesbit edilen mutasyonların gen boyunca rastgele dağıldığını ve mutasyon oluşumuna daha yatkın olan sıcak bölgelerde lokalize olmadıklarını göstermektedir. NF1 genindeki mutasyonlar, herhangi bir ekzonu etkileyen küçük boyutlu delesyon veya insersiyon şeklinde olabileceği gibi, tek baz düzeyindeki değişimlerden megabazlar düzeyine kadar uzayan büyük delesyonlar şeklinde de olabilmektedir. Bu nedenle, rapor edilen mutasyon oranları, kullanılan tekniklere ve doku kaynağına bağlı olarak % 60 ile % 95 arasında değişmektedir (Frayling ve ark, 2018; Upadhyaya ve ark, 2010; Messiaen ve ark, 2000). Bu mutasyonlar heterojen olmakla birlikte herhangi bir domain üzerinde kümelenme göstermemektedir. Belirgin mutasyon sıcak bölgelerinin olmaması ve olağanüstü sık mutasyon insidansı (10.000 gamette 1 civarında) nedeniyle, İnsan Gen Mutasyonu Veri Tabanı'nda (HGMD) 2600'den fazla NF1 gen mutasyonu bildirilmektedir. Çoğu durumda, NF1 tanısı klinik olarak yapılabilir; bununla birlikte, prenatal tanıda, atipik bulguları olan bireylerde veya erken yaştaki çocuklarda, karakteristik özelliklerin gelişmediği durumlarda, genetik test klinik tanıyı kesinleştirmekte önemli bir yer almaktadır. NF1 için resmi klinik kriterler 1988 yılında Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH; *National Institutes of Health*) tarafından yayınlanmış olup 1997'de tekrar düzenlenmiştir. NIH tarafından belirlenen NF1'in ana özellikleri arasında çoklu *cafe-au-lait* (CAL) lekeleri, iriste *Lisch* nodülleri, aksiller çillenme ve nörofibrom adı verilen benign periferik sinir kılıfı tümörleri bulunmaktadır. NF1 ile ilişkili diğer klinik komplikasyonlar arasında nörolojik, renal, kardiyovasküler, gastrointestinal, endokrin ve ortopedik bulgular, öğrenme güçlüğü ve entellektüel yetersizlik, dikkat eksikliği ve periferik sinir kılıfı veya merkezi sinir sistemi maligniteleri bulunmaktadır. NF1 hastalarının yaklaşık dörtte biri önemli morbidite ve mortaliteye neden olan bu klinik komplikasyonlardan birini veya birkaçını

geliştirmektedir (Barrea ve ark, 2017; Upadhyaya ve ark, 2010). Farklı semptomların insidansı değişkenlik gösterir ve 8 yaşında tam bir penetrasyonla zamanla gelişir. CAL lekeleri hastaların en az %95'inde görülürken, diğer bulgular %1'den daha az oranda görülmektedir. Çalışmamızda cafe au lait / CAL lekeleri %95 oranıyla en sık görülen deri bulgusu olarak literatür ile uyumluluk göstermektedir. CAL lekeleri, psödartoz, optik gliomalar ve dışarıdan görülebilen pleksiform nörofibromlar hayatın ilk yıllarında belirginleşirken, çillenme ve ciddi skolyoz 7 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda ise literatüre benzer şekilde iskelet sistemi bulguları erişkin dönemlerdeki hastalarda görülürken CAL lekeleri ve optik gliomalar daha erken yaşta tespit edilmiştir.

Subkutan nörofibromlar ve iristeki Lisch nodülleri ergen veya genç erişkin dönemde ortaya çıkma eğiliminde olmakla birlikte, maligniteler çoğunlukla yetişkin dönemde gözlenir. Çalışmamızda ise literatür ile uyumlu olarak nörofibromlar ve iristeki Lisch nodülleri erişkin dönemdeki hastalarda görülmüştür, ancak malignitelerin çoğunlukla yetişkin yaştaki hastalarda ortaya çıktığı tespit edilmiştir. NF1'den etkilenen bireylerde, nörofibromların ve OPG'lerin dışında, MPNST'ler, rabdomiyosarkomlar, lösemiler, nöroblastomlar, feokromositomalar, gastrointestinal stromal tümörler (GIST'ler), glomus tümörleri ve meme ve/veya over kanserleri gibi iyi huylu ve kötü huylu tümörler de gelişebilmektedir (Koczkowska ve ark, 2019; Uusitalo ve ark, 2015). Genel olarak farklı hastalardan elde edilen tümör dokularında saptanan germline ve somatik mutasyonların karakterizasyonu, *NF1* gen mutasyonunun tipi, doğası ve sıklığı hakkında bilgiler sağlamış olsa da, NF1'de tümör oluşumunun moleküler mekanizmaları hakkındaki mevcut bilimiz halen sınırlıdır. Bunun yanı sıra nörofibromatozis ile ilişkili birçok sendrom ortak klinik bulgular göstermekte ve bu durum özellikle antenatal dönemde kesin tanı açısından zorluklara yol açabilmektedir. Bu nedenle, nörofibromatozis ile ilişkili sendromların sıklıklarının ve moleküler etiyopatogenezlerinin bilinmesi, prenatal ve postnatal olguların izlemi açısından önem kazanmaktadır. Dolayısıyla, bu hastalıkta klinik tanının yanı sıra moleküler tanı da önem kazanmaktadır. Bu nedenle moleküler analizleri hızlandırmak, ekonomik açıdan uygun hale getirmek, NF1 ile ilişkili tümörlerde ilgili biyolojik yolların genotip-fenotip ilişkisi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla bu tez çalışmasında hedef genin YND tabanlı NF1-gen testi ile dizilenmiş, saptanan varyantlar Sanger dizileme yöntemi

ile doğrulanmış, ayrıca büyük delesyon/duplikasyonların ve NF1 mikrodelesyon sendromunun araştırılmasında MLPA ve array-CGH teknikleri kullanılmıştır.

Bu kapsamda yaptığımız çalışmada ilk önce kliniğimizde 2009-2018 yılları arasında nörofibromatozis tanı kriterleri ile takip edilen veya yeni NF1 klinik tanı alan 27 aileden 47 olgu klinik ve diğer laboratuvar testleri eşliğinde incelendi. Araştırmanın devamında, hastalık ilişkili *NF1* geninin protein kodlayan bölgelerini ve ekzon-intron sınırlarını kapsayan YND tabanlı NF1-gen testinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve saptanan varyantların klinik önemi olduğu düşünülenlerin özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile konfirmasyonu, aile segregasyon analiz sonuçlarının incelenmesi, herhangi bir mutasyon/varyant ilişkisi saptanmayan olgularda *NF1* yeni nesil dizileme tasarım gereği kapsam dışı olduğu bilinen bölgelere ait tasarlanan primerler kullanılarak, Sanger dizileme ile araştırılması gerçekleştirildi. Araştırmanın son aşamasında herhangi bir varyasyon saptanmayan ancak nörofibromatozis tip1 tanı kriterleri ile uyumluluk gösteren hastalarda, fenotiple ilişkisi olan *NF1* genindeki olası büyük delesyon ve duplikasyonlar için kullanılan MLPA ve array-CGH yönteminin moleküler tanıya katkısı değerlendirildi. Bu çalışmada mutasyon saptanan olgu ve ailelerinin özgün genetik danışma almaları, postnatal ve taşıyıcılık testlerinin yapılması ve prenatal tanı için zemin oluşturulması ise klinik izlemdeki en önemli katkı olacaktır. Çalışmamızda *NF1* geninde saptanan yeni değişimlerin doğrulama çalışmalarında kalıtım modeli ve değişimin tipine bağlı olarak aile çalışmasında gerekmektedir.

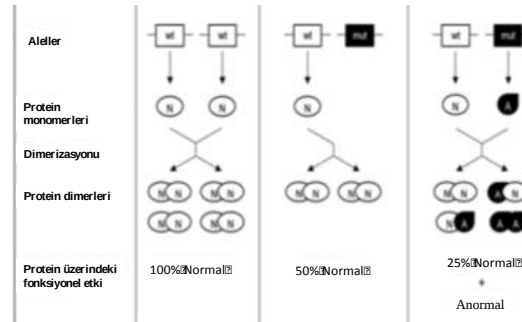
YND ile saptanan varyantların hastalıkla ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesi güncel literatür ve veritabanların katkısıyla dahi kolay olmayabilir bu nedenle aile içi ko-segregasyon çalışmaları, net bir patojenliği olmayan ve/veya veritabanlarında daha önceden rapor edilmemiş, özellikle missense tipi varyantların yorumlanmasına katkı sağlayabilmektedir. Çalışmamızda saptanan yeni değişimler, aile içi ko-segregasyon çalışmasının önemini göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında incelenen 27 ailedeki NF1 tanılı hastalarda çerçeve kaymasına yol açan insersiyon/delesyon tipi veya kırılma bölgesi yerleşimli, yanlış anlamlı ve *NF1* geni ile birlikte 23 geni içeren 1.4 MB'lık delesyon olan toplam 24 adet farklı tip varyant saptandı. Saptanan varyantların, etki mekanizması ve klinik ilişkisi yönünden her olguda ayrı değerlendirilmesi gerekse de, aynı tip varyantların aynı başlık

altında tartışılabilir.

Yanlış Anlamlı (Missens Tipi) Varyantlar

NF1 klinik kesin tanılu olgu A15-II-4'de saptanan *NF1* genindeki c.746T>C (p.Leu249Pro) yanlış anlamlı mutasyonu ilk kez bu olguda saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir. Yalnızca nörofibromlar ve Lisch nodülleri bulguları ile kesin NF1 klinik tanısı alan 57 yaşındaki erkek olgumuzda saptanan c.746T>C mutasyonu protein düzeyinde 249. kodonda nötr- non polar Leucine yerine nötr-non polar Proline dönüşmesine neden olmakta ve proteinin CSRD: sistein ve serinden zengin domaininde yer almaktadır. Saptadığımız c.746T>C (p.Leu249Pro) mutasyonunun poli peptit düzeyinde aynı pozisyondaki aminoasitin değişimine yol açması nedeniyle proteinin etkisini değiştirmesi beklenmektedir. Yapılan araştırmalar *NF1* genindeki CSRD heterozigot yeni fonksiyon kazanımına neden olan yanlış anlamlı mutasyonları nörofibromatozis ile ilişkilendirilmiş olup ayrıca çalışmamızda *NF1* geninde saptanan ve daha önce literatürde bildirilmemiş olan c.746T>C (p.Leu249Pro) mutasyonu *in silico* tahmin programlarında zararlı olarak değerlendirilmektedir. Genellikle normal proteinin bir alelinin eksprese edilmemesine ve protein fonksiyonunun yarı yarıya azalmasına neden olan örneğin, çerçeve kayması (FS) ve anlamsız (NS) mutasyonların yol açtığı erken terminasyon kodonlarının NMD (*nonsense mediated decay*) mekanizması ile yıkılmasına beklenmektedir. Bununla birlikte, NMD'yi uyarmayan yanlış anlamlı (MS) mutasyonları mutant polipeptidin hem kendisinin yetersiz olması hem de, normal allelin kodladığı proteini bozmasına yol açarak proteinin normal fonksiyonun dörtte üçü kadar azalması ile sonuçlanır. Bu nedenle MS mutasyonların klinik bulguları diğer mutasyon tiplerine göre daha ağır olması beklenir. (Frayling ve ark, 2018) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Mutasyonların, dimerler olarak işlev gören proteinler üzerindeki potansiyel etkilerinin şematik olarak göstermektedir (Dominant negatif etki) (Frayling ve ark, 2018’ den değiştirilerek alınmış).

Yapılan çalışmalar CSRD domaininde saptanan MS tipi mutasyonlarının yüksek sıklıkta MPNST'ler, optik yol gliomları (OPG) ve malign neoplazmalar dahil olmak üzere daha şiddetli bir NF1 fenotipine neden olduğunu tesbit etmiştir (Frayling ve ark, 2018; Koczkowska ve ark, 2018; Rojnueangnit ve ark, 2015; Ben-Shachar ve ark, 2013). Çalışmamızda literatürden farklı olarak A15-II-4 olgusundaki daha hafif bulguların ortaya çıkmış olamasın, hastaya ait polimorfizmlere, modifiye edici genlere ve cinsiyet gibi faktörlere bağlı olduğu tahmin edilmiştir (Mao ve ark, 2018; Emmerich ve ark, 2015). Ancak bu hipotezin doğrulanması için daha fazla heterozigot olgunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu veriler, TED yaklaşımı ile daha geniş kapsam ve derinlikte dizileme yapılarak yeni genlerin ve fenotipi etkileyen bir çok varyantın saptanabileceğini düşündürmektedir

Bu çalışma kapsamında (A16-III-4) olgusunda *NF1* geninde saptanan c.4168C>T (p.Leu1390Phe) yanlış anlamlı bir diğer varyant daha önce Nyström ve ark. 'nın (2009) tarafından yapılan çalışmada heterozigot formda saptanmıştır. Bu yanlış anlamlı değişim non-polar nötr Leucine yerine non-polar nötr Phenylalanine geçmesine neden olmakta ve proteinin GRD: RAS etkileşimden ve GTP hidrolizinden sorumlu domeininde yer almaktadır. GRD bölgesinde yer alan c.4168C>T mutasyonunun *in silico* tahmin programlarında "zararlı" yönünde değerlendirilmesi hastanın klinik bulgularıyla uyumluluk göstermektedir. çalışmalar *NF1* geninde patojenik missens varyantlarının yaşam boyu artmış malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST'ler) riski, dismorfik yüz bulguları, öğrenme güçlüğü, iskelet anormalliklerinin ve malign

neoplazmaların daha erken yaşta ortaya çıkışıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Koczkowska ve ark, 2019; Kehrer-Sawatzki, 2017). Hastamızda saptanan öğrenme güçlüğü, epilepsi, psiko-motor gelişim geriliği ve kemik erimesi anomalileri literatür ile uyumlu bulunmuştur. Bu mutasyon sonucunda oluşan iskelet anomalilerinin altında yatan patojenik mekanizmalar ise tam olarak anlaşılamamıştır ve multifaktöryal bir etiyolojiye sahip olabildiği düşünülmektedir. Yapılan son çalışmalar nörofibrominin ossifikasyon sırasında osteoprojenitörlerin yanı sıra kemik matriksinin kompozisyonunun düzenlenmesinden sorumlu olduğunu bildirilmiştir (Banerjee ve ark, 2017). Ek olarak, nörofibromin haplo yetersizliğinin osteoblastların erken apoptozuna ve osteoprojenitör hücrelerin proliferasyonunda / farklılaşmasında değişikliğe yol açtığını belirtilmiştir. Yapılan diğer deneysel araştırmalar bu gendeki mutasyonun ayrıca osteoblastlarda azalmaya, osteoklastlar sağkalım oranında artışa ve kemik dokusunda bozulmaya neden olduğunu göstermektedir (Tong ve ark, 2012). Çalışmamızda (A16-III-4)'de saptanan skolyoz ve kemik erimesi bulguları literatür ile uyumlu bulunup ayrıca bu mutasyonun daha ağır bir patojenik etkisi olduğunu düşüncesini desteklemektedir. Çalışmamızda İndeks olguda şiddetli NF1 klinik bulguları ile kardiyovasküler (Pulmoner Stenoz) hastalığın birlikteliği sebebi ile, hasta Watson sendromu olarak değerlendirildi (Nyström ve ark, 2009; Watson, 1967).

Aynı grupta NF1 geninde (A21-III-2) olgusunda saptanan diğer bir yanlış anlamlı c.4277A>G (p.Gln1426Arg) mutasyonu daha önce Ben-Shachar ve ark.'nın (2013) çalışmasında heterozigot formda saptanmıştır. Bu mutasyon polar yüksüz Glutaminim, pozitif yüklü polar Arginine dönüşmesine neden olmaktadır ve proteinin GRD: RAS etkileşimden ve GTP hidrolizinden sorumlu domaininde yer almaktadır (Ben-Shachar ve ark, 2013). Bu yanlış anlamlı değişimin polipeptid zincirinde aynı pozisyonadaki polar yüksüz Glutamine yerine pozitif yüklü polar asidik Arginine geçmesi nedeniyle proteinin etkisini değiştirmesi beklenmektedir. Ayrıca bu mutasyonun *in silico* tahmin programlarında "zararlı" yönünde değerlendirilmesi bu bilgiyi desteklemektedir. Araştırmamızda ve benzer domainde yapılan diğer araştırmalara göre dominant negatif etki yaratan yanlış anlamlı NF1 gen mutasyonlarının MPNST'ler, optik yol gliomları (OPG) ve malign neoplaziler dahil olmak üzere daha şiddetli bir NF1 fenotipine neden olduğu gözlenmiştir (Frayling ve ark, 2018; Koczkowska ve ark, 2018; Rojnueangnit ve ark, 2015). Çalışmamızda 35 yaşındaki kadın olguda saptanan Lisch nodülü,

nörofibromlar, pleksiform nörofibrom ve meningom gibi neoplaziler literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Küçük Boyutlu İnsersiyon/Delsyon Tipi ve Kırpılma Bölgesi Yerleşimli Varyantlar

NF1 geninde YND çalışmamızda NF1-1 ailesinde saptanan c.5294C>A (p.ser1765*) heterozigot mutasyonu daha önce nörofibromatozis ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiştir (Cassiman ve ark, 2017). NF1-1 ailemizde ekzon 37’de saptanan bu değişimi *in silico* tahmin programları patojenik lehine değerlendirmektedir. Bu mutasyonun, anlamsız tipte bir mutasyon olup protein düzeyinde 1765.kodonun erken dur şifresine dönüştürmekte ve truncated (güçük) protein oluşumuna neden olmaktadır. Hücrede normalde Olgun RNA (kırpılmış), çekirdekten sitoplazmaya ulaştığında, intronların pozisyonlarını hafızada taşır (kırpılma mekanizmasının proteinlerini; exon junction complex/EJC leri kırpılma noktalarında taşır). Translasyonda, ribosom her yeni kırpılma noktasına ulaşıldığında oradaki EJC ortamdan uzaklaşır. Erken terminasyon olduğunda, ribosom tüm intron izlerine ulaşamamış olduğundan, mRNA üzerinde arta kalan EJC’ler ilgili mRNA nın yıkımı için bir sinyal oluşturur. Bu mekanizma, erken dur kodonu içeren mRNA ların nonsense-mediated decay mekanizması tarafından tanınır ve yok edilmesini sağlar. Bu sebepten c.5294C>A mutasyonu sonucunda oluşan küçük protein NMD (*nonsense mediated decay*) mekanizması ile yıkılmakta ve fonksiyon kaybı oluşumundan dolayı patolojik bir değişim olarak değerlendirilmektedir.

Olgumuzda saptanan c.5294C>A değişimi nörofibromin proteinin CTD domainini etkilemektedir. Daha önce yapılan farklı çalışmalar proteinin CTD domaini üzerinde etki eden aynı tipteki mutasyonlarının nörofibromatozis ile ilişkili olduğunu ve bu hastalarda kütanöz nörofibromların daha fazla gözlendiğini bildirilmiştir (Frayling ve ark, 2018; De raedt ve ark, 2003; Pinna ve ark, 2015; Rojnueangnit ve ark, 2015; Pasmant ve ark, 2010; Upadhyaya ve ark, 2007). Çalışmamızda mutasyonun aynı domaini etkilediğini göz önünde bulundurulduğunda, olgularımızdaki fenotipik bulgular literatürle uyumlu bulundu. Cassiman ve ark. 2017 tarafından yapılan çalışmada, bildirilen anlamsız tipteki bu mutasyonun fenotipik spektrumu çok geniş olmakla birlikte ailemizdeki bazı olgularda literatürde bildirilmiş olgulara oranla çok daha ağır bir fenotipik etki göstermektedir. Örneğin c.5294C>A (p.Ser1765*) mutasyonunu taşıyan NF1-1 ailesinde, oldukça ciddi klinik belirtileri olan II-10, III-1, III-2 ve III-3

olgularında hem de daha hafif semptomlar gösteren III-2, III-4 olgularında aynı mutasyon saptanmıştır. Nörofibromatosiz sendromunda genotip-fenotip korelasyonu oldukça zor olduğundan şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *NF1* genindeki mutasyonların yeri ve/veya tipi ile klinik fenotip arasında kesin bir bağlantı kurulamamıştır. Bu hastalıkta aynı ailede aynı mutasyonu taşıyan aile bireyleri arasında dahi belirgin klinik farklılıklar gözlenebilmektedir. Genelde, daha ciddi semptomlar daha yaşlı hastalarda gözlenirken, prepubertal hastalar nispeten hafif bir fenotiple (sadece café-au-lait lekeleri gibi) gözlenmiştir (Mao ve ark, 2018). Bu ailede 2 yıllık bir gözlem süresi boyunca (2017-2019) Hasta II-10, III-2 ve III-3'te kutanöz nörofibromların sayısında ve boyutunda bir artış şeklinde giderek ağırlaşmış olmasına rağmen III-4 numaralı hastada kutanöz nörofibromların sayısında herhangi bir artış gerçekleşmemiştir.

Daha önce literatürde tanımlanmamış ve ilk kez bu çalışmadaki olgularda (A4- II-11 ve III-1 ve III-4) saptanan bir diğer c.2799_2800insT (p.N935*) mutasyonu, tek bazlık insersiyon tipi mutasyon olup peptid zincirinde 935.kodondaki Asparagine aminoasidinin erken dur kodonuna dönüşmesi ile protein trunkasyonuna yol açması beklenmektedir. Çerçeve kayması tipte olan bu mutasyonun proteinin GSRD (sistein ve serinden zengini domain) domainini kodlayan bölgesini etkilemektedir. *Koczkowska* ve ark. (2019) ve *Kehrer-Sawatzki*. (2017) tarafından yapılan çalışmalar, proteinin GSRD domainini kodlayan farklı ekzonlarda gerçekleşen patojenik varyantların, erken yaşta yüksek pleksiform nörofibrom prevalansı, dismorfik yüz bulguları ve öğrenme güçlüğü olan / olmayan global gelişime geriliği ve yaşam boyu artmış malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST'ler) riski dahil olmak üzere şiddetli bulgular açısından önemli risk faktörleri olduğunu göstermiştir (Koczkowska ve ark, 2019; Kehrer-Sawatzki, 2017). Ailemizde klinik olarak benzerlik gösteren olgularda daha ciddi semptomlar daha yaşlı hastalarda gözlenirken (A4- II-11), prepubertal dönemde olan olguda (A4- III-1) hastalığın nispeten hafif bir fenotiple seyretmesi bu bilgiyi desteklemektedir. Ayrıca *in silico* tahmin programlarına göre hastalık sebebi olduğu düşünülen bu değişimin olgunun etkilenmiş ve nörofibromatozis kesin tanı alan çocuklarında da (III-1ve III-4)'tesbit edilmesi, mutasyonun ailevi ve fenotip ilişkili olduğu bilgisini güçlendirmiştir. İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı'nda (HGMD, 2017 Ağustos) raporlanan mutasyonunların % 20,9'u insersiyon tipi mutasyonlar olduğunu bildirmiştir. Bizim

olgumuzda saptanan ve çerçeve kaymasına yol açan c.2799_2800insT mutasyonu da nörofibromatozis sendromu ile ilişkili yeni bir mutasyon olarak literatüre katkı sağlayacaktır.

NF1 geninde YND çalışmamızda heterozigot olarak saptanan c.1555C>T (p.Q519*) varyantı daha önce nörofibromatozis ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiştir (Momozawa ve ark, 2018). *NF1-9* ailemizde saptanan bu değişimi *in silico* tahmin programları patojenik olarak değerlendirmektedir. Bu mutasyon, anlamsız (non-sense) tipte bir mutasyon olup protein düzeyinde 519. pozisyonundaki glutamine aminoasidinin, dur kodonuna değişmesi ile protein trunkasyonuna sebep olup takibinde NMD mekanizması ile yıkılması ve fonksiyon kaybı oluşumundan dolayı patolojik bir değişim olarak değerlendirilmiştir. Optik gliom ve deri bulguları eşliğine nörofibromatozis tanısı alan hastada ve etkilenmiş çocuğunda aynı mutasyonun saptanmış olması, bu mutasyonun hastalıkla direkt ilişkili olduğu bilgisini desteklemektedir.

Bu başlık altında A13-II-8 olguda saptanan *NF1*; c.8007C>G değişimi ise daha önce literatürde bildirilmemiştir. Ancak bu değişimin, protein düzeyinde 2669. kodonda Tyrosine yerine dur kodonunun gelmesi ile erken terminasyon ve protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.Tyr2669*) patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. Yapılanç alışmalara dayanarak protein sentezinde erken terminasyona neden olan mutasyonların NMD mekanizması ile ortadan kaldırılıp normal proteinin bir alelinin eksprese edilmemesine sebep olmaktadır. Bu mekanizma protein fonksiyonunun yarı yarıya azalmasına neden olmuş olsada hücreye zarar verebilecek anormal proteinlerin sentezlenmesi önleyip bu sebeple yanlış anlamlı mutasyonlarla kıyasla daha hafif klinik bulguların ortaya çıkmasına sebep olur. Kırkdört yaşındaki kadın olguda (A13-II-8) yalnızca nörofibromların izlenmesi bu mutasyonu taşıyan bireylerde daha hafif klinik bulguların ortaya çıktığı düşüncesini akla getirmektedir. Ancak bu mutasyonu taşıyan olgu sayısının az olması ve çalışmamızda sadece tek bir olguda saptanmış olması göz önünde bulundurulduğunda, bu konuda bir kanıya varmanın güç olduğu söylenebilir. Saptanan bu mutasyonun klinik bulgularla ilişkisini aydınlatabilmek için yeni olgulara ve fonksiyel çalışmalara ihtiyaç vardır.

NF1 geninde (A2-II-7 ve A2-III-3) olgularında saptanan c.4662-2A>C mutasyonu daha önce Sabbagh ve ark. (2013) tarafından kırılma hatası mutasyonu olarak bildirilmiş olup (Sabbagh ve ark, 2013) ayrıca Xiong ve ark (2015) tarafında yapılan *in silico*

analizlerde bu değişimin kırılma paternini önemli derecede değiştirdiği açıklanmıştır. Çalışmamızda saptanan c.4662-2A>C mutasyonunu *NF1* geninde 34. intronun *acceptor* kırılma bölgesinin hatalı kırılmasına yol açarak, anormal protein ürününün oluşmasına neden olduğu transkript ve cDNA düzeyinde yapılan *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Sabbagh ve ark, 2013). Çalışmamızda aynı ailede nörofibromatozis kesin tanısı alan etkilenmiş iki farklı olguda (A2-II-7 ve A2-III-3) saptanan *NF1* genindeki bu değişimin heteroozigot formda olması, c.4662-2A>C değişiminin nörofibromatozis ile ilişkili bir mutasyon olduğu bilgisini desteklemektedir. Yapılan çalışmalara göre kırılma mutasyonu olan hastalar NIH tanı kriterlerin yanı sıra, diğer mutasyon tiplerine kıyasla, intraserebral glioma ve diğer kanser türlerine daha fazla yakınlık göstermektedirler (Barrea ve ark, 2017; Alkindy ve ark, 2012). Çalışmamızda olgu A2-III-3'te nörofibromatozis tanı kriterlerinin yanı sıra erken yaşta meme ve akciğer kanserinin ortaya çıkması, kırılma hatası mutasyonların, farklı neoplazilere özellikle sporadik meme kanserlerine daha yakınlık oldukları bilgisini desteklemektedir. Benzer şekilde Perrin ve ark. (1996) tarafından ilk olarak saptanmış olan bir diğer kırılma hatası mutasyonu *NF1*; c.2991-1G>A olup kırılma bölgesi skoru göz önünde bulundurularak patojenik bir varyasyon olarak değerlendirilmiştir. *acceptor* kırılma bölgesinin hatalı kırılmamasına yol açan ve daha önce literatürde tanımlanmamış ve ilk kez bu çalışmada olgu A24-III-4'de saptanan c.2252-1G>A varyantı genin 18. intronunda yer almaktadır. Oluşan varyantın trunke (güdük) protein üretebileceği ve NMD ile yıkılacağı düşünöldü ayrıca *in silico tahmin programları* bu varyantın patojenik bir etkiye sahip olabileceğini destekledi. Çalışmamızda mutasyon özelinde genotip-fenotip korelasyonu yapmak için olgu sayısı yetersiz olsada literatürde ve araştırmamız dahilinde aynı mutasyon tipini taşıyan bireylerin yüksek sayıda olduğu bu mutasyon tiplerin daha yaygın olduğunu ve olgularda *NF1*'e ait bulguların daha erken yaşta ortaya çıktığını göstermektedir. Aynı zamanda bu tip mutasyonu taşıyan bireylerde kutanoz nörofibromların 8-18 yaş aralığında geliştiiği ve diğer mutasyon tiplerine kıyasla öğrenme güçlüğü'nün daha az göröndüğü literatürle uyumlu bulunmuştur.

NF1 geninde saptanan heterozigot c.5312_5313insC (p.Leu1772Profs*4) mutasyonu daha önce nörofibromatozis ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmemiştir. A20-II-8'de saptanan bu değişim, protein düzeyinde çerçeve kaymasına ve muhtemelen protein

trunkasyonuna yol açması beklendiğinden patojenik bir değişim olarak değerlendirildi. Genin 37'inci ekzonunda çerçeve kaymasına yol açan bu değişim, proteinin CTD (karboksil terminal domaini) domainini etkilemektedir. Nörofibromin üzerinde yapılan araştırmalar büyük ölçüde RasGAP fonksiyonu ve tümör oluşumu üzerine odaklanmış olsa da, nörofibrominin GAP dışında başka fonksiyonel domainleri olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Ayrıca, GRD, nörofibromin proteinin sadece %10'unu içermekte olup %90'ı diğer domainlerden oluşmaktadır. Nitekim hücre hatlarında kullanılan Ras inhibitörleri, NF1 fenotipinin tamamen kaybolmadığını ve sadece bazı bulguların yok olduğunu saptamaktadır. Bu sonuçlar nörofibrominin GRD dışında başka fonksiyonel domain'in olduğunu ve bunların birlikte diğer proteinlerle bağlantı kurarak işlev yaptığının göstergesidir. (Li ve ark, 2001; Vandenbroucke ve ark, 2004). Çalışmamızda 34 yaşındaki kadın olguda CTD domaini etkileyen çerçeve kayması tipindeki mutasyondan kaynaklandığını düşündüğümüz; Lisch nodülleri, skolyoz nörofibrom, cafe-au-lait /CAL lekeleri gibi klinik bulguların ortaya çıkması, mutasyonun NF1 ile direkt ilişkili olduğunu desteklemekte olup literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ancak çalışmamızda indeks olgunun yakınlarından herhangi bir biyolojik örnek elde edemediğimiz için, segregasyon analizi tamamlanamamış ve bu konuda net bir sonuca varılamamıştır.

Olgu A6-IV-4'te, *NF1* geninde saptanan bir diğer heterozigot c.7684_7685delAG (p.R2562Dfs*12) mutasyonu daha önce nörofibromatozis ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiş olup proteinin CTD domainini etkilemektedir (Xu ve ark, 2014). Bu değişimin, protein düzeyinde 2562.kodonda Arginine yerine Aspartik asidin gelmesine, çerçeve kaymasına ve 12. kodonun erken dur şifresine dönüşme sebebi ile protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.R2562Dfs*12) patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. Ailede nörofibromatozis kesin tanıılı üç farklı etkilenmiş olguda *NF1* genindeki bu değişimin heterozigot formda saptanmış olması, değişimin hastalıkla segregasyon olduğunu göstermekte ve literatür bilgisini desteklemektedir. Benzer şekilde bu ailede mutasyon saptanan 49 yaşındaki kadın olguda (A6-III-3) oldukça ciddi klinik bulguların saptanmış olması, bu mutasyon ile ilgili klinik bulguların yaş ile birlikte arttığını düşündürmektedir. Ancak bu konuda net bir sonuca varmak için hem indeks olgu hem de diğer iki etkilenmiş olguda uzun süreli takip gerekmektedir. Yapılan çalışmalar hastanın fiziksel durumunun, özellikle hormon seviyesinin NF1 gelişiminde

önemli bir rol oynadığını, bunun sonucu olarak ayrıca NF1'e bağlı bazı bulguların hamilelik sonrasında ortaya çıkabildiğini vurgulamaktadır (Mao ve ark, 2018). Çalışmamızdaki olguda (A6-III-3) daha ağır bulguların saptanmış olması literatür bilgisini desteklemektedir. NF1 hastalarında genotip-fenotip korelasyonları ile ilgili çeşitli raporların bildirilmiş olmasına rağmen (Mao ve ark, 2018; Alkindy ve ark, 2012; Upadhyaya ve ark, 2007), hastalar arasında gözlenen karmaşık klinik bulguların altında yatan nedenler henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Mao ve ark, 2018; Faden ve ark, 2017).

Makrosefali ve nörofibrom gibi klinik bulgular ile NF1 tanısı alan 41 yaşındaki bir olguda (A7-II-4) daha önce literatürde tanımlanmamış ve ilk kez bu çalışmada saptanan c.4931_4931delT (p.P1646Lfs*31) mutasyonu küçük delesyon tipi mutasyon olup gen transkriptinde çerçeve kaymasına ve protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden patojenik bir değişim olarak değerlendirildi. Çerçeve kayması, proteinin CTD: karboksil terminal domaini etkilemektedir. Çalışmamızda yapılan segregasyon analiz sonucunda, mutasyonun NF1 klinik tanılı hastalarda saptanmış olması ancak sağlıklı bireylerde bulunmaması, c.4931_4931delT mutasyonun direkt hastalıkla ilişkili (/hastalık ile segrege olduğu) olduğu düşüncesini güçlendirmektedir. Bu ailede indeks olgunun her iki kızında erken yaşta saptanan lisch nodülleri, beyin ve beyincikte nörofibromları ve optik gliom gibi şiddetli bulguların saptanmış olması NF1 ile ilgili erken başlangıç ve ağır klinik bulguların sadece GRD bölgesinde oluşan fonksiyon kaybı veya kazanımı mutasyonlar ile ilgili olmadığı ve diğer domainlerinde fonksiyonel olarak nörofibromin proteininin yapısında önemli etkiye sahip olduğu düşüncesini desteklemektedir. Ancak ileride yapılacak olan fonksiyonel çalışmalar bu bilgiyi destekleyecektir.

Çalışmamızda saptanan ve NF1 proteininin CTD domainin etkilenen bir diğer mutasyon A18-III-4'te tespit edilmiştir. Bu olguda saptanan heterozigot c.6862 delT (p.Ser2288Argfs*10) değişimi ilk kez bu çalışmada saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir. NF1 genin 46. eksonunda bulunan bu değişimin, protein düzeyinde 586. kodonda Serine yerine Arginine gelmesine, çerçeve kayması ve devamında 10. kodonun dur şifresi olarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (P.ser2288Argfs*10) patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. NF1 tanı kriterlerinin yanı sıra hastada; pektus karinatum, korpus kallosum'da 1x7mm boyutunda kontrast tutmayan hamartom gibi bulguların saptanmış olması bu fonksiyon

kaybı mutasyonunun direkt hastalıkla ilişki olduğunu ayrıca c.6862 delT mutasyonunun dışında, modifiye edici genler ve diğer varyantların klinik bulguların ortaya çıkmasında etkili olduğu düşüncesini akla getirmektedir. NF1 ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz ancak aile segregasyon analizi yapılamadığından bu konu ile ilgili net bir sonuca varmak güçtür. Çalışmanın ileri aşamasında yapılacak olan segregasyon analizi bu bilgiyi güçlendirecek ayrıca literatüre yeni bir mutasyon olarak katkı sağlayacaktır.

Diğer domainlerden farklı olarak çalışmamızda CSRD domain yerleşimli 3 adet farklı çerçeve kayması varyantı saptadık. Çalışmamızda olgu A14-II-3'te saptanan c.564delA (p.Lys189Asnfs*2) varyantı daha önce literatürde bildirilmemiş ve ilk kez bu çalışmada saptanmıştır. c.564delA (p.Lys189Asnfs*2) değişimi, protein düzeyinde 189. kodonda Lysine yerine Asparagine gelmesine, çerçeve kaymasına ve 2. kodonun dur şifresi olarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden p.Lys189Asnfs*2 patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. Aynı şekilde ilk kez çalışmamızda saptanan bir diğer variant NF1 geninin 4'üncü eksonda çerçeve kaymasına sebep olan (c.407delA) (p.N136Ffs*19) varyantı olmaktadır. Olgu A27-III-3'te saptanan bu değişimin, protein düzeyinde 136.kodonda Asparagine yerine Phenylalanine gelmesine, çerçeve kaymasına ve 19. kodonun dur şifresi olarak aynı şekilde protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.N136Ffs*19) patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. Daha önce literatürde bildirmiş olan çerçeve kayması varyantı ise Nörofibromlar ve pleksiform nörofibromlar ile NF1 kesin tanı 48 yaşındaki kadın olguda (A17-III-5) heterozigot c.1756_1759 delACTA (p.Thr586valfs*18) varyantı olmaktadır. Sistein/serin bakımından zengin olan CSRD domaininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte farklı çalışmalar bu bölgenin GRD'nin üzerindeki allosterik etkisini ve Ras yolağının düzenlenmesinde indirekt etkili olduğunu ayrıca cAMP'ye bağımlı protein kinaz (PKA) ların aktivitesinde rol aldığını düşünmektedir. Yapılan farklı çalışmalar proteinin CSRD domainini etkileyen mutasyonların direkt hastalıkla ilişki olduğunu bildirmiş olup (Yap ve ark, 2016; Anastasaki ve ark, 2015; Park ve ark, 1998) ayrıca çalışmamızda CSRD domainini etkileyen çerçeve kayması mutasyonu olan bireylerin ortak klinik bulguları taşıyor olması, örneğin A17-III-5'de; Nörofibromlar, pleksiform nörofibrom, café au lait lekeleri, A14-II-3'te; nörofibromlar café au lait lekeleri aksiller inguinal çillenme, A27-III-3'te; Hipertelorizm, hipertansiyon, nörofibrom, pleksiform nörofibrom, café au lait lekeleri gibi benign neoplazilerin bulunması literatür bilgisi ile uyumlu bulunmuştur. Genel olarak Genotip - fenotip korelasyonu, hastalık seyrinin

öngörülmesi için önemli bir bulgu olmakla birlikte çalışmamız bunun daha iyi anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Araştırmamızda *NF1* mutasyonları çoğunlukla tek bir birey veya aileye özgü olduğundan, korelasyon esas olarak mutasyon tiplerine göre değerlendirildi. *NF1* mutasyonları çocukluktan sonra neredeyse tamamen penetrasyon gösterir, ancak çeşitli klinik bulguları hafif CALM'lerden genç yaşta hayatı tehdit eden komplikasyonlara kadar değişir. Çalışmamızın bazı ailelerinde *NF1* hastalarda daha şiddetli bulguların sadece indeks olguda saptanmış olması ancak ebeveynlerinde veya diğer kardeşlerde saptanmadığı *NF1* ekspresyonunun değişkenliğini: modifiye edici genler, epigenetik modifikasyon, postzigotik mutasyonlar, ikinci vuruş somatik mutasyon ve çevresel ajanlar ile açıklanmaktadır (Yap ve ark, 2016; Anastasaki ve ark, 2015; Park ve ark, 1998).

Çalışmamızda Nörofibromin'in ana fonksiyonel rolünü içeren ve yüksek oranda korunmuş olan, GRD domainini etkileyen 2 farklı çerçeve kayması mutasyonu tesbit ettik. Bu mutasyonlar ilk kez bu çalışmada saptanmış olup literatürde bildirilmemiştir.

Çeşitli deri bulgular ile klinik kesin tanı alan A8-III-2 kadın olguda saptanan c.3456_3459 delACTC değişimi ilk kez bu çalışmada saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir. Ancak bu değişimin, protein düzeyinde 1153.kodonda Leucine yerine Methionine gelmesine, çerçeve kaymasına ve 4. kodonun dur şifresi olarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.Leu1153METfs*4) patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. 28'inci eksonda gerçekleşen bu mutasyon proteinin GRD: RAS etkileşiminden ve GTP hidrolizinden sorumlu domainini etkilemektedir. Yapılan farklı çalışmalarda GAP ile ilişkili domaindeki mutasyonlar, RasGAP aktivitesini etkilediğinden direkt hastalıkla ilişkilendirmiş olup nörofibromatozis hastalığındaki mutasyonların bu bölgede kümelenme gösterdiği belirtilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan farklı çalışmalar bu bilgilerden farklı olarak, nörofibrominin GRD dışında başka fonksiyonel domainlerinin de olduğunu ve mutasyonların GDR domaininde değil GSRD bölgesinde daha fazla bulunduğunu göstermiştir (Upadhyaya, 1998). Aynı domainde saptanan bir diğer mutasyon c.4486_4487delAA (p.K1496Nfs*12) 18 yaşındaki (A23-III-1) olguda saptanmış olup daha önce literatürde bildirilmemiştir. Saptanmış olan bu değişimin, protein düzeyinde 1496. kodonda Lysine yerine Asparagine gelmesine, çerçeve kaymasına ve 12. kodonun dur şifresi olarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.K1496Nfs*12)

patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. Çalışmamızda aynı domaini etkileyen mutasyonların bulunması ayrıca olgularda benzer klinik bulguların ortaya çıkması literatür bilgisini desteklemektedir. Ancak bu bilgiyi kanıtlamak için hasta yakınlarından biyolojik örnek temin ederek bu bilgiyi doğrulamak gerekmektedir.

NF1 Mikrodelesyon Sendromu

Çalışmamızda yeni nesil dizileme yöntemi ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1), (A3-III-2) ve (A11-III-4) ve (A19-III-5) etkilenmiş olgularda herhangi bir patojenik variant saptanmadı. Yapılan araştırmalar, nörofibromatozis tip1 olgularının %95'inde patojenik varyantların, %5'inin ise *NF1* geninde oluşan büyük delesyon/duplikasyonlardan kaynaklandığını göstermiştir. Bu nedenle etkilenmiş indeks olgulara yapılan MLPA analizinde *NF1* geninde saptanan heterozigot tüm gen delesyonu literatürde bildirilmiş olup üç olguda da saptanan değişim, klinik ile uyumlu olarak değerlendirildi. Genel olarak *NF1* mutasyonlarının çoğu, tek baz değişimleri, insersiyonları veya delesyonları şeklindedir. Diğer mutasyonlar, NF1'de çoklu ekzon delesyonları veya amplifikasyonlar ve komşu genleri de içeren mikrodelesyonlardan kaynaklanmaktadır (Wu-Chou ve ark, 2018; Bianchessi ve ark, 2015; Cawthon ve ark, 1990). Mautner ve ark. (2010), NF1 delesyonları ile ilişkili fenotipin, tipik nörofibromatoz tip1 hastalarında gözlenenenden daha ciddi olduğu sonucuna varmışlardır. Nörofibromatoz tip I (NF1) olan tüm hastaların yaklaşık % 5'inde, 17q11.2'de hem NF1 geni hem de komşu bölgelerini içeren 1.4MB'lık büyük delesyonların olduğu bildirilmiştir. 14 fonksiyonel genin kaybına yol açan bu delesyon tipi, *NF1* tekrar bölgeleri arasında (NF1-REP A ve NF1-REP C) meydana gelen allelik olmayan homolog rekombinasyon (NAHR) mekanizması sonucunda oluşmaktadır. 1.4MB'lık bölge kaybı en yaygın delesyon tipi olup NF1 delesyonların % 60-70'ini oluşturmaktadır. Mautner ve ark. (2010) Nörofibromatoz tip1 mikrodelesyon sendromlu hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, NF1 klinik özelliklerine eşlik eden yüz dismorfizmi (% 90), uzun boy (% 46), büyük eller ve ayaklar (% 46), skolyoz (% 43), eklem hiperfleksibilitesi (% 72), gecikmiş bilişsel gelişim ve / veya öğrenme güçlüğü (% 93), zeka geriliği (% 38) gibi bulgular tesbit etmiştir. NF1 popülasyonuna kıyasla, delesyon hastalarında pleksiform nörofibromlar (% 76), subkutan nörofibromlar (% 76), spinal nörofibromlar (% 64) ve malign periferik sinir kılıfı tümörleri (% 21) önemli ölçüde artmıştır ve yetişkinlerin% 50'sinde çok yüksek bir kutanöz nörofibrom yükü

olduğu bildirilmiştir (1000'den fazla). Venturin ve ark. (2004) yılında 92 hastanın üzerinde yaptıkları çalışmada NF1 mikrolelesyon sendromunun spesifik klinik bulgularını en sık görülen öğrenme güçlüğü, kardiyovasküler malformasyonlar ve dismorfizm olduğunu tesbit etmişlerdir (Frayling ve ark, 2018; De raedt ve ark, 2003; Pinna ve ark, 2015; Rojnueangnit ve ark, 2015; Pasmant ve ark, 2010; Upadhyaya ve ark, 2007).

Yapılan diğer benzer çalışmalarda da NF1 mikrolelesyonu saptanan hastalarda, dismorfik yüz bulguları, öğrenme güçlüğü, erken yaşta yüksek pleksiform nörofibrom prevalansının arttığı, ayrıca yaşam boyu artmış malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST'ler) riski dahil olmak üzere şiddetli bulgulara daha yatkın oldukları saptanmıştır (Koczkowska ve ark, 2019; Kehrer-Sawatzki, 2017).

Barrea ve ark. (2017) ve *Pasmant* ve ark. (2010) tarafından yapılan başka çalışmalarda NF1 geninin tamamını etkileyen genomik mikrolelesyonları olan hastaların daha şiddetli bir fenotip geliştirdikleri görülmüştür. Bu hastalar dismorfik özellikler, öğrenme güçlüğü, kardiyovasküler malformasyonlar, çocuklukta aşırı büyüme, daha yüksek tümör yükü ve iyi huylu nörofibromların erken başlangıcı gibi klinik özellikler sergilemektedirler ve muhtemelen daha yüksek malignite insidansına sahiptirler (Barrea ve ark, 2017; Pasmant ve ark, 2010).

Çalışmamızda indeks olgularada erken yaşta şiddetli ve çeşitli fenotipik bulguların ortaya çıkması, ayrıca literatür ile uyumlu olarak benzer klinik bulguların saptanması sebebi ile yapılan array-CGH analiz sonucunda, (A3-III-2) ve (A11-III-4) ve (A19-III-5) olgularda 1.4MB'lık bir bölge delesyonu saptandı. A3-III-2'de makrosefali, hipertelorizm, Lisch nodülleri, nörofibrom, pleksiform nörofibrom ve diğer deri bulguları ile eşlik eden hafif mikrognați, bilateral kubitüs valgus, dirsekte ve metakarpofalangeal (MKF) ve dizlerde hiper ekstansibilite ve genu recurvatum ve diğer anomalilerin (bölüm.4) tesbit edilmesi, saptanan 1.4 MB'lık bölge delesyonu ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Benzer şekilde A11-III-4'te 1000'den fazla nörofibromların yanı sıra lisch nodülleri ve makrosefali, kalp hastalığı ve hipertansiyon gibi diğer bulguların saptanması ayrıca (A19-III-5)'de diğer klinik bulguların yanı sıra malign mezenkimal tümör öyküsünün olduğu literatür ile uyumlu olarak değerlendirildi. Her üç ailede de etkilenmiş olgularda

aynı bölge delesyonun saptanması mutasyonun hastalıkla işşkili olduğu bilgisini desteklemektedir.

Kayes ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmada bu hastalıkta meydana gelen bazı bulguların, *NF1* geninin intronunda bulunan *EVI2A*, *EVI2B*, ve *OMG* genlerinde meydana gelen haployetersizlikten kaynaklandığını düşündürmektedir. *OMG* ve / veya *CDK5R1* genleri'nin haployetersizliğinin, öğrenme güçlüğünde rol oynadığı tesbit edilmiştir, ayrıca kardiyovasküler malformasyonlar ile ilgili olarak, sadece *JJAZ1* (*SUZ12*) ve *CENTA2* (*ADAP2*) genleri, kalpte anlamlı bir şekilde ifade edilmeleri nedeniyle aday genler olarak kabul edilmiştir. Kehrer-Sawatzki ve ark. (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *NF1* mikrolelesyonları olan hastalarda beyin yapılarında yüksek oranda ifade edilen *JJAZ1* geninin tümüyle fonksiyon kaybına uğramasının, zihinsel bozulmaya neden olabileceği ifade edilmiştir. Venturin ve ark. (2014), zebra balığı embriyolarında yaptıkları çalışmada, *NF1* mikrolelesyon hastalarında kardiyovasküler malformasyonların ortaya çıkmasının *ADAP2* geninde meydana gelen haployetersizlikten kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda 1.4MB'lık bölgenin içinde bulunan benzer genlerde meydana gelen fonksiyon kaybının mutasyondan kaynaklanan öğrenme güçlüğü ve kardiyovasküler malformasyonları ile ilişkili olduğu düşünöldü ve literatür ile uyumlu bulundu (Venturin ve ark, 2014).

Çalışmamızda (A12-III-1) ve (A26-III-1)'te yeni nesil dizileme yöntemi ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) [hg19] herhangi bir değışim saptanmadı. Yapılan araştırmalara dayanarak *NF1* kliniğı yansıtan ancak herhangi bir mutasyon saptanmayan olguların %0.5'inin büyük Del/Dup'lardan kaynaklandığı bildirilmiş olduğundan çalışmamızda *NF1* tanı kriterleri olarak yalnızca deri bulguları ile seyreden bu iki olguda yapılan MLPA analiz sonucunda normal olarak değeriendirildi. Çalışmamızda nörofibromatosiz tip1 kliniğini yansıtan ancak herhangi bir patojenik değışim saptanmayan bu olgularda mozaizizm olabileceğı düşünöldü. Bu amaçla yapılacak olan daha geniş kapsam ve derinlikte dizileme ile, fenotipi etkileyen birçok gen/genlerin ve derin intronik bölgelerin taranabileceğı ve olası bir mozaizizmin saptanabileceğini düşünöyoruz.

NF1 klinik tanılı (A10-II-3) olguda yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_001042492.2; NP_001035957.1) herhangi bir patojenik varyant saptanmadı. İndeks olguda nörofibrom ve aksiller çillenme bulguları ile eşlik eden ksantelezm,

yüksek damak, hafif belirgin/öne dönük ve up-lifted kulaklar ve düz heliksler gibi dismorfik özellikler nedeni ile hastada *NF1* gen delesyon/duplikasyon analizi yapıldı, ancak indekse ait MLPA analiz sonucu normal olarak değerlendirildi. Ancak indeks olgunun kızı, (A10-III-2)'de dış merkezde yapılan yeni nesil dizileme ile *NF1* geninde (NM_000267; NP_000258) c.2033dupC (p.ile679aspfs*21)[hg19] heterozigot değişimi saptandı. Saptanan bu değişim daha önce nörofibromatozis'de çerçeve kaymasına yol açan bir mutasyon olarak bildirilmiş olup klinik ile uyumluluk göstermekteydi (Tsipi ve ark, 2018; LaDuca ve ark, 2017; Heim ve ark, 1995). Olgunun kızı, saptanan çerçeve kayması mutasyonunun yanısıra indeks olguda nörofibromatozis'e ilişkin klinik özelliklerden dolayı bu araştırmanın bir diğer aşamasında indeks olguda derin dizileme ve farklı dokulardan örnek alarak mozaizim durumunun değerlendirilmesi planlandı.

Çalışmamızda saptanan varyantların tipi ve oranı göz önüne alındığında, YND, Sanger dizileme, MLPA ve array-CGH yöntemlerinin algoritmik olarak kullanıldığında *NF1* tanısının %94 oranında konabileceği söylenebilir. Mutasyon saptadığımız indeks olgularımızda, saptanan mutasyonun tipine göre Sanger dizileme, MLPA veya array-CGH yöntemi ileride, indeksin ailesinde tarama yapılabilecek veya prenatal /preimplantasyon genetik tanı amacıyla mümkün olabilecektir.

Nörofibromatozis sendromu tanı kriterlerini karşılayan olgularda *NF1* geninde mutasyon saptama oranının literatürde kullanılan tekniklere ve doku kaynağına bağlı olarak % 60 ila % 95 arasında geniş bir aralığa yayılması, sendromun genetik heterojenitesini, sendrom ile ilişkili henüz olası tanımlanmamış yeni gen/genlerin, derin intronik bölgelerdeki varyantların varlığını ya da mozaizmi düşündürmektedir (Frayling ve ark, 2018; Upadhyaya ve ark, 2010; Messiaen ve ark, 2000) . Gelecekte, tanı kriterleri pozitif olan ancak *NF1* geni mutasyonu negatif olgularda, kırılma hatasına yol açan derin intronik mutasyonların ve regülatör bölge mutasyonlarının araştırılması, tüm ekzom dizileme, tüm genom dizileme gibi daha ileri moleküler çalışmalarla yeni mutasyonların ve yeni genlerin belirlenmesinde önemli bir kaynak oluşturacaktır. Nörofibromatozis tipl klinik tanısı ile ilişkili *NF1* geninin yeni nesil dizileme, Sanger dizileme, MLPA ve array-CGH yöntemi ile analiz edildiği çalışmamızda, kullanılan tekniklerde 3 olguda mutasyon saptanmadı (Tablo 4.2). Mutasyon saptanmayan olgular, klinik bulgular açısından değerlendirildiğinde; 3 olgu (NF1-10, NF1-12, NF1-26) *NF1* tanı kriterleri ile uyumlu idi. Yeni nesil dizileme ile

tasarladığımız çalışmamızda doku biopsisi yer almadığından bu hastalarda mozaiklik durumu araştırılmadı. Ancak, bir sonraki aşamada, olgu serimizde yer alan Nörofibromatozis ile uyumlu 3 olguda mozaiklik durumu araştırılacaktır. *NF1* genindeki mutasyonların mozaik durumunu yapılacak çalışmalarla kesinlik kazandığında, bu gruptaki olguların moleküler tanısına katkı sağlanacaktır. Olgu NF1-16; Nörofibromatozis sendromuna eşlik eden konjenital kalp anomalileri, vertebral anomaliler, fasiyal asimetri bulguları ile klinik olarak Watson sendromu fenotipi ile uyumlu bulundu. Nörofibromatozis ile eşlik eden ek malformasyonların gözleendiği 3 olgumuzda (NF1-3, NF1-11, NF1-19) *NF1* geni ile birlikte 23 geni içeren 1.4 MB'lık delesyon tipinde mutasyon saptandı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, olguların tanısına katkı sağlamıştır ve aynı zamanda genotip-fenotip korelasyonunun açıklanmasında önemli bilgiler vermiştir.

Özetle, çalışmamızda yer alan 27 aileden etkilenmiş 39 olgu klinik eşliğinde değerlendirildiğinde; 27 ailenin 24'ünde Tip 1 Nörofibromatozis klinik tanısı, yeni nesil dizileme, MLPA ve array-CGH yöntemi ile moleküler olarak doğrulandı. Mutasyon saptanmayan 3 olgu ileri moleküler projeler için değerli bir kohort oluşturdu. Çalışmamızda çoğunlukla inaktive edici veya güdük protein üretimine sebep olan mutasyonlar gözlenirken, daha az sıklıkta missens mutasyonların görülmesi literatür ile uyumlu bulundu (Frayling ve ark, 2018; Griffiths ve ark, 2007; Messiaen ve ark, 2000). Çalışmamızda *NF1* geninin tamamını etkileyen genomik mikrolelesyonları olan hastaların daha şiddetli bir fenotip gösterdikleri literatür ile uyumlu bulundu (Barrea ve ark, 2017; Pasmant ve ark, 2010). Bu çalışmanın zayıf yönleri, kısıtlı hasta sayısı, aynı mutasyonu paylaşan hasta sayısının azlığı, az sayıda patojenik varyasyonlarının olması ve ortak klinik bulguları paylaşan bireylerin düşük sayıda olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer birçok çalışmanın bulgularına benzer şekilde NF1'in ortak klinik özellikleri için genotip-fenotip korelasyonu net olarak bilinmesede, elde ettiğimiz bulguların Türk toplumunda Tip 1 Nörofibromatozis genetiğine ilişkin halen sınırlı olan bilgilere katkı sağladığını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Abaloun Y, Ajhoun Y. Nodules de lisch dans la neurofibromatose type 1. Pan African Medical Journal, 27 2017; doi:10.11604/pamj.2017.27.218.11517.
- Abramowicz A, Gos M. Neurofibromin in neurofibromatosis type 1 - mutations in NF1 gene as a cause of disease. Dev Period Med 2014;18(03):297–306.
- Agaimy A, Vassos N, Croner RS. Gastrointestinal manifestations of neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease): clinicopathological spectrum with pathogenetic considerations. Int J Clin Exp Pathol 2012; 5(9):852–62.
- Al-Rahawan MM, Chute DJ, Sol-Church K, Gripp KW, Stabley DL, McDaniel NL, Wilson WG, Waldron PE. Hepatoblastoma and heart transplantation in a patient with cardiofacio- cutaneous syndrome. AmJ MedGenet 2007; 143:1481-1488.
- Alkindy A, Chuzhanova N, Kini U, Cooper DN, Upadhyaya M. Genotype- phenotype associations in neurofibromatosis type 1 (NF1): an increased risk of tumor complications in patients with NF1 splice-site mutations? Hum Genomics. 2012;6:12.
- Alkindy A, Chuzhanova N, Kini U, Cooper DN, Upadhyaya M. Genotype-phenotype associations in neurofibromatosis type 1 (NF1): an increased risk of tumor complications in patients with NF1 splice-site mutations? Hum Genomics 2012;6:12.
- Anastasaki C, Woo A, Messiaen L and Gutmann D. Elucidating the impact of neurofibromatosis-1 germline mutations on neurofibromin function and dopamine-based learning. Human Molecular Genetics 2015; doi: 10.1093/hmg/ddv103.
- Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase activating protein activity. Mol. Cell. Biol. 1993; 13:487-495.
- Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase activating protein activity. Mol. Cell. Biol. 1993; 13:487-495.

- Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase activating protein activity. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13:487-495.
- Anderson JL, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1. *Handb Clin Neurol* 2015;132:75–86.
- Bainbridge MN, Wiszniewski W, Murdock DR, Friedman J, Gonzaga-Jauregui C, Newsham I, et al. Whole-genome sequencing for optimized patient management. *Science translational medicine* 2011; 3(87): 87re83-87re83.
- Balakirev ES, Ayala FJ. Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu Rev Genet.* 2003; 37:123-51.
- Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell.* 1990; 16;63(4):851-9.
- Banerjee S, Lei D, Liang S, Yang L, Liu S, Wei Z, Tang JP. Novel phenotypes of NF1 patients from unrelated Chinese families with tibial pseudoarthrosis and anemia. *Oncotarget.* 2017;8(24):39695–702.
- Banerjee S, Lei D, Liang S, Yang L, Liu S, Wei Z, Tang JP. Novel phenotypes of NF1 patients from unrelated Chinese families with tibial pseudoarthrosis and anemia. *Oncotarget.* 2017;8(24):39695–702.
- Barrea Ch, Vaessen S, Bulk S, Harvengt J, Misson J. Phenotype–Genotype Correlation in Children with Neurofibromatosis Type 1 . *Neuropediatrics* 2017; 10.1055/s-0037-1620239.
- Barrea CH, Vaessen S, Bulk S, Harvengt J, Misson J. Phenotype–Genotype Correlation in Children with Neurofibromatosis Type 1. *Neuropediatrics* 2017; DOI <https://doi.org/10.1055/s-0037-1620239>. ISSN 0174-304X.
- Ben-Salem S, Al-Shamsi AM, Ali BR, Al-Gazali L. The mutational spectrum of the NF1 gene in neurofibromatosis type I patients from UAE. *Childs Nerv Syst* 2014;30(07):1183–1189.
- Ben-Shachar S, Constantini S, Hallevi H, Sach eK, Upadhyaya M, Evans gD, Huson SM. Increased rate of missense/in-frame mutations in individuals with NF1-related

- pulmonary stenosis: a novel genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet* 2013;21:535–9.
- Ben-Shachar SH, Constantini SH, Hallevi H, Sach E, Upadhyaya M, Evans G and Huson S. Increased rate of missense/in-frame mutations in individuals with NF1-related pulmonary stenosis: a novel genotype–phenotype correlation. *European Journal of Human Genetics* (2013) 21, 535–539.
- Bernards A, Snijders AJ, Hannigan GE, Murthy AE, Gusella JF. Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservation of both coding and non-coding mRNA segments. *Human Molecular Genetics* 1993; 2(6):645–650.
- Bianchessi D, Morosini S, Saletti V, Ibba MC, Natacci F, Esposito S, et al. 126 novel mutations in Italian patients with neurofibromatosis type 1. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3:513–25.
- Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet* 2007; 39(9):1120–1126.
- Brems H, Park C, Maertens O, Pemov A, Messiaen L, Messia L, et al. Glomus tumors in neurofibromatosis type 1: genetic, functional, and clinical evidence of a novel association. *Cancer Res* 2009; 69(18):7393–401.
- Cassiman C, Casteels I, Jacob J, Plasschaert E, Brems H, Dubron K, Legius E et al. Choroidal abnormalities in café-au-lait syndromes: a new differential diagnostic tool? *Clinical Genetics* 2017; 91(4), 529–535. doi:10.1111/cge.12873.
- Castle B, Baser ME, Huson SM, Cooper DN, Upadhyaya M. Evaluation of genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* 2003;40(10):e109.
- Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM, Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, et al. cDNA sequence and genomic structure of EV128, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics*. 1991; 9(3):446–60.
- Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R. Identification and characterization of transcripts from the von Recklinghausen neurofibromatosis region: the sequence and genomic structure of EV12 and mapping of other transcripts. *Genomics* 1990b; 7:555–565.

- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Ce* 1990a //; 62:193-201.
- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell*. 1990;62:193–201.
- Chai P, Luo Y, Zhou CH, Wang Y, Fan Y and Jia R. Clinical characteristics and mutation Spectrum of NF1 in 12 Chinese families with orbital/periorbital plexiform Neurofibromatosis type 1 . *BMC Medical Genetics* 2019; 20:158.
- Chu MW, Werner A, Moody-Antonio SA. Juvenile xanthogranuloma of the tympanic membrane: a case report. *Ear Nose Throat J*. 2012;91(9):364, 366, 368.
- Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan- like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 2009; 41:1022- 1026.
- Corsello G, Antona V, Serra G, Zara F, Giambrone C, Lagalla L, Piccione M and Piro E. Clinical and molecular characterization of 112 single-center patients with Neurofibromatosis type 1. *Italian Journal of Pediatrics* 2018; 44:45 <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0483-z>.
- Cunha KS, Oliveira NS, Fausto AK, de Souza CC, Gros A, Bandres T, Idrissi Y, Merlio JP, de Moura Neto RS, Silva R, et al. Hybridization capture-based next-generation sequencing to evaluate coding sequence and deep Intronic mutations in the NF1 gene. *Genes*. 2016;7(12):133.
- Daston MM, Ratner N. Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev Dyn* 1992; 195(3):216-26.
- Daston MM, Ratner N. Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev Dyn* 1992; 195(3):216-26.
- Daston MM, Scrable H, Nordlund M, et al. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells and oligodendrocytes. *Neuron* 1992b; 8:415-428.

- De raedt t, Brems H, Wolkenstein P, Vidaud D, Pilotti S, Perrone F, Mautner V, Frahm S, Sciot r, legius e. elevated risk for MPnSt in NF1 microdeletion patients. *Am J Hum Genet* 2003;72:1288–92.
- DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *J Pediatrics* 2000; 105(3):608–14.
- DeClue JE, Cohen BD, Lowy DR. Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9914-9918.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan- Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564–9.
- Denayer E, de Ravel T, Legius E. Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. *J Med Genet* 2008; 45: 695–703.
- Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(15): 8817-8822.
- Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 2000 Feb;66(2):393-401.
- Eisenbarth I, Hoffmeyer S, Kaufmann D, Assum G, Krone W. Analysis of an alternatively spliced exon of the neurofibromatosis type 1 gene in cultured melanocytes from patients with neurofibromatosis 1. *Arch Dermatol Res* 1995; 287(5):413- 6.
- Ekvall S, Sjörs K, Jonzon A, Vihinen M, Annerén G, Bondeson ML. Novel association of neurofibromatosis type 1-causing mutations in families with neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 2014;164A (3):579-87.
- Emmerich D, Zemojtel T, Hecht J, Krawitz P, Spielmann M, Kuhnisch J, Kobus K, Osswald M, Heinrich V, Berlien P, et al. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation events in cutaneous neurofibromas of a single NF1 patient. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(6):870–3.
- Erickson RP. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat Res* 2010; 705(2):96-106.

- Evans, DG, Howard E, Giblin C et al. Birth incidence and prevalence of tumour prone syndromes: estimates from a UK genetic family register service. *Am J Med Genet A* 2010; 152A:327-32.
- Faden DL, Asthana S, Tihan T, DeRisi J, Klot M. Whole exome sequencing of growing and non-growing cutaneous Neurofibromas from a single patient with Neurofibromatosis type 1. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170348.
- Fan J-B, Chee MS, Gunderson KL. Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews Genetics* 2006; 7(8): 632-644.
- Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research* 2006; 34(3): e22-e22.
- Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res* 2002; 62(5):1573–7.
- Ferner RE, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnosis and management. *Handb Clin Neurol* 2013;115:939–55.
- Ferner RE, Huson SM, Evans DGR. *Neurofibromatoses in Clinical Practice*. London, UK.; 2011.
- Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2007; 44(2):81–8.
- Ferrari F, Masurel A, Olivier-Faivre L, Vabres P. Juvenile xanthogranuloma and nevus anemicus in the diagnosis of neurofibromatosis type 1. *JAMA dermatology* 2014; 150(1):42–6.
- Fleming AJ, Chi SN. Brain tumors in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2012;42:80–103.
- Fleming AJ, Chi SN. Brain tumors in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2012;42:80–103.
- Frayling i, Mautner v, Minkelen r, Kallionpaa r, aktaş S, Diana B, et all. Breast cancer risk in neurofibromatosis type 1 is a function of the type of NF1 gene mutation: a new genotype-phenotype correlation. *Med Genet* 2018; 10.1136.
- Frayling i, Mautner v, Minkelen r, Kallionpaa r, aktaş S, Diana B, et all. Breast cancer risk in neurofibromatosis type 1 is a function of the type of NF1 gene mutation: a new genotype-phenotype correlation. *Med Genet* 2019; 56:209–219.

- Golubic M, Roudebush M, Dobrowski S, Wolfman A, Stacey DW. Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin. *Oncogene* 1992; 7(11):2151-2160.
- Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-Sayers S, Deshpande P, Schatz MC, McCombie WR. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome research* 2015; 25(11): 1750-1756.
- Greaves MW, Birkett D, Johnson C. Nevus anemicus: a unique catecholamine-dependent nevus. *Arch Dermatol* 1970; 102(2):172–6.
- griffiths S, thompson P, Frayling i, Upadhyaya M. Molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: 2 years experience. *Fam Cancer* 2007;6:21–34.
- Griffiths S, Thompson P, Frayling I, Upadhyaya M. Molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: 2 years experience. *Familial Cancer*. 2007; 6(1):21–34.
- Gutmann DH, Geist RT, Rose K, Wright DE. Expression of two new protein isoforms of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, in muscle tissues. *Dev Dyn*. 1995; 202(3):302-11.
- Gutmann DH, Geist RT, Wright DE, Snider WD. Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) isoforms in developing and adult rat tissues. *Ce// Growth Differ* 1995b; 6:315-322.
- Gutmann DH, Loehr A, Zhang Y, Kim J, Henkemeyer M, Cashen A. Haploinsufficiency for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation. *Oncogene* 1999; 18:4450-4459.
- Gutmann DH, Loehr A, Zhang Y, Kim J, Henkemeyer M, Cashen A. Haploinsufficiency for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation. *Oncogene* 1999;18:4450-4459.
- Gutmann, D.H., Tennekoon, G.I., Cole, J.L., Collins, F.S., and Rutkowski, J.L. Modulation of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, during Schwann cell differentiation. *J . Neurosci. Res* 1993c; 36:216-223.
- Habib AA, Gulcher JR, Hognason T, Zheng L, Stefansson K. The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene* 1998; 16:1525 ± 1531.
- Heim RA, Kam-Morgan LN, Binnie CG, Corns DD, Cayouette MC, Farber RA, Aylsworth AS, Silverman LM, Luce MC. Distribution of 13 truncating mutations in the neurofibromatosis 1 gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4(6):975-81.

- Hinman MN, Sharma A, Luo G, Lou H. Neurofibromatosis type 1 alternative splicing is a key regulator of Ras signaling in neurons. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(12):2188–97.
- Hirata Y, Brems H, Suzuki M, et al. Interaction between a domain of the negative regulator of the Ras-ERK pathway, SPRED1 protein, and the GTPase-activating protein-related domain of neurofibromin is implicated in Legius syndrome and neurofibromatosis type 1. *J Biol Chem*. 2016; 291:3124–3134.
- <http://www.agilent.com/genomics/protocolvideos>. Erişim Tarihi: 05.02.2020
- <https://dermnetnz.org/topics/glomus-tumour>. Erişim Tarihi: 02.01.2020
- <https://www.aad.org/dw/dw-insights-and-inquiries/dermatopathology/neurofibromatosis-type-1-juvenile-xanthogranuloma-and-leukemia-wasting-a-good-worry>. Erişim Tarihi: 02.01.2020
- <https://www.dermatologyadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/> Erişim Tarihi: 02.01.2020.
- Hudson J, Wu CL, Tassabehji M, Summers EM, Simon S, Super M, Donnai D, Thakker N. Novel and recurrent mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Mutat*. 1997;9(4):366–7.
- Hulsebos TJ, Plomp AS, Wolterman RA, Robanus-Maandag EC, Baas F, Wesseling P. Germline mutation of IN11/SMARCB1 in familial schwannomatosis. *Am J Hum Genet* 2007; 80(4):805-10.
- Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 1989 ; 26:704- 11.
- Hutter S, Piro RM, Waszak SM, Kehrer-Sawatzki H, Friedrich RE, Lassaletta A, Witt O, Korbel JO, Lichter P, Schuhmann MU, et al. No correlation between NF1 mutation position and risk of optic pathway glioma in 77 unrelated NF1 patients. *Hum Genet*. 2016;135(5):469–75.
- Kaufmann D, MOiier R, Kenner O, Leistner W, Hein C, Vogel W, Bartelt B. The N-terminal splice product NF1-10a-2 of the NF1 gene codes for a transmembrane segment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 294(2):496-503.
- Kayes M, Burke W, Riccardi V. M, Bennett R, Ehrlich P, Rubenstein A, Stephens, K. Deletions spanning the neurofibromatosis I gene: identification and phenotype of five patients. *Am. J. Hum. Genet* 1994; 54: 424-436.

- Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Sandig C, Kohn M, Wimmer K, Krammer U, Peyrl A, Jenne D. E, Hansmann I, Mautner V.-F. High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JAZ1 gene. *Am. J. Hum. Genet* 2004; 75: 410-423.
- Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF, Cooper DN. Emerging genotype- phenotype relationships in patients with large NF1 deletions. *Hum Genet.* 2017;136:349–376.
- Kim MJ, Cheon CK. Neurofibromatosis type 1: a single center's experience in Korea. *Korean J Pediatr.* 2014;57(9):410–5.
- Kluwe I, tatagiba M, Fünsterer c, Mautner VF. NF1 mutations and clinical spectrum in patients with spinal neurofibromas. *J Med Genet* 2003;40:368–71.
- Ko JM1, Sohn YB, Jeong SY, Kim HJ, Messiaen LM. Mutation spectrum of NF1 and clinical characteristics in 78 Korean patients with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Neurol* 2013; 48(6):447-53.
- Koczkowska M, Chen Y, Callens T, et al. Genotype-phenotype correlation in NF1: evidence for a more severe phenotype associated with missense mutations affecting NF1 codons 844-848. *Am J Hum Genet.* 2018;102:69–87.
- Koczkowska M, chen Y, callens t, gomes a, Sharp a, Johnson S, Hsiao Mc, chen Z, Balasubramanian M, Barnett cP, Becker ta, Ben-Shachar S, Bertola Dr, et all. genotype-phenotype correlation in nF1: evidence for a more severe phenotype associated with missense mutations affecting NF1 codons 844-848. *Am J Hum Genet* 2018;102:69–87.
- Koczkowska M, Ludwine M. A full list of authors and affiliations appears at the end of the paper. Expanding the clinical phenotype of individuals with a 3-bp in-frame deletion of the NF1 gene (c.2970_2972del): an update of genotype–phenotype correlation. *Genetics in Medicine* 2019; 21:867–876; <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0269-0>.
- Kontaridis ML, Swanson KO, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J. Biol. Chem* 2006; 281:6785--6792.
- Korf BR, Rubenstein AE. Neurofibromatosis: A Handbook for Patients, Families, and Health Care Professionals. New York: Thieme Med 2005; Publ. 253 pp.
- Korf BR. Clinical features and pathobiology of neurofibromatosis 1. *J Child Neurol* 2002;2:1076.

- LaDuca H, Farwell K, Vuong H, Lu H, Mu W, Shahmirzadi L, Tang SH, Chen J, Bhide SH, Elizabeth C et al. Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels. *PLOS ONE* 2017; 12(2), e0170843.
- Le LQ, Parada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPS. *Oncogene*. 2007; 26: 4609-4616.
- Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns JP. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J. Med. Genet* 2002; 39:571- 574.
- Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 2009a; 25:2744-2750.
- Li C, Cheng Y, Gutmann DA, Mangoura D. Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 2001; 130:231-248.
- Li Y, O'connell P, Breidenbach H. H, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil SH et al. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics* 1995; 25(1), 9–18. doi:10.1016/0888-7543(95)80104-t.
- Luijten M, Redeker S, Minoshima S, Shimizu N, Westerveld A, Hulsebos TJ. Duplication and transposition of the NF1 pseudogene regions on chromosomes 2, 14, and 22. *Hum Genet*. 2001;109(1):109–16.
- Luijten Mirjam, Redeker Sandra, Minoshima Shinsei, Shimizu Nobuyoshi, Westerveld Andries, Hulsebos Theo J. M Duplication and transposition of the NF1 pseudogene regions on chromosomes 2, 14, and 22. *Hum Genet* 2001; 109:109-116.
- Luijten Mirjam, Redeker Sandra, Minoshima Shinsei, Shimizu Nobuyoshi, Westerveld Andries, Hulsebos Theo J. M Duplication and transposition of the NF1 pseudogene regions on chromosomes 2, 14, and 22. *Hum Genet* 2001; 109:109-116.
- Maertens O, Brems H, Vandesompele J, De Raedt T, Heyns I, Rosenbaum T, De Schepper S, De Paepe A, Mortier G, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat*. 2006; 27(10):1030-40.
- Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *Journal of medical genetics* 2011; 48(9): 580-589.

- Mannelli M, Simi L, Gagliano MS, Opocher G, Ercolino T, Becherini L, Parenti G. Genetics and biology of pheochromocytoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115(3):160-5.
- Mantripragada KK, Thuresson AC, Piotrowski A, Diaz de Stahl T, Menzel U, Grigelionis G, Ferner RE, Griffiths S, et al. Identification of novel deletion breakpoints bordered by segmental duplications in the NF1 locus using high resolution array-CGH. *J Med Genet* 2006; 43:28-38.
- Mao B, Chen S, Chen X, Yu X, Zhai X, Yang T, Li L, Wang ZH, Zhao X and Zhang X. Clinical characteristics and spectrum of NF1 mutations in 12 unrelated Chinese families with neurofibromatosis type 1 . *BMC Medical Genetics* 2018; 19:101.
- Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004; 5(2): 89-99.
- Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R, et al. cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics* 1991;11(04):931–940 5.
- Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, et al. The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18(11):722–35.
- Mautner V-F, Asuagbor FA, Dombi E, Fünsterer C, Kluwe L, Wenzel R, et al. Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol* 2008;10(4):593–8.
- Mautner VF, Hartmann M, Kluwe L, Friedrich RE, Fünsterer C. MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 2006; 48(3):160–5.
- Mautner, V.-F., Kluwe, L., Friedrich, R. E., Roehl, A. C., Bammert, S., Hogel, J., Spori, H., Cooper, D. N., Kehrer-Sawatzki, H. Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *J. Med. Genet* 2010; 47: 623-630.
- Mazzanti L, Cacciari E, Cicognani A, Bergamaschi R, Scarano E, Forabosco A. Noonan-like syndrome with loose anagen hair: a new syndrome? *Am J Med Genet A* 2003; 118A:279-286.
- McTaggart SJ. Isoprenylated proteins. *Cell. Mo/. Life Sci* 2006; 83:255-267.

- Merriman B, Torrent I, Rothberg JM, Team D. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 2012; 33(23): 3397-3417.
- Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, Fu C, Mikhail F, Serra E, Garcia-Linares C, Cooper ON, Lazaro C, Kehrer-Sawatzki H. Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum Mutat* 2011; 32(2):213-9.
- Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat* 2000;15:541–55.
- Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics* 2010; 11(1): 31-46.
- Mikol D, Stefansson K. A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J. Cell Biol* 1988; 106:1273- 1279.
- Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons M, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T et al. Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *nature communications* 2018; 9:4083.
- Monroe CL, Dahiya S, Gutmann DH. Dissecting clinical heterogeneity in Neurofibromatosis type 1. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:53–74.
- Mountcastle EA, Diestelmeier MR, Lupton GP. Nevus anemicus. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14(4):628–32.
- Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 2007; 44:763-771.
- Neumann HP, Sullivan M, Winter A, Malinoc A, Hoffmann MM, Boedeker CC, Bertz H, Walz MK, Moeller LC, Schmid KW, Eng C. Germline Mutations of the TMEM127 Gene in Patients with Paraganglioma of Head and Neck and Extraadrenal Abdominal Sites. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(8):E1279 –E1282.
- Nguyen R, Kluwe L, Fuensterer C, Kentsch M, Friedrich RE, Mautner V-F. Plexiform neurofibromas in children with neurofibromatosis type 1: frequency and associated clinical deficits. *J Pediatr* 2011; 159(4):652–5.e2.

- Niemeyer CM and Locatelli F. Chronic myeloproliferative disorders. In: Childhood Leukemia (ed. by C.H. Pui), Cambridge University Press, New York 2006; 571- 598.
- NIH. NIH Consensus development conference statement. Neurofibromatosis. Arch Neurol 1988; 45:575--8.
- Nishi, T., Lee, P.S.Y., Oka, K., Levin, V.A., Tanase, S., Morino, Y., and Saya, H. Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NFI) gene transcripts related to neuronal differentiation. Oncogene 1991; 6:1555-1559.
- North KN. Neurofibromatosis type 1. J Am Acad Dermatol 2009; 61(1):1–16.
- Nunley KS, Gao F, Albers AC, Bayliss SJ, Gutmann DH. Predictive value of café au lait macules at initial consultation in the diagnosis of neurofibromatosis type 1. Arch Dermatol. 2009;145:883–7.
- Nyström AM, Ekvall S, Allanson J, Edeby C, Elinder M, Holmström G, Bondeson ML, Annerén G. Noonan syndrome and neurofibromatosis type I in a family with a novel mutation in NF1. Clin Genet 2009; 76: 524–534.
- Nyströma AM, Ekvalla S, Allansonb J, Edebya C, Elindera M, Holmströmc G, Bondesona ML and Anner'ena G. Noonan syndrome and neurofibromatosis type I in a family with a novel mutation in NF1. Clin Genet 2009; 76: 524 – 534.
- O'Connell P, Viskochil D, Buchberg AM, Fountain J, Cawthon RM, Culver M, Stevens J, Rich DC, Ledbetter DH, Wallace M, Carey JC, Jenkins NA, Copeland NG, Collins FS, White R: The human homolog of murine Evi-2 lies between two von Recklinghausen neurofibromatosis translocations Genomics 1990; 7(4):547-554.
- Oderich GS, Sullivan TM, Bower TC, Gloviczki P, Miller D V, Babovic- Vuksanovic D, et al. Vascular abnormalities in patients with neurofibromatosis syndrome type I: clinical spectrum, management, and results. J Vasc Surg 2007; 46(3):475–84.
- Online Mendelian Inheritance in Man Database - Entry #162200. <http://www.omim.org/entry/162200>. Accessed January 1, 2017.
- Otsuka F, Kawashima T, Imakado S, Usuki Y, Hon-Mura S. Lisch nodules and skin manifestation in neurofibromatosis type 1. Arch Dermatol 2001; 137(2):232–3.
- Page PZ, Page GP, Ecosse E, Korf BR, Leplege A, Wolkenstein P. Impact of neurofibromatosis 1 on Quality of Life: A cross-sectional study of 176 American cases. Am J Med Genet Part A 2006; 140A(18):1893–8.
- Park V, Pivnick E. Neurofibromatosis type 1 (NF 1): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients. J Med Genet 1998;35:813-820.

- Park VM, Pivnick EK. Neurofibromatosis type 1 (NF1): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients. *J Med Genet* 1998; 35:813-820.
- Pasmant E, Sabbagh A, Hanna N, et al. SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype. *J Med Genet* 2009; 46(7):425-430.
- Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, et al; members of the NF France Network. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2010;31(06):E1506–E1518.
- Pasmant e, Sabbagh a, Spurlock g, laurendeau i, grillo e, Hamel MJ, Martin l, Barbarot S, leheup B, rodriguez D, et all. members of the, NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2010;31:e1506–18.
- Patil S, Chamberlain RS. Neoplasms associated with germline and somatic NF1 gene mutations. *Oncologist*. 2012;17:101–116.
- Paulus S, et al. Association between juvenile myelomonocytic leukemia, juvenile xanthogranulomas and neurofibromatosis type 1: Case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol* 2017; 34: 114-8.
- Perrin G, Morris M.A, Antonarakis S.E, Boltshauser E, and Hutter P. TWo Novel Mutations Affecting mRNA Splicing of the Neurofibromatosis Type 1. *Hum Mutat*. 1996;7(2):172-5.
- Philpott c, tovell H, Frayling iM, cooper Dn, Upadhyaya M. the NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Hum Genomics* 2017;11:13.
- Pinna V, lanari V, Daniele P, consoli F, agolini e, Margiotti K, Bottillo i, torrente i, Bruselles a, Fusilli c, Ficcadenti a, Bargiacchi S, trevisson e, Forzan M, giustini S, leoni c, Zampino g, Digilio Mc, Dallapiccola B, clementi M, tartaglia M, De luca a. p.arg1809cys substitution in neurofibromin is associated with a distinctive nF1 phenotype without neurofibromas. *Eur J Hum Genet* 2015;23:1068–71.
- Pinna V, Lanari V, Daniele P, et al. p.Arg1809Cys substitution in neurofibromin is associated with a distinctive NF1 phenotype without neurofibromas. *Eur J Hum Genet*. 2015;23:1068–1071.
- Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, Kamisago M, Momma K, Katayama H, Nakagawa M et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007 39:1013-1017.

- Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, Li L, Yassin Y, Tamburino AM, Neel BG et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39:70-74.
- Rojnueangnit K, Xie J, Gomes A, et al. High incidence of Noonan syndrome features including short stature and pulmonic stenosis in patients carrying NF1 missense mutations affecting p.Arg1809: genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*. 2015;36:1052–1063.
- Rojnueangnit K, Xie J, gomes a, Sharp a, callens t, chen Y, liu Y, cochran M, abbott Ma, atkin J, Babovic-Vuksanovic D, Barnett cP, crenshaw M, Bartholomew DW, Basel l, Bellus g, Ben-Shachar S, et all. High incidence of noonan Syndrome Features including Short Stature and Pulmonic Stenosis in Patients carrying NF1 Missense Mutations affecting p.arg1809: genotype- Phenotype correlation. *Hum Mutat* 2015;36:1052–63.
- Rosser T, Packer RJ. Intracranial neoplasms in children with neurofibromatosis 1. *J Child Neurol* 2002; 17(8):630-7-51.
- Rouleau G. A, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman, J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst S. M, Lenoir G, et all. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363: 515-521.
- Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363:515-21.
- Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro- fibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363:515-21.
- Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanché H' et all. NF1 Molecular Characterization and Neurofibromatosis Type I Genotype–Phenotype Correlation: The French Experience. *Hum Mutat* 2013; 34:1510–1518, 2013.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, ve ark. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *nature* 1977; 265(5596): 687-695.
- Scheffzek K, ahmadian Mr, Wiesmüller l, Kabsch W, Stege P, Schmitz F, Wittinghofer a. Structural analysis of the gaP-related domain from neurofibromin and its implications. *Embo J* 1998;17:4313–27.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* 2002; 30(12): e57-e57.
- Schubbert S, Bollag G, Shannon K. Deregulated Ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:15--22.
- Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2006; 38:331-336.
- Sharif S, Upadhyaya M, Ferner r, Majounie e, Shenton a, Baser M, thakker n, evans Dg. a molecular analysis of individuals with neurofibromatosis type 1 (nF1) and optic pathway gliomas (OPGs), and an assessment of genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 2011;48:256–60.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 2008; 26(10): 1135-1145.
- Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, Metheny LJ, Smith HC. The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:478-485.
- Spurlock G, Bennett E, Chuzhanova N, et al. SPRED1 mutations (Legius syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype. *J Med Genet* 2009; 46(7):431-437.
- Stewart DR, Corless CL, Rubin BP, Heinrich MC, Messiaen LM, Kessler LJ, Zhang PJ, Brooks DG. Mitotic recombination as evidence of alternative pathogenesis of gastrointestinal stromal tumours in neurofibromatosis type 1. *J Med Genet*. 2007; 44(1):e61.
- Stewart W, Traynor JP, Cooke A, Griffiths S, Onen NF, Balsitis M, Shah AA, Upadhyaya M, Tobias ES. Gastric carcinoid: germline and somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 gene. *Fam Cancer* 2007; 6(1):147-52.
- Stiller CA, Chessells JM, Fitchett M. Neurofibromatosis and childhood leukemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *British Journal of Cancer* 1994; 70:969-972.

- Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y, et al. Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol* 2005; 29:755- 63.
- Tassabehji M, Strachan T, Sharland M, Colley A, Donnai D, Harris R, Thakker N. Tandem duplication within a neurofibromatosis type 1 (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome. *Am J Hum Genet* 1993; 53(1):90-5.
- The Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.org>. Accessed January 1, 2017.
- The I, Hannigan GE, Cowley GS, Reginald S, Zhong Y, Gusella JF, Hariharan IK, Bernards A. Rescue of a Drosophila NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 1997; 276:791-794.
- Tong HX, Li M, Zhang Y, Zhu J, Lu WQ. A novel NF1 mutation in a Chinese patient with giant café-au-lait macule in neurofibromatosis type 1 associated with a malignant peripheral nerve sheath tumor and bone abnormality. *Genet Mol Res*. 2012;11(3):2972–8.
- Tong HX, Li M, Zhang Y, Zhu J, Lu WQ. A novel NF1 mutation in a Chinese patient with giant café-au-lait macule in neurofibromatosis type 1 associated with a malignant peripheral nerve sheath tumor and bone abnormality. *Genet Mol Res*. 2012;11(3):2972–8.
- Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet* 2006;70(01):1–13.
- Tsipi M, Poulou M, Fylaktou I, Kosma K, Tsoutsou E, Pons MR, Kokkinou E, Kitsiou-Tzeli S, Fryssira H, Tzetis M. Phenotypic expression of a spectrum of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) mutations identified through NGS and MLPA. *J Neurol Sci*. 2018 Dec 15;395:95-105.
- Upadhyaya M, Han S, consoli c, Majounie e, Horan M, thomas nS, Potts c, griffiths S, ruggieri M, von Deimling a, cooper Dn. characterization of the somatic mutational spectrum of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in neurofibromatosis patients with benign and malignant tumors. *Hum Mutat* 2004;23:134–46.
- Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2007;80:140–151.

- Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2007;80(01):140–151.
- Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, thomas n, chuzhanova n, giovannini S, evans Dg, Howard e, Kerr B, griffiths S, et all. an absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delaatt): evidence of a clinically significant nF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2007;80:140–51.
- Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S, Evans DG, Howard E, Kerr B, Griffiths S, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):140–51.
- Upadhyaya M, Kluwe l, Spurlock g, Monem B, Majounie e, Mantripragada K, ruggieri M, chuzhanova n, evans Dg, Ferner r, thomas n, guha a, Mautner V. germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in nF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPnSts). *Hum Mutat* 2008; 29:74–82.
- Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, Penttinen M, Cordeiro I, Ponder M, Ponder BA, Krawczak M, Cooper DN. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet* 1998; 102:591-597.
- Upadhyaya M, Spurlock G, Kluwe L, Chuzhanova N, Bennett E, Thomas N, Guha A, Mautner V. The spectrum of somatic and germline NF1 mutations in NF1 patients with spinal neurofibromas. *Neurogenetics* 2009; 10(3):251-63.
- Upadhyaya M, Spurlock G, Kluwe L, Chuzhanova N, Bennett E, Thomas N, Guha A, Mautner V. The spectrum of somatic and germline NF1 mutations in NF1 patients with spinal neurofibromas. *Neurogenetics* 2009; 10(3):251-63.
- Upadhyaya M, Spurlock G, Majounie E, Griffiths S, Forrester N, Baser M, Huson SM, Gareth Evans D, Ferner R. The heterogeneous nature of germline mutations in NF1 patients with malignant peripheral serve sheath tumours (MPNSTs). *Hum Mutat.*

2006;27(7):716.

- Upadhyaya M, Spurlock G, Monem B, Thomas N, Friedrich RE, Kluwe L, Mautner V. Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas. *Hum Mutat* 2008; 29(8):E103-11.
- Upadhyaya M. neurofibromatosis type 1: diagnosis and recent advances. *Expert Opin Med Diagn* 2010; 4:307–22.
- Upadhyaya M. Neurofibromatosis type 1: diagnosis and recent advances. *Expert Opin Med Diagn* 2010;4(04):307–322.
- Upadhyaya M1, Spurlock G, Monem B, Thomas N, Friedrich RE, Kluwe L, Mautner V. Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas. *Hum Mutat* 2008; 29(8):E103-11.
- Uusitalo E, Leppävirta J, Koffert A, et al. Incidence and mortality of neurofibromatosis: a total population study in Finland. *J Invest Dermatol.* 2015;135:904–906.
- Uusitalo E, Leppävirta J, Koffert A, et al. Incidence and mortality of neurofibromatosis: a total population study in Finland. *J Invest Dermatol.* 2015;135:904–906.
- Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn* 2011;13 (02):113–122 .
- Valero MC, Pascual-Castroviejo I, Velasco E, Moreno F, Hernandez-Chico C. Identification of de novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. *Hum Genet.* 1997;99(6):720–6.
- Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L. Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett* 2004; 560(1-3):98-102.
- Vedrine SM, Vourc'h P, Tabagh R, Mignon L, Hofflin S, Cherpi-Antar C, Mbarek O, Paubel A, Moraine C, Raynaud M, Andres CR. A functional tetranucleotide (AMT) polymorphism in an Alu element in the NF1 gene is associated with mental retardation. *Neurosci Lett.* 2011; 491(2):118-21.
- Venturin M, Moncini S, Villa V, Russo S, Bonati MT, Larizza L, Riva P. Mutations and novel polymorphisms in coding regions and UTRs of CDK5R1 and OMG genes in patients with non-syndromic mental retardation. *Neurogenetics* 2006; 7(1):59-66.
- Venturin, M., Carra, S., Gaudenzi, G., Brunelli, S., Gallo, G. R., Moncini, S., Cotelli, F., Riva, P. ADAP2 in heart development: a candidate gene for the occurrence of

- cardiovascular malformations in NF1 microdeletion syndrome. *J. Med. Genet* 2014; 51: 436-443, 2014.
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 1990 ; 62(1):187-92.
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 1990 ; 62(1):187-92.
- Viskochil DH. The structure and function of the NF1 gene. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM, editors. *Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University 1999 ; Press 119-141.
- Vourc'h P, Andres C. Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45(2):115-24.
- Walker L, Thompson D, Easton D, Ponder B, Ponder M, Frayling I, Baralle D. A prospective study of neurofibromatosis type 1 cancer incidence in the UK. *Br J Cancer* 2006; 95(2):233-8.
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990 ;249:181-186.
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990; 249:181-186.
- Watanabe K, Sugino T, Saito A, Kusakabe T, Suzuki T. Glomangiosarcoma of the hip: report of a highly aggressive tumour with widespread distant metastases. *Br J Dermatol* 1998; 139(6):1097–101.
- Watson GH. Pulmonary stenosis, cafe au lait spots, and dull intelligence. *Arch Dis Child* 1967; 42:303-307.
- White AK, Smith RJ, Bigler CR, Brooke WF, Schauer PR. Head and neck manifestations of neurofibromatosis. *Laryngoscope* 1986; 96(7):732–7.
- Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat*. 2008; 29(1):6–13.

- Williams V. C, Lucas J, Babcock M. A, Gutmann D. H, Korf B, Maria B. L. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* 2009; 123: 124-133.
- Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *J Pediatrics* 2009; 123(1):124–33.
- Williams VC. et al. Neurofibromatosis Type 1, Revisited. *Pediatrics* 2009 ; 123(1):124-33.
- Wu-Chou Y, HunG T, Lin Y , Cheng H , Lin J , Lin CH, Yu CH, et all Genetic diagnosis of neurofibromatosis type 1: targeted next- generation sequencing with Multiple Ligation- Dependent Probe Amplification analysis . *Journal of Biomedical Science* 2018; 25:72 <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0474-9>.
- Xiao H , Yuan L, Xu H, Yang Z, Huang F, Song Z , Yang Y, Zeng CH, Deng H. Novel and Recurring Disease-Causing NF1 Variants in Two Chinese Families with Neurofibromatosis Type 1. *Journal of Molecular Neuroscience* 2018; 65:557–563.
- Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, Hua Y, Gueroussov S, Najafabadi HS et all. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* 2015; 347(6218):1254806.
- Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, Hua Y, Gueroussov S, Najafabadi HS, Hughes TR et all. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* 2015; 9;347(6218):1254806.
- Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 1990; 63(4):835-41.
- Xu W, Yang X, Hu X, Li S. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. *Int J Mol Med* 2014; 34(1):53-60.
- Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et a/: Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mo/ Cell Bio/* 1988; 8:1816-1820.
- Yap P, Super L, Qin J, Burgess T, Prodanovic T, Edwards C, Thomas R et all. Congenital Retroperitoneal Teratoma in Neurofibromatosis Type 1. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63:706–708.

Zvulunov A, Barak Y, Metzker A. Juvenile xanthogranuloma, neurofibromatosis, and juvenile chronic myelogenous leukemia. World statistical analysis. Arch Dermatol 1995; 131(8):904–8.



HAM VERİLER

Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bp)
NF1-F1	Ekzon 1	5'-ACGGTCCAGAGGAGTTAGATGACGT C -3'	26	67.1	700
NF1-R1	Ekzon 1	5'-TCCCTTCCTTTCTCCAGAGCCTGA -3'	25	69.8	700
NF1-F4	Ekzon 4	5'-CAG GGG GAT TGA ACT TTA ATT GTG ATT -3'	27	63	730
NF1-R4	Ekzon 4	5'-CAT TCA TAA CAG TGC TCT TAT TTA ATT GCA -3'	30	62.6	730
NF1-F5	Ekzon 5	5'-CTG TTG AAT TCA GAA TTT AGG GAT ACC CGA -3'	30	65.4	598
NF1-R5	Ekzon 5	5'-ATC CAG TTT GGT GTT CTA GTT CAG CAC A -3'	28	66.9	598
NF1-F11	Ekzon 11	5'-AGA GAT TAA TAG GTT CAC TTT TAT CGG T -3'	28	61.7	885
NF1-R11	Ekzon 11	5'-TCA GAC AGA GTT GAA GGT TTC GCA A -3'	25	65.2	885
NF1-F14	Ekzon 14	5'-CGT CCA GCC TAG TTC TAG AAC ATT GTT -3'	28	64.6	370
NF1-R14	Ekzon 14	5'-ATT TCC AGA AAT GAC ATC TAC CTG TTA CTC A -3'	31	65	370
NF1-F19	Ekzon 19	5'-ATA GTG AAG TTT TAC AAA CAT TGG CGT ATG -3'	30	63.8	396
NF1-R19	Ekzon 19	5'-TAT GTA ACA AGA GGC TTC CAA ATT GAG G -3'	28	63.6	396
NF1-F21	Ekzon 21	5'-GAA ATT TGA CAC TCG GCT GAT TAT ATT AGT -3'	30	63	942
NF1-R21	Ekzon 21	5'-CTA AAC ACA CAG AGT AAG TGC ACC CAC -3'	27	65	942
NF1-F23	Ekzon 23	5'-TGA CAG TAA GGT AGC CAG AAG TTG TGT A -3'	28	65.3	383
NF1-R23	Ekzon 23	5'-CTC CTT TCT ACC AAT AAC CGC ATA TCT ACT C -3'	31	64.8	383
NF1-F26	Ekzon 26	5'-ATA GCA CAC TTC ATA ATA AGC CAC CCT G -3'	28	65.3	523
NF1-R26	Ekzon 26	5'-TCA GAA CTT CCA TAA ATG TAG CTC TTG TCT G -3'	31	65.3	523
NF1-F34	Ekzon 34	5'-TCA GAG CCT ACT TTG AAG CTG AAG CCG -3'	27	67.8	411
NF1-R34	Ekzon 34	5'-TTT AAA CGG AGA GTG TTC ACT ATC CCC ATG -3'	30	66.2	411
NF1-F36	Ekzon 36	5'-TCA TAC CAT TTA TGA TAA ACT TCC ATA A -3'	28	59	582
NF1-R36	Ekzon 36	5'-CTT GCC ATC TCT CTA TAT TTG	29	61	582

		CTA TAA TT -3'			
<i>NF1-F37</i>	Ekzon 37	5'-CCA CTG TTT TCT TCC TTT CTT GAC TCA T -3'	28	64.3	611
<i>NF1-R37</i>	Ekzon 37	5'-AGT TTC TGT TGT TCA TGC TCT ATG TGC T -3'	28	65.6	611
<i>NF1-F38</i>	Ekzon 38	5'-TAA ATG GCA TAG TGT TTT GTT TGG TTG GT -3'	29	65.6	560
<i>NF1-R38</i>	Ekzon 38	5'-CTT CCA ATT TAC AAT ATT AAG GTA GAG GCT GT -3'	32	64.5	560
<i>NF1-F40</i>	Ekzon 40	5'-GAA AGG ACT AAA ATG GAG GAA AAT AAG ACA -3'	30	63	495
<i>NF1-R40</i>	Ekzon 40	5'-ATA TGT GCA CAA AGG AGA TAC TAG ATA AAT A -3'	31	62	495
<i>NF1-F53</i>	Ekzon 53	5'-GTA GCC AAA ACT TTT GTG TAG GCG AAT AG -3'	29	65	419
<i>NF1-R53</i>	Ekzon 53	5'-TAT CTG TTT GGG TGA GAA GTA GAA GAC TGT -3'	30	65.6	410

FORMLAR**Hasta takip formu**

T.C.
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Tıbbi Genetik Bilim Dalı

Olgu No:

Neurofibromatosis Tip 1
Muayene Formu

Tarih:

Ad-Soyad:

Protokol No:

D.T/ yaşı:

DNA No:

Cinsiyet:

Adres bilgileri:

Tel:

Özgeçmiş:

Soygeçmiş:

Öykü:

Aile ağacı

Fizik muayene:

Baş çevresi:

Tartı:

Boy:

BAŞ VE BOYUN

Kafa

- Makroeksefali
- Sfenoid displazi

gözler

- Lisch nodülleri (iris hamartomaları)
- Glokom {ICD10CM:H40.9,H40-H42,H40}

- Hipertelorizm
- Arka kutupta hiperreflektif koroid lekeleri

KALP-DAMAR

damar

- Renal arter stenozu
- Hipertansiyon {ICD9CM:401-405.99,997.91}

İSKELET

Omurga

- Skolyoz
- Spina bifida

Uzuvlar

- psödoartroz
- Uzun kemik korteksinde incelme
- Yerel aşırı kemik büyümesi

CİLT, TIRNILAR & SAÇ

cilt

- Nörofibromlar
- Pleksiform nörofibrom
- Cafe-au-lait lekeleri
- Aksiller çiller
- İnguinal çillenme

NÖROLOJİK

Merkezi sinir sistemi

- Öğrenme güçlükleri (% 30)
- Mental retardasyon, hafif (% 10)
- Akuaduktal darlık
- Hidrosefali

Neoplazi

- Optik glioma
- Meningioma
- Hipotalamik tümör
- Nörofibrosarkom
- Rabdomiyosarkom
- Duodenal karsinoid
- Somatostatinoma
- Paratiroid adenomu
- Feokromasitoma
- Pilositik astrositoma
- Malign periferik sinir kılıfı tümörleri
- MSS de dahil olmak üzere başka lokalizasyonlardaçoğul tümörler

Ek tetkikler:

Pozitif bulgular:

TANI:

Moleküler analizler:

Aydınlatılmış onam formu

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI**

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

GENETİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

**Araştırmanın Adı: NÖROFİBROMATOZİS TIP1 OLGULARINDA NF1 GEN
MUTASYONLARININ YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Genetik Araştırma için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu okuyup anladıktan sonra araştırmaya dahil olma kararı vererseniz formu lütfen imzalayınız.

Araştırmanın konusu:

- Neurofibromatosis Tip 1 (NF1) kalıtsal bir hastalıktır. *NF1* genindeki mutasyon (değişim) sonucu gelişmektedir. Mutasyona uğramış gen kuşaktan kuşağa aktarılabilir veya bazı olgularda gende yeni bir mutasyon gelişmesi sonucu oluşmaktadır. NF1 tanısı konmuş bir kişinin çocuğuna bu hastalığı geçirme olasılığı % 50 dir.
- Bu hastalıkta kemik, yumuşak doku, deri ve sinir sistemi etkilenmektedir. Neurofibromatozis hastalığı yaklaşık üç bin kişiden birinde görülmektedir. (1/3000) . Bu hastalıkta deride 6 oval açık kahve renkli lekeler, çok sayıda deriden kabarık veya derine inen tümörler, kasık gibi kıvrım bölgelerde çiller ve gözün iris tabakasındaki küçük nodüller görülmektedir. Hastalığın yayılımı ve şiddeti kişiden kişiye değişebilirken, aynı ailedeki bireyler arasında da değişebilir. Hastalarda kanser riski taşımayan yüzeysel yumuşak deri tümörleri , derinin dermis denen orta tabakasında lokal ağrıya yol açan tümörler , sırttaki sinir köklerine kadar ilerleyen geniş tümör ağ , derinin tüm tabakalarını , kasları, kemikleri ve kan damarlarını

tutan tümörler görülebilir. NF1'in deri tutulumunun şiddeti, hastalığın sistemik bulgularını ve şiddetini göstermez. Bu bulguların yanı sıra diz ve dirseklerin altındaki uzun kemiklerde şekil bozukluğu ve omurga eğriliği , büyüme hormonu eksikliği ve boy kısalığı , öğrenme güçlüğü , konuşma , işitme ve davranış bozuklukları , göz sinirindeki tümörlerin yol açtığı görme kaybı, yüksek tansiyon ve damar anomalileri , beyin ve omurilikte oluşan tümörler, artmış epilepsi riski , sindirim sisteminde kanama ve tıkanmaya neden olan tümörler gibi vücudun çeşitli bölümlerinde problemler görülebilir.

- NF1'deki tümörlerin çoğu iyi huyludur. Fakat bu iyi huylu tümörlerin aşırı büyümesi yaşamsal fonksiyonları etkileyebilmektedir. NF1 li hastaların % 3-15 inde kanser gelişme riski vardır. Bunlar arasında sinir kılıflarından kötü huylu periferik sinir kılıfı tümörleri, böbrek üstü bezinden gelişen tümörler, çocukluk çağında görülebilen lösemiler sayılabilir. NF1'de tedavinin temel amacı hastalığın gelişimini izlemek ve gerekli olduğunda müdahale ve takip etmektir. Hastalığın tedavisi ve semptomatik sorunların giderilmesi için multi disiplinler yaklaşım gereklidir.
- Neurofibromlar ağrı oluşturdıkları veya çok büyüdükleri zaman kanser riskini ve diğer komplikasyonları engellemek için cerrahi olarak çıkartılırlar.

Araştırmanın Amacı:

Nörofibromatozis Tip 1'den sorumlu NF1 genindeki mutasyonlar, yeni varyasyonların tanımlanması amacıyla yapılacak araştırmalar için sizden kan örneği almamız gerekmektedir. Bu çalışmada Türk toplumundaki mutasyonların özellikleri ve genotip/fenotip ilişkisi araştırılacaktır.

Yapılacak işlemin tanımı ve izlenecek yöntem:

Araştırmanın amacı hastaya yukarıda belirtilen Neurofibromatosis Tip 1 (NF1) hastalığa yol açan genetik faktörleri tanımlamaktır. Bu araştırma Prof. Dr. KIVANÇ ÇEFLE tarafından yürütülecektir. Şu ana kadar yapılan araştırmalar, bu hastalığa genetik faktörlerin yol açtığını düşündürmektedir. Hastalığa neden olan gendeki mutasyonlar, yeni varyasyonların tanımlanması amacıyla yapılacak araştırmalar için sizden kan örneği almamız gerekmektedir. Bu çalışma için sizden alınan kan örnekleri her hangi bir başka çalışmada kullanılmayacaktır.

Bu çalışmada NÖROFIBROMATOZIS TIP1 tanısı konmuş 20 bireyden EDTA'lı tüpde sadece 6 ml periferik kan örneği alınıp DNA izolasyonu yapılacaktır . Alınan kan örneklerinde dizileme yöntemi ile , NF1 geni araştırılacaktır.

Olası riskler ve faydalar :

- **Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:**
- (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması.

- (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişmesi durumu.
- Bu olası risklerin giderilmesi için kan örneğini almadan önce deri dezenfeksiyonu yapan etanol gibi kimyasallar, gazlı pedler, yara bandı ve tek kullanımlık şırıngalar hazır bulundurulacaktır.
- **Olası faydalar :** Bu araştırmanın amacı sizde saptanan her hangi bir anomalinin daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkileri üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlaması, genetik danışmada, hastaların klinik takip ve prognozu konusunda sizin yararınıza verilecek bilgiler edinilmesi beklenmektedir.

• **Diğer seçenekler:**

- Elde edilen örnekler mevcut çalışma dışında başka bir araştırma için kullanılmayacaktır.
- Çalışmamıza katılan gönüllü uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlıkla ve riskle karşılaşmayacaktır.
- Bu araştırmada hastanın hiçbir şekilde hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayacaktır ve tüm sorumluluk araştırmacıya aittir. Araştırmaya katılan gönüllü isteği üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- Araştırmaya katılan gönüllünün kimlik bilgileri gizli tutulacaktır.
- Bu araştırma için gönüllüden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.
- Çalışmaya katılma zorunluluğunuz bulunmamaktadır.
- Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz halinde gelecekteki takip ve tedavinizin olumsuz şekilde etkilenmesi söz konusu değildir.
- Araştırmaya katılım süreci yalnızca kan örneğinin alınması ile sınırlıdır.
- Araştırmanın kabul kriterlerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabilirsiniz.
- Bu şekilde araştırma sonucunda elde edilen önemli bir bilgi olduğunda tarafınıza bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmemek sizin hakkınızdır. Araştırma neticesinde elde edilecek sonuçlarla uluslararası düzeyde yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek veriler elde edilebilir. Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan anomalinin daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı) (bu bölüm hazırlanan gönüllü olur formunun sonuna eklenmelidir)

- İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI TIBBİ GENETİK BİLİM DALI Laboratuvarın'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Verilen bilgilerden sonra bu araştırmaya katılımcı olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya dahil olursam hekim ile aramda kalması gereken bilgilerimin gizliliğine bu araştırma sırasında ve sonrasında saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma verileri bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özen ile korunacağı konusunda bana yeterli güvence sağlandı.

Çalışmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden çalışmadan çıkabilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirilmesi gerektiğinin bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma zarar verilmeme nedeniyle araştırmacı tarafından araştırmadan çıkarılabiliyorum.

Çalışmanın maddi kısmıyla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum .Bu çalışmada herhangi bir ödeme yapılmayacağına biliyorum.

- Araştırma sırasında meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı dair gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi işlemlerle ilgili olarak da herhangi bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, tıbbi Biyolog Shahrashoub SHARİFİ'1, İstanbul üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Yerleşkesi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik B.D, Çapa-Fatih İstanbul adresinden ulaşabileceğimi biliyorum.

- Bu çalışmaya katılmak zorunda olmayıp ve çalışmaya katılmayabilirim. Çalışmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmadım. Çalışmayı kabul etmemem durumunda hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Yapılmış olan açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunup ve kendi başıma düşünme sonucunda adı geçen bu araştırma projesinde katılımcı olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu formun bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda, gönüllüye araştırma öncesinde verilmesi gereken bilgileri okudum. Çalışma hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün;

Adı-soyadı:

İmzası:

Telefon no:

Adresi:

Tarih:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı: Tıbbi Biyolog Shahrashoub SHARİFİ
İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin
Adı-soyadı: Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE
İmzası:

XXXXXX

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 825
Konu: Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE hk.

Tarih : 30.06.2017

Sayın Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

İlgili : İç Hastalıkları Anabilim Dalının 09/06/2017 gün ve 219447 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Shahrashoub SHARIFI' nin yürüteceği 2017/737 dosya numaralı "Nörofibromatozis T1P1 Olgularında NF1 Gen Mutasyonlarının Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Araştırılması" başlıklı çalışma kurumumuzun 23/06/2017 gün ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A. Yagiz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NÖROFİBROMATOZİS TİP1 OLGULARINDA NF1 GEN MUTASYONLARININ YENİNESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI-2

Yazar Shahrashoub Sharifi

Gönderim Tarihi: 11-Mar-2020 01:29PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1273563036
Dosya adı: 2_shahrashoub_sharifi_doktora_tez-intihal_-_ikinci_-_2020.docx (162.83K)
Kelime sayısı: 26378
Karakter sayısı: 177500

NÖROFİBROMATOZİS TİP1 OLGULARINDA NF1 GEN MUTASYONLARININ YENİNESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI-2

ORJİNALLIK RAPORU

% 7	% 2	% 1	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 5
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Mehmet Akif Ersoy Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	www.thieme-connect.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
6	abone.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Shahrashoubsharifi	Soyadı	Sharifi
Doğ.Yeri		Doğ.Tar.	
Email	sh.shery89@yahoo.com	Uyruğu	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Istanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, içHastalıkları ABD Tıbbi GenetikBilim Dalı	
Yük.Lis.		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Patent

Prenatal diagnosis of fetal sex by molecular analysis of maternal plasma after 8 weeks of gestation by Nested PCR (Teslim Ve Hımayet Tarihi 23.04.2007, KODU (30)A(85-1)T)

Kitaplar

Human Cloning, Ayizh Publication (in Persian). 2004

Biotechnology, Ayizh Publication (in Persian). 2013

Molecular Genetics (2018 Volume 1), Novin Publication (in Persian). 2018

Molecular Genetics (2018 Volume 2), Novin Publication (in Persian). 2018

NCBI'ya Submit Olanlar

Gene bank Kayıt Numarası:

Pseudomonas sp. YB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134087.1

Exiguobacterium sp. S90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134079.1

Chryseobacterium sp. FF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134085.1

Exiguobacterium sp. Kasra 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134083.1

Exiguobacterium sp. RN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134081.1

Exiguobacterium sp. S90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134079.1

Bacillus licheniformis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134077.1

Serratia sp. FA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134075.1

Brevundimonas diminuta 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134073.1

Acinetobacter sp. BM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134086.1

Delftia sp. sasani 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134084.1

Comamonas sp. PK 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134082.1

Micrococcus sp. AA79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134080.1

Pseudomonas sp. SF90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134078.1

Serratia sp. SH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134076.1

Planococcus sp. AN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX134074.1

Lysinibacillus fusiformis strain KN-Lip-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN043368.1

Bacillus megaterium strain KN-Lip-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN043369.1

Yayınlar

Hashemi M., Nazemi A., Safavi M., Chaichian SH., Ghane M., Sharifi S. Prenatal Diagnosis of fetal sex by molecular analysis of maternal plasma after 8 weeks of gestation. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University*. Spring, 2008; 18(1) (51):1-6. (In Persian)

Nazemi A., Hashemi M., Sharifi S. Quantitative detection of major BCR-ABL gene Transcript by competitive RT-PCR in chronic myeloid leukemia (CML) patients. *Biological Science*. Summer 2008; 3(2):55-62. (In Persian)

Yazdi M., Nazemi A., Mirnargesi M., Khataminezhad MR., Sharifi S., BabaiKochkaksaei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) beta-lactamas resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Urinary tract infections in Tehran, Iran. *Medical Laboratory Journal*. Spring 2010; 4(1):48-54. (In Persian)

Nazemi A., Mirinargasi M., Merikhi N. and Sharifi S. H. Distribution of Pathogenic Genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and their Linkage with *StbA* Gene. *Indian Journal of Microbiology*, 2011; 51: 355-358.

Ali Nazemi, ElhamSadeghiTazehabadi, MostafaJafarpour, SahrashoobSharifi. A Novel and Simple Method for HCV Genotyping. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology 1 (2011) 40-45.

Merikhi N., Nazemi A., Hashemi M., Sharifi SH., Eskandari M. Identification of *aatA*, *aaP* and *aggR* plasmid genes in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) from the west Tehran laboratories. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University. Fall 2011; 21(3) (65):183-187. (In Persian)

Nazemi A., Naderi M., Jafarpour M., Mirinargesi MS., Sharifi Sh. The detection of fimrial encoding gene in *E.coli* Strains isolated from patients with urinary tract infection. Medical Laboratory Journal. Winter 2011; 4(2):31-37. (In Persian)

Nazemi A., Mirinargesi M., Jafarpour M. and Sharifi S. H. Screening for Germline Mutations in STK11 Gene in Iranian Patients with Various Gastrointestinal Cancers. South Asian Journal of Experimental Biology. 2012; 2 (2): 61-65.

Nazemi A., Mirinargesi M., Khataminejad M., Shokouhi S. K. and Sharifi S. H. Detection of *stx1*, *stx2*, LT and ST toxin genes and O157 and H7 antigen genes among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iran. African Journal of Microbiology Research, 2012; 6(5): 867-869.

Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Jafarpour M, Sharifi SH. Genotypic versus Phenotypic methods to detect Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in Uropathogenic *Escherichia coli*. Annals of Biological Research, 2012, 3 (5):2454-2458.

Hosseini S. J., Nazemi A., Hashemi M., MiriNargesi M. and Sharifi S. A. (2012). Application of High Resolution Melting Technique for Detection of Germline Single Nucleotide Polymorphism in STK11 Gene among Patients with Various Gastrointestinal Cancers. Medical Science Journal of Islamic Azad University, 21(4): 233-237. (In Persian)

Poster

Screeningfor Germline Mutations in STK11 gene in Iranian Patients with Various Gastrointestinal Cancers. Tıbbı biyoloji ve Genetik kongresi Antalya 2012

Investigation of the Taspine'santiproliferative, antiangiogenic and apoptotic effects on U118 and U87 glioblastomamultiforme cell lines. FEBS-EMBO 2014 Conference, France.

devam eden proje

FMR1 veKaryotipAnalizi Normal SonuçlananPrematür Over Yetmezliği (POF) OlgularındaMolekülerEtyopatogenezinAraştırılması, 2019

Özel İlgi Alanları (Hobileri):