

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 GENİNDE BELİRLENEN KIRPILMA
BÖLGESİ VARYASYONLARININ RNA DÜZEYİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ceyhan ÜNLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma DEMİR

EDİRNE-2023

Ceyhan ÜNLÜ'nün hazırladığı “NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 GENİNDE BELİRLENEN KIRPILMA BÖLGESİ VARYASYONLARININ RNA DÜZEYİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Doç. Dr. Selma DEMİR

Prof. Dr. Hakan GÜRKAN

Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

Tez Savunma Tarihi: 04/07/2023

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Selma DEMİR

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

04 / 07 / 2023

Ceyhan ÜNLÜ

Yüksek Lisans Tezi

Nörofibromatozis Tip 1 Geninde Belirlenen Kırpılma Bölgesi Varyasyonlarının RNA Düzeyindeki Etkilerinin Araştırılması

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Nörofibromatozis tip 1, Nörofibromin 1 (*NF1*) tümör baskılayıcı geni üzerinde gerçekleşen mutasyonların sebep olduğu, otozomal dominant kalıtılan bir tümör yatkınlık sendromudur. Nörofibromatozis tip 1'in ortalama küresel prevalansı 1/ 3.000'dir. Bütün etnik gruplarda görülebilen bu rahatsızlık sıklıkla dermatolojik, ortopedik, merkezi ve periferik sinir sistemlerini etkileyen multisistemik bir hastalıktır.

Bu çalışma kapsamında, Trakya Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'nde DNA'dan yapılan analizlerde *NF1* geni kırpılma bölgesi varyasyonları tespit edilmiş dört *NF1* olgusunun genomik DNA'da belirlenen varyasyonlarının RNA düzeyindeki sonuçlarının, olgulara ait iki farklı dokuda iki farklı Yeni Nesil Dizi Analizi yaklaşımı ve Sanger sekans ile karşılaştırmalı olarak analizi gerçekleştirilmiş, aynı zamanda, olguların ve sağlıklı kontrollerin cilt biyopsisi ve kan dokularına ait transkriptom verileri karşılaştırılarak nörofibromatozisle ilişkili olabilecek gen ekspresyon farklılıkları araştırılmıştır. Çalışmamızda, daha önce herhangi bir çalışmada RNA düzeyindeki etkisi bildirilmemiş (*NF1*): c.730+2T>G varyasyonunun çerçeve kayması sonucu erken dur kodonu oluşumuna neden olduğu iki farklı dokuda ilk olarak gösterilmiştir. Literatürde daha önce kan dokusundan izole edilen RNA'da c.7970+4_7970+7del sonucu erken terminasyona neden olduğu bildirilen varyasyonunun, aynı mutasyonu taşıyan olgumuzda, iki farklı dokuda farklı sonuçlara neden olduğu; olgumuzun cilt biyopsisinde 54. ekzonun atlanması sonucu erken dur kodonu oluşturduğu ancak kandan izole edilen RNA'da az sayıda transkriptte iki ekzonun atlanarak takip eden intronun kısmen dahil edildiği ek bir alternatif kırpılmaya neden olduğu ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamız kapsamında, olgu ve kontrollere ait tüm

transkriptom verilerinin karşılaştırılması sonucunda, cilt biyopsilerinde melanin biyosentezi ile ilgili önemli bir yolak olan L-dopakrom yolağı elemanlarının transkript düzeylerinin anlamlı farklılıklar gösterdiği ($p<0.05$), mRNA translasyonunda stresle ilişkili sinyallerin işlenmesinde görev alan EIF2 sinyal yolağının olgularda, kontrollere oranla anlamlı düzeyde aktive olduğu yapılan kanonik yolak analizleri ile belirlenmiştir.

Başlangıç materyali olarak DNA yerine RNA'nın kullanıldığı genetik analiz algoritmaları tüm dünyada rutin uygulamalarda henüz tam anlamıyla optimize olmuş değildir. Yaptığımız çalışmada, tüm transkriptom analizlerinde *NF1* geni transkript düzeylerinin kontrollere göre anlamlı oranda düşüş gösterdiği ve bu nedenle, olguların klinik bilgileri ile birlikte değerlendirildiğinde RNA'dan tanıya gidilmesi halinde Nörofibromatozis Tip 1 tanısı için yönlendirici olabileceği görülmüştür. Ancak, *NF1*, genel olarak düşük düzeyde ifade edilen bir gen olduğu için tüm ekzonlarda yüksek derinlikli okumaların elde edilmesi, tüm transkriptom verileri içerisinde mümkün olmamış, kırılma bölgesi mutasyonunun oluşturduğu yeni transkriptin tam olarak karakterizasyonu için RNA'nın hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi ve Sanger ile dizilenmesinin daha belirleyici olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, olgu ve kontroller arasında transkriptom verilerinin karşılaştırılmasının hedeflenebilir yolaklar ve moleküler patolojik mekanizmalar ile ilgili önemli bilgiler sağladığı, Nörofibromatozis Tip 1 hastalığına neden olan kırılma bölgesi varyasyonları özelinde gösterilmiştir. Bu pilot çalışma, sağlıklı gönüllülere ait cilt biyopsisi ve kan örneklerinden izole edilen RNA kütüphanelerinin masif paralel sekanslanması ile elde edilen transkriptom verilerinin, merkezimizin ileriki RNA temelli çalışmaları için altyapı oluşturması bakımından da önem arz etmektedir.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 131

Anahtar Kelimeler : Nörofibromatozis Tip 1, NF1, Kırılma, Transkriptom

Master Thesis

Investigation of the Effects of Splicing Region Variations Determined in Neurofibromatosis Type 1 Gene on RNA Level

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant tumor predisposition syndrome caused by mutations in the neurofibromin 1 (NF1) tumor suppressor gene. The average global prevalence of neurofibromatosis type 1 is 1 in 3.000. This condition, which can occur in all ethnic groups, is a multisystemic disease that often affects the dermatological, orthopedic, central, and peripheral nervous systems.

In this study, the genomic DNA of four NF1 cases with identified NF1 gene splicing region variations was analyzed using two different Next-Generation Sequencing approaches and Sanger sequencing. The results of these variations at the RNA level were compared in two different tissues from the cases. Additionally, gene expression differences that may be associated with neurofibromatosis were investigated by comparing the transcriptome data of the cases and healthy controls from skin biopsies and blood tissues. In our study, it was first demonstrated that the c.730+2T>G variation in the NF1 gene resulted in a frameshift and premature stop codon formation at the RNA level in two different tissues, which has not been reported previously at the RNA level in any study. The c.7970+4_7970+7del variation, previously reported to cause premature termination in RNA sample isolated from blood tissue, was shown to have different outcomes in two different tissues in our case carrying the same mutation. In the skin biopsy of our case, it led to the formation of a premature stop codon by skipping exon 54, but in RNA isolated from blood, it caused an additional alternative splicing where the subsequent exon was partially included after skipping the two exons, which was shown for the first time. In our study, when all transcriptome data of the cases and controls were compared, significant differences in the transcript levels of elements in the L-dopachrome

pathway, an important pathway related to melanin biosynthesis in skin biopsies, were observed ($p < 0.05$). Canonical pathway analysis determined that the EIF2 signaling pathway, involved in processing stress-related signals in mRNA translation, was significantly activated in the cases compared to the controls.

Genetic analysis algorithms that use RNA instead of DNA as the starting material have not yet been fully optimized in routine applications worldwide. In our study, significant decreases in NF1 gene transcript levels compared to controls were observed in all transcriptome analyses. Therefore, when evaluated together with the clinical information of the cases, it was observed that RNA-based diagnosis could be guiding for the diagnosis of neurofibromatosis type 1. However, since NF1 is generally a lowly expressed gene, obtaining high-depth reads in all exons was not possible within whole transcriptome data. It was found that targeted Next-Generation Sequencing and Sanger sequencing of RNA were more conclusive for the full characterization of the novel transcript created by the splicing region mutation. Nevertheless, comparing transcriptome data between cases and controls provided important information about targeted pathways and molecular pathological mechanisms, specifically regarding splicing region variations causing Neurofibromatosis type 1. This pilot study is also important for establishing background for our center's future RNA-based studies, as it involves the massive parallel sequencing of RNA libraries isolated from skin biopsies and blood samples of healthy volunteers.

Year : 2023

Number of Pages : 131

Keywords : Neurofibromatosis Type 1, NF1, Splicing, Transcriptome

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her konuda desteğini esirgemeyen, umutsuzluğa her düştüğümde bana umut olan, engin bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan saygıdeğer Doç. Dr. Selma DEMİR hocama en içten teşekkürlerimi iletirim.

Bizlerin daha nitelikli bireyler olmamız için elinden gelen bütün imkanları sunan Prof. Dr. Hakan GÜRKAN hocama ve lisansüstü eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Sinem YALÇINTEPE, Doç. Dr. Emine İkbal ATLI, Dr. Öğr. Üys. Engin ATLI' hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmamızdaki olguların cilt biyopsi örneklerinin alınmasındaki emeklerinden dolayı Doç. Dr. Sezgi SARIKAYA SOLAK' a ve örneklerin laboratuvar ve analiz aşamalarındaki katkılarından dolayı Mehmet KÖŞKER, Hazal SEZGİNER GÜLER ve Can KOŞUKCU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza gönüllü olarak katılan olgu ve kontrollerimizin her birine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca sağlamış oldukları moral desteği ve aile ortamıyla tezime katkılarından ötürü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki lisansüstü çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi iletirim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda duran, beni bugünlere getiren canım annem ve babama ve desteklerinden ötürü aile büyüklerime teşekkür ederim.

Ceyhan ÜNLÜ

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP) tarafından 2022-52 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ ve AMAÇ	1
BÖLÜM 2.....	3
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nörofibromatozis Tip 1	3
2.2 Nörofibromatozis Klinik Bulguları	4
2.2.1 Pigment lezyonları	4
2.2.1.1 Cafe' -au-lait macules (CALM)	4
2.2.1.2 Çillenme	5
2.2.1.3 Lisch nodülleri	5
2.2.2 Optik Glioma.....	6
2.2.3 Nörofibromlar	6
2.2.4 İskelet Anormallikleri	7
2.3 Nörofibromatozis Tip 1 Tanı Kriterleri.....	7
2.4 Nörofibromatozis Tip 1 Geni	8
2.5 Nörofibromin Proteini	9
2.6 Nörofibromatozis Tip 1 Geni Domainleri.....	11
2.6.1 Sistein ve serin açısından zengin alan" (CSRD)	11
2.6.2 Tubulin Bağlama Alanı (TBD)	11
2.6.3 GTPaz aktive edici proteinle ilgili alan (GRD).....	11
2.6.4 SEC14 - PH	12
2.6.5 CTD C- (C-Terminal Alanı)	12
2.6.6 SBD (Sindekan Bağlama Bölgeleri)	13
2.7 Nörofibromatozis Tip 1 Geni ve Mutasyonları	13
2.8 Nörofibromatozis Tip 1 Gen Ekspresyonu	14

2.9 Kırılma	14
2.9.1 Alternatif Kırılma.....	16
2.10 Nörofibromatozis Tip 1 Geninde Kırılma Bölgesi Mutasyonları	17
2.11 Nörofibromatozis Tip 1 Genetik Tanısında Kullanılan Yöntemler	18
2.11.1 Sanger Dizileme	18
2.11.2 MLPA.....	19
2.11.3 Yeni Nesil Dizileme	19
2.11.4 RNA Dizileme.....	20
2.12 TEDAVİ.....	21
BÖLÜM 3.....	22
MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal	22
3.1.1 Hastalar	22
3.1.1.1 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	22
3.1.1.2 Etik Kurul ve TÜBAP Onayı	23
3.1.2 Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri	23
3.1.3 Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilmeme Kriterleri	23
3.2 Yöntem.....	24
3.2.1 Periferik Kandan Total RNA Eldesi	25
3.2.2 Cilt Biyopsisi Örneklerinden Total RNA Saflaştırılması.....	26
3.2.3 Total RNA Kalite ve Kantite Ölçümleri	28
3.2.4 Sanger Sekans	37
3.2.5 Nextera (Nextera XT DNA Library Preparation Kit)	38
3.2.6 Transkriptom Sekanslama.....	38
3.2.6.2 mRNA Yakalama (mRNA Capture)	40
3.2.6.3 mRNA Elüsyonu	41
3.2.6.4 mRNA Temizleme	41
3.2.6.5 mRNA Fragmentasyon ve Denatürasyonu.....	42
3.2.6.6 cDNA İlk Zincir Sentezi	42
3.2.6.7 cDNA İkinci Zincir Sentezi	42
3.2.6.8 cDNA Sentezi.....	43
3.2.6.9 cDNA'yı Temizleme	43
3.2.6.10' Uçların Adenilasyonu.....	43
3.2.6.11 Bağlantı Çapaları.....	44

3.2.6.12 Fragment Temizleme	45
3.2.6.13 Kütüphanenin Çoğaltılması.....	46
3.2.6.14 Kütüphanenin Temizlenmesi	47
3.2.7 Kütüphane kontrolü.....	47
3.2.7.1 Kütüphanelerin Biyoanalizör ile Ölçüm Değerleri	49
3.2.8 Kütüphane Başlangıç Konsantrasyonu Hazırlama.....	51
3.2.9 Kütüphanelerin Yüklenmesi.....	53
3.2.9.1 Kütüphane denatürasyonu ve dilüsyonu	53
3.2.9.2 Kütüphanelerin Yükleme Konsantrasyonuna Seyreltilmesi	55
3.2.10 Yeni Nesil RNA Dizileme ve Diferansiyel Gen İfadesi Analizi İş Akışı.....	55
BÖLÜM 4.....	58
BULGULAR.....	58
4.1 Olguların Klinik Bulguları ve DNA-Temelli Genetik Analiz Sonuçları	58
4.1.1 Olgu 1 ve Olgu 2	58
4.1.2 Olgu 3.....	60
4.1.3 Olgu 4.....	61
4.2 cDNA Sanger Sekans Bulguları.....	65
4.2.1 Olgu 1 ve Olgu 2 cDNA Sanger Sekans Bulguları	65
4.3 Nextera ile Hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi Bulguları	69
4.4 RNA Transkriptom Bulguları	73
4.4.1 RNA Transkriptom Dizi Okumaları ve Dizi Özgüllüğü	74
4.4.2 Olgu ve Kontrol Grupları Arasında <i>NF1</i> Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	81
4.4.3 Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis – PCA).....	82
4.4.4 Olgu ve Kontrollere Ait Cilt Biyopsisi Tüm Transkriptom Bulgularının Karşılaştırmalı Analizi	84
BÖLÜM 5.....	85
TARTIŞMA	85
BÖLÜM 6.....	96
SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR	97
EKLER.....	106
ÖZ GEÇMİŞ.....	112

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

ASO	: Antisens Oligonükleotit
CA	: Koroidal Anormallik
CALM	: Cafe' -au-lait lekesi
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
CPM	: Counts Per Million
CSRD	: Sistein ve Serin Açısından Zengin Alan
CSS	: Kriptik Ekleme Bölgesi
CTD C	: C-Terminal Alanı
ddNTP	: Dideoksi Nükleotid Trifosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dTTP	: Deoksitimidin Trifosfat
dUTP	: Deoksiüridin Trifosfat
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
ERK	: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ESE	: Ekzonik Uç Birleştirme Arttırıcıları
ESS	: Ekzonik Uç Birleştirme Susturucuları
GABA	: Gama-Aminobütirik Asit
GAP	: GTPaz Aktive Edici Protein
GDP	: Guanozin Trifosfat
Grb2	: Büyüme Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 2
GRD	: GTPaz Aktive Edici Proteinle İlgili Alan
GTP	: Guanozin Trifosfat
HF	: Olgu Cilt Biyopsi
HGMD	: Human Genom Mutation Database
HK	: Olgu Kan

hnRNP	: Heterojen Ribonükleo Proteinler
ISE	: İntronik Uç Birleştirme Arttırıcıları
ISS	: İntronik Uç Birleştirme Susturucuları
KB	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
KF	: Kontrol Cilt Biyopsi
KK	: Kontrol Kan
LCL	: Lenfoblastoid Hücre Hattı
LncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
MAF	: Minör Alel Frekansı
MAP	: Mikrotübüle Bağlı Protein
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MLPA	: Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu
mRNA	: Mesajcı RNA
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NF1	: Nörofibromatozis Tip 1
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü
NIR	: Yakın Kızılötesi Yansıma
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
OCT	: Optik Koherens Tomografi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz
pM	: Pikamol
Ras-GAP	: Ras-GTPaz Aktive Edici Protein
Ras-GRD	: Ras-GAP ile İlgili Alan
RIN	: RNA Bütünlük Numarası
RNA	: Ribonükleik Asit
RPKM mapped	: Reads per kilobase of transcript per Million reads
RQN	: RNA Kalite Numarası
SBD	: Sindekan Bağlama Bölgesi

snRNP	: Küçük Nükleer Ribonükleo Protein
SNV	: Tek Nükleotid Varyantları
SOS	: Son of Sevenless
TBD	: Tubulin Bağlama Alanı
TPM	: Transcript Per Kilobase
UHR	: Universal İnsan Referansı
UTR	: Untranslated Regions
YND	: Yeni Nesil Dizileme



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 24 yaşındaki bir kadında makül (Hirbe & Gutmann, 2014)	4
Şekil 2.2. Koltuk altı çillenme bölgesinde Cafe' -au-lait lekesi (Ly & Blakeley, 2019)..	5
Şekil 2.3. A) lisch iris nodüllerini gösteren sol gözün ön segmenti; B) lisch nodüllerini jelatinimsi görünümlü, keskin kenarlı kabarık "kubbeli" lezyonlar olarak gösteren ön segment (Abaloun & Ajhoun, 2017)	5
Şekil 2.4. NF1'li bir yetişkinin kolundaki dermal nörofibromlar (Anderson & Gutmann, 2015)	6
Şekil 2.5. NF1'in işlevsel alanları (Le & Parada, 2007)	9
Şekil 2.6. NF1 etkileşimlerinin Ras ve PI3K yollarıyla temsili (Le & Parada, 2007)....	10
Şekil 2.7. SEC14 - PH Mekanizması (Scheffzek & Welte, 2012)	12
Şekil 2. 8. Nörofibromin alanlarının şematik gösterimi (CSRD: sistein ve serin açısından zengin alan,TBD: Tubulin Bağlama Alanı GRD: GTPaz aktive edici proteinle ilgili alan, Sec:Sec14 homolog alan, PH: pleckstrin homolog alan CTD: C-Terminal Alanı, NLS: nükleer lokalizasyon sinyali Amino asit sayıları şekil altında belirtilmiştir (Bergoug vd., 2020).	13
Şekil 2.9. Splaysozom ile normal ekleme (Venkataramany vd., 2022)	15
Şekil 2.10. İntronların çıkarılması (Scotti & Swanson, 2016)	16
Şekil 2.11. İzoformlar (Bergoug vd., 2020)	16
Şekil 2.12. Kırılma bölgesi mutasyonları (Anna & Monika, 2018)	18
Şekil 3.1. NF1 geninde belirlenen kırılma bölgesi varyasyonlarının RNA düzeyindeki etkilerinin araştırılması iş akışı	24
Şekil 3.2. Kandan RNA izolasyonu işlemi şematik gösterimi	25
Şekil 3.3. Dokudan RNA izolasyonu işlemi şematik gösterimi	27
Şekil 3.4. Olgu 1 kan RNA izolasyon değerleri	28
Şekil 3.5. Olgu 2 kan RNA izolasyon değerleri	29
Şekil 3.6. Olgu 3 kan RNA izolasyon değerleri	29
Şekil 3.7. Olgu 4 kan RNA izolasyon değerleri	30
Şekil 3.8. Kontrol 1 kan RNA izolasyon değerleri	30
Şekil 3.9. Kontrol 2 kan RNA izolasyon değerleri	31
Şekil 3.10. Kontrol 3 kan RNA izolasyon değerleri	31
Şekil 3.11. Kontrol 4 kan RNA izolasyon değerleri	32
Şekil 3.12. Kan RNA izolasyon standart eğri değerleri	32
Şekil 3.13. Olgu 1 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	33
Şekil 3.14. Olgu 2 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	33
Şekil 3.15. Olgu 3 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	34

Şekil 3.16. Olgu 4 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri.....	34
Şekil 3.17. Kontrol 1 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	35
Şekil 3.18. Kontrol 2 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	35
Şekil 3.19. Kontrol 3 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	36
Şekil 3.20. Kontrol 4 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri	36
Şekil 3.21. Cilt biyopsisi örnekleri RNA izolasyon standard eğri değerleri.....	37
Şekil 3.22. Illumina tek iplikçikli mRNA hazırlama kiti (Illumina, San Diego, CA) ligasyon aşamaları.....	40
Şekil 3.23. Adaptör ligasyonu ve indeks ekleme işlemlerinin şematik gösterimi	45
Şekil 3.24. Biyoanalizör ölçümünde 25 ng Evrensel İnsan Referansı (UHR) görüntüsü	48
Şekil 3.25. Kontrol 2'nin kan biyoanalizör ölçüm değeri.....	49
Şekil 3.26. Kontrol 3'ün kan biyoanalizör ölçüm değeri.....	49
Şekil 3.27. Kontrol 4'ün kan biyoanalizör ölçüm değeri.....	50
Şekil 3.28. Kontrol kanlar 1-2-3 biyoanalizör jel görüntüsü	50
Şekil 3.29. Molarite hesaplama.....	51
Şekil 4.1. Olgu 1 ve Olgu 2'ye ait pedigrisi	59
Şekil 4.2. Olgu1 ve 2'nin genomik DNA'da gerçekleştirilen NF1 Yeni Nesil Dizi Analizi sonucu (a: olgu 1, b: olgu 2. Heterozigot NM_001042492.3 (NF1):c.730+2T>G varyasyonu kutucuk içerisinde belirtilmiştir.	59
Şekil 4.3. Olgu 3'e ait pedigrisi.....	60
Şekil 4.4. Olgu 3'e ait genomik DNA'da gerçekleştirilen NF1 Yeni Nesil Dizi Analizi sonucu IGV görüntüsü. Heterozigot NM_001042492.3(NF1):c.1642-3C>G varyasyonu kırmızı kutu içerisinde belirtilmiştir.....	61
Şekil 4.5. Olgu 4'e ait pedigrisi.....	62
Şekil 4.6. Olgu 4'e ait genomik DNA'da gerçekleştirilen NF1 Yeni Nesil Dizi Analizi sonucu IGV görüntüsü IGV görüntüsü. Heterozigot NM_001042492.3 c.7970+4_7970+7del varyasyonu kutucuk içerisinde belirtilmiştir. IGV görüntüsünde kromozom üzerinde genin konumu nedeniyle haritalamada kanonik bölge varyasyonu gibi izlenen bu varyasyon aslında non-kanonik (+4. Nükleotidden başlayan) bir kırpılma bölgesi varyasyonudur.	62
Şekil 4.7. Çalışmaya dahil edilen hastaların kan ve deri biyopsisi örneklerinin jel görüntüleri. Cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen ampliconlara ait jel görüntüsünde, atlanan ekzonun yer aldığı bantların daha zayıf, kan örneğinden çoğaltılan PCR ürünlerinde ise görece daha kuvvetli (yabanıl tip amplicona ait bantlar ile aynı parlaklıkta) olması dikkat çekiciydi.	65
Şekil 4.8. Olgu 1 ve 2'nin kan ve cilt biyopsilerinin yabanıl tip ve atlanan sekans dizileri	66
Şekil 4.9. Olgu 1'in kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü.7.ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir.	66

Şekil 4.10. Olgu 2'nin kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü.7.ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir.	67
Şekil 4.11. Olgu 3'ün kan ve cilt biyopsilerinin yabancı tip ve atlanan sekans dizileri..	67
Şekil 4.12. Olgu 3'ün kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü.15. ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir (reverse okumalar izlenmiştir).	68
Şekil 4.13. Olgu 4'ün kan ve cilt biyopsilerinin yabancı tip ve atlanan sekans dizileri..	68
Şekil 4.14. Olgu 4'ün kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü. 54. ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir.	69
Şekil 4.15. Olgu 1' ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA).....	69
Şekil 4.16. Olgu 1'e ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi) (RNA)	70
Şekil 4.17. Olgu 2'ye ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)	70
Şekil 4.18. Olgu 2'ye ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (RNA) (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi).....	71
Şekil 4.19. Olgu 3'e ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)	71
Şekil 4.20. Olgu 3'e ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (RNA) (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi).....	72
Şekil 4.21. Olgu 4'e ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)	72
Şekil 4.22. Olgu 4'e ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (RNA) (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi).....	73
Şekil 4.23. 4. olgumuza ait kan örneğinden gerçekleştirilen hedefli RNA-Seq (Nextera) analizlerinde 54. Ekzonun (siyah ile belirtilen) yanı sıra 55. ekzonun da (kırmızı ile belirtilen) atlandığı ve takip eden intronun (yeşil ile belirtilen) kısmen dahil edildiği az sayıda transkript de gözlemlendi. Bu bölge ile ilgili detaylı ek analiz planlandı ancak materyal kısıtlılığı nedeniyle gerçekleştirilemedi. Cilt biyopsisi örneğinde ise tüm transkriptlerde sadece 54. ekzonun atlandığı görüldü.....	73
Şekil 4.24. Temel bileşenler analizi (kırmızı: olgu cilt biyopsi, mavi: olgu kan, yeşil: kontrol cilt biyopsi, mor: kontrol kan)	83
Şekil 4.25. Olgu ve kontrollere ait ısı haritası	84
Şekil 5.1. L-dopakrom Biyosentezi	91
Şekil 5.2. EIF2 sinyal yolağı.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nörofibromatozis Tip 1 Tanı Kriterleri (Legius vd., 2021).....	8
Çizelge 2.2. mRNA İşlemesini etkileyen kırılma bölgesi mutasyonları (Pros vd., 2008)	17
Çizelge 3.1. Varyantlara uygun tasarlanan primer dizileri	38
Çizelge 3.2. mRNA yakalama işlemi PCR koşulları	41
Çizelge 3.3. mRNA ELT PCR koşulları.....	41
Çizelge 3.4. DEN94_8 PCR programı	42
Çizelge 3.5. FSS PCR programı	42
Çizelge 3.6. SSS PCR programı	43
Çizelge 3.7. ATAIL PCR programı	44
Çizelge 3.8. Bağlantı çapaları reaktif miktarları.....	44
Çizelge 3.9. LIG PCR programı	44
Çizelge 3.10. Örnek giriş miktarları ve PCR döngü sayıları	46
Çizelge 3.11. Hasta ve kontrol örneklerinden izole edilen RNA'dan elde edilen transkriptom kütüphanelerinin konsantrasyon değerleri.....	51
Çizelge 3.12. Hasta ve kontrollerin periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'dan elde edilen transkriptom kütüphanelerinin konsantrasyon değerleri	52
Çizelge 3.13. Cilt biyopsisi örneklerinden izole edilen RNA'dan üretilen hasta ve kontrol transkriptom kütüphanelerinin dilüsyonları	52
Çizelge 3.14. Kan hasta örneklerinden izole edilen RNA'dan üretilen hasta ve kontrol transkriptom kütüphanelerinin dilüsyonları	52
Çizelge 3.15. Sekans sistemlerine göre başlangıç ve son yükleme konsantrasyonları	53
Çizelge 3.16. Kütüphane başlangıç konsantrasyonları ve hacimleri	53
Çizelge 3.17. Kütüphane konsantrasyonlarına göre eklenecek 200 mM Tris-HCl miktarları	54
Çizelge 3.18. Kütüphanelerin 20 pM'a Seyreltilmesi için kullanılan çözünmüş HT1 miktarı	54
Çizelge 3.19. Metaveri/üst veri (metadata) tablosu HF: Olgu Fibroblast, HK: Olgu Kan, KF: Kontrol Fibroblast, KK: Kontrol Kan.....	56
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların demografik bilgileri, NF1 geninde belirlenmiş olan kırılma bölgesi varyasyonları (NM_001042492.3 transkripti baz alınmıştır).....	63

Çizelge 4.2. Olgular ait Veritabanı Kayıt Numaraları, Global Minör Alel Frekansları ACMG patojeniteleri, RNA analizi sonuçları.....	64
Çizelge 4.3. Olgu 1 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü	74
Çizelge 4.4. Olgu 2 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü	74
Çizelge 4.5. Olgu 3 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü	75
Çizelge 4.6. Olgu 4 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü	75
Çizelge 4.7. Kontrol 1(cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü.....	76
Çizelge 4.8. Kontrol 2 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü.....	76
Çizelge 4.9. Kontrol 3 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü.....	77
Çizelge 4.10. Kontrol 4 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü.....	77
Çizelge 4.11. Olgu 1'in (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü	78
Çizelge 4.12. Olgu 2'nin (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü	78
Çizelge 4.13. Olgu 3'ün (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü.....	79
Çizelge 4.14. Olgu 4'ün (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü.....	79
Çizelge 4.15. Kontrol 1 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü	80
Çizelge 4.16. Kontrol 2 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü	80
Çizelge 4.17. Kontrol 3 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü	81
Çizelge 4. 18. Kontrol 3 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü	81
Çizelge 4.19. Hasta cilt biyopsisi ve kontrol cilt biyopsisi ekspresyon değerleri RPKM: Reads per kilobase of transcript per Million reads mapped TPM: Transcript Per Kilobase CPM: Counts Per Million	82
Çizelge 4.20. Hasta kan ve kontrol kan ekspresyon değerleri RPKM: Reads Per Kilobase Million, TPM: Transcripts Per Kilobase Million, CPM: Counts Per Million.....	82
Çizelge 5.1. Ribozomal proteinlerin ilişkili oldukları kanser tipleri ekspresyon seviyeleri ve etkiledikleri yollar.....	95

BÖLÜM 1

GİRİŞ ve AMAÇ

Nörofibromatozis tip 1 (NF1, # 162200), çoklu organ sistemlerini etkileyen ve çok çeşitli klinik bulguların görüldüğü otozomal dominant bir hastalıktır. Nörofibromatozis tip 1'de nörofibromlar, pigment anormallikleri, düşük dereceli gliomalar ve iskelet displazileri görülebilmektedir (Gutmann vd., 2017).

NF1, dünya çapında 2500-3000 kişide bir meydana gelen en yaygın nörofibromatozis durumudur ve aynı zamanda otozomal dominant kalıtılan bir kansere yatkınlık sendromudur. Ancak NF1 olgularının yaklaşık yarısı, bilinen NF1 aile öyküsü olmayan de novo olgulardır (Cimino & Gutmann, 2018). Bu tam penetran Mendelyan bozukluk, hem tanı kriterlerinin sayısı hem de komplikasyonların meydana gelmesi açısından aile içinde değişken klinik ifade ile karakterizedir. NF1 tanı kriterlerinin ve NF1 klinik değişkenliğinin altında yatan mekanizmalar, muhtemelen karmaşık fizyopatolojinin ve çoklu faktörlerin katılımı nedeniyle tam olarak anlaşılamamıştır (Sabbagh vd., 2013).

NF1 geni, hastalıkla ilişkili kırılma mutasyonlarının sıklığının %20 ile %50 arasında olduğu bir gen olarak ortaya çıkmaktadır (Elisabet Ars vd., 2000). İnsan Gen Mutasyon Veritabanında (HGMD; <http://www.hgmd.org>), *NF1* geni için listelenen 3303 mutasyondan 468 tanesi kırılma ile ilgili mutasyonlardır. Missense, nonsense ve hatta sessiz mutasyonların birçoğu da kırılma sürecini etkileyebileceğinden, bu sayının gerçekte daha fazla olması muhtemeldir.

Dizi analizinde yeni nesil teknolojilerin giderek daha çok merkez tarafından erişilebilir olması ile birlikte genetik hastalıkların tanısında tüm ekzom ve tüm genom dizi analizleri rutin pratikte sıklıkla kullanılır hale gelmeye başlamıştır. Ancak bu bütüncül yaklaşımlarla birlikte bile, nadir genetik hastalıklarda tanı oranı %50'lerde

kalmaktadır. Yapılan alışmalar, hastalık türü ve çalışılan dokuya bağlı olarak RNA dizilemenin, genetik tanı oranını %8 ile 36 arasında arttırdığını ortaya koymaktadır (Yépez vd., 2021). Ancak RNA dizilemede hangi olgularda hangi yaklaşımın kullanılacağı, ıslak laboratuvarıdan analiz süreçlerine kadar izlenecek algoritmaların standardizasyonu için optimal bir iş akış şeması henüz bulunmamaktadır (Conesa vd., 2016).

Çalışmamızda, tüm transkriptom verilerinin nörofibromatozis genetik tanısında yönlendirici potansiyelinin araştırılması amacıyla, mutasyonu bilinen olguların iki farklı dokusundan gerçekleştirilen transkriptom analizleri ile hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi ve konvansiyonel bir yaklaşım olan Sanger sekans sonuçlarının karşılaştırılması planlanmıştır. Bunun yanı sıra, Nörofibromatozis Tip 1 kırpılma bölgesi varyasyonlarının transkriptom boyu etkilerinin araştırılması için dört sağlıklı gönüllüye ait kan ve cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen transkriptom verilerinin olgular ile karşılaştırılması ve Nörofibromatozis Tip 1 ile ilişkili olabilecek yolak analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için merkezimizde *NF1* geninde kırpılma bölgesi varyasyonları tespit edilen olgular geriye dönük olarak taranmış ve 2 kanonik olmayan 1 kanonik kırpılma bölgesi varyasyonu taşıyan dört olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Kırpılma bölgesi mutasyonları hem olası sonuçlarının çeşitliliği hem de hücrenin mRNA kalite kontrol mekanizmalarını devreye sokma potansiyeli nedeniyle özellikli bir alt mutasyon grubu oluşturmaktadır (Baralle & Baralle, 2005). Çalışmamızda bu nedenle *NF1* geni kırpılma bölgesi varyasyonları olan olgular tercih edilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Nörofibromatozis Tip 1

Nörofibromatozis tip 1 (NF1, # 162200) belirtileri olan bireylerin belgelenmiş tanımları ve tasvirleri 1300'lü yıllara kadar uzanmakla birlikte, ilk olarak 1882'de Friedrich Von Recklinghausen tarafından başta merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere dermatolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal ve ortopedik sistemleri etkileyen bir klinik rahatsızlık olarak tanımlanmış ve adlandırılmıştır (Cimino & Gutmann, 2018).

NF1 prevalansı, etnik ve ırksal kökenden bağımsız olarak bireylerde yaklaşık 1:2500 ila 1:3500 arasındadır. NF1, otozomal dominant bir hastalıktır ancak olguların yaklaşık yarısı ailede hastalığın ilk kez ortaya çıktığı de novo olgulardır (Anderson & Gutmann, 2015).

17q11.2'de lokalize *NF1* geni (* 613113) patojenik varyasyonları ya da delesyon/duplikasyonları NF1 fenotipine neden olmaktadır. *NF1* geni (17q11.2), proto-onkogen Ras'ı inaktif formunda stabilize eden ve böylece hücrel proliferasyonu engelleyen 2818 aminoasitlik tümör baskılayıcı protein olan nörofibromini kodlar. Nörofibromatozis tip 1, tam penetrans ve değişken ekspresyon ile seyreden otozomal dominant kalıtılan bir bozukluktur (Farschtschi vd., 2020).

NF1 geni 350 kb (kilobaz) olan büyük boyutundan dolayı, çeşitli mutasyonlara eğilimlidir, bunların %85-90'ı nokta mutasyonlar, %5-10'u mikrolelesyonlar ve %2'si ekzon delesyonları veya duplikasyonlarıdır (Wilson vd., 2021). *NFI* geni üç alternatif eklenmiş haberci RNA varyantı kodlamaktadır. İşlenmiş tam uzunlukta haberci RNA

transkriptinin uzunluğu 11 ila 13 kb'dir ve 3.5 kb 3' çevrilmemiş bölgesi (3'UTR) vardır (Viskochil, 2002).

Nörofibromatozis tip 1 mutasyonuna sahip bireylerde café-au-lait makülleri, inguinal bölgede çillenmeler ve Lish nodülleri gibi pigmenter lezyonlar ile dermal nörofibromlar gelişebilir. Hastalarda bu belirtilerin dışında iskelet anormallikleri (skolyoz, tibial psödoartroz ve orbital displazi), beyin tümörleri (optik yol gliomaları ve glioblastoma), periferik sinir tümörleri (spinal nörofibromlar, pleksiform nörofibromlar ve malign periferik sinir kılıfı tümörleri) gibi rahatsızlıklar da ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu bireyler öğrenme güçlüğü, dikkat eksikliği gibi sosyal yaşamda etkileri olan bazı durumlarla da karşılaşabilmektedir (Gutmann vd., 2017). Nörofibromatozis tip 1, etkilenen bireylerin aynı aile içinde bile değişken şekilde etkilenebileceği bir rahatsızlıktır. Bu sebeple etkili tedavilerin gerçekleştirilmesinde önemli zorluklar bulunmaktadır (Cimino & Gutmann, 2018).

2.2 Nörofibromatozis Klinik Bulguları

2.2.1 Pigment lezyonları

2.2.1.1 Cafe' -au-lait macules (CALM)

Nörofibromatozis tip 1'in en erken klinik bulgusu, genellikle yaşamın ilk 2 yılı içinde gelişen cafe-au-lait makülleridir (Şekil 2.1). Puberte öncesi >0.5 cm veya puberte sonrası >1.5 cm çapında olan 5 adetten fazla makül NF1 tanı kriterlerine girmektedir. Cafe-au-lait makülleri malignite göstermemekle birlikte güneş ışınlarıyla kararma ve ileri yaşlarda solma eğilimindedir. Bireylerin yaşam kalitelerini arttırmak için dermatolojik kamuflej tedavileri uygulanabilmektedir (Hirbe & Gutmann, 2014).



Şekil 2.1. 24 yaşındaki bir kadında makül (Hirbe & Gutmann, 2014)

2.2.1.2 Çillenme

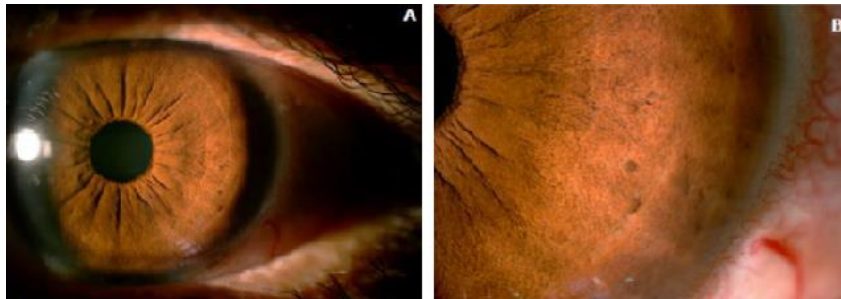
Nörofibromatozis tip 1'in yaygın diğer klinik bulgusu genelde koltuk altı, kasık bölgesi ve boyun çizgisinde görülen çillenmedir (Şekil 2.2). Çillenme kadınlarda meme altı bölgesinde de görülebilmektedir. Genellikle hastaların % 90' ında 7 yaşına kadar çillenme görülmekle birlikte hastalar arası çillenme yoğunluğu değişmektedir (Ly & Blakeley, 2019).



Şekil 2.2. Koltuk altı çillenme bölgesinde Cafe' -au-lait lekesi (Ly & Blakeley, 2019)

2.2.1.3 Lisch nodülleri

Lisch nodülleri, 5 ile 10 yaş arasındaki hastaların %70'inden fazlasında görülen yarık lamba muayenesinde oftalmolog tarafından tespit edilen görüşü etkilemeyen melanositik iris hamartomlarıdır (Şekil 2.3). NF1'li 3 yaşından küçük çocukların yalnızca %5'inde bulunurlar, ancak prevalans yaşla birlikte artar ve NF1'li yetişkinlerin çoğunda Lisch nodülleri bulunur. Yaklaşık 2 mm büyüklüğünde ve genellikle çıplak gözle görülebilen berrak ila sarı veya kahverengidirler (Ly & Blakeley, 2019; Williams vd., 2009).



Şekil 2.3. A) lisch iris nodüllerini gösteren sol gözün ön segmenti; B) lisch nodüllerini jelatinimsi görünümlü, keskin kenarlı kabarık "kubbeli" lezyonlar olarak gösteren ön segment (Abaloun & Ajhoun, 2017)

2.2.2 Optik Glioma

Nörofibromatozis tip 1 olgusu çocukların düşük dereceli glioma gelişimine yatkın olduğu en yaygın beyin tümörü yatkınlık sendromlarından biridir. NF1 ile ilişkili gliomalar birkaç beyin bölgesinde bulunabilirken, çoğunluğu optik sinirlerde, kiazmada, traktlarda ve optik yol gliomaları olarak ortaya çıkar. Konumları nedeniyle, etkilenen çocukların %35-50'sinde görme azalır. Ne yazık ki, kemoterapiyi takiben tümör stabilizasyonuna rağmen, çoğu çocukta görme düzelmez (Campen & Gutmann, 2018).

2.2.3 Nörofibromlar

Nörofibromlar, periferik sinirde ortaya çıkabilen iyi huylu tümörlerdir (Şekil 2.4). Schwann hücreleri ve fibroblastlar, nörofibromlarda baskın hücre tipleri olmakla beraber mast hücreleri, perinöriyal hücreler ve endotelyal hücreler nörofibrom oluşumunda mevcuttur. Klinik açıdan bakıldığında, dört tip nörofibrom vardır: kutanöz, subkütanöz, nodüler ve pleksiform (Friedman, 2002).

Kutanöz ve subkütanöz nörofibromlar genellikle geç çocukluk veya erken ergenlik döneminde (hastaların %57-99'unda) ortaya çıkarken, pleksiform nörofibromlar genellikle doğumdan 18 yaşına kadar (hastaların %20-30'unda) ortaya çıkar. Kutanöz nörofibromlar daha sık görülür sayıları birkaç ila binlerce arasında değişir ve genellikle artan yaşla birlikte sayıları artar (Miraglia vd., 2020).

Noduler nörofibromlar çoğunlukla dermiste (kutanöz) veya deri altı dokuda küçük sinirlerden ortaya çıkar ve vücudun herhangi bir yerinde meydana gelebilir, ancak en çok gövdede bulunur. Sayıları yaşla birlikte artar, 30 yaşın üzerindeki hastaların çoğunda 100'den fazla nörofibrom bulunur (Huson vd., 1988).



Şekil 2.4. NF1'li bir yetişkinin kolundaki dermal nörofibromlar (Anderson & Gutmann, 2015)

2.2.4 İskelet Anormallikleri

Nörofibromatozis tip 1 'de *NF1* geninde gerçekleşen inaktive edici mutasyonlar sonucunda RAS sinyalinin artmasıyla kemik hücrelerinde ve bunların progenitörlerin de hücre proliferasyonu ve farklılaşması etkilenir.

Nörofibromatoz tip 1 olan kişilerde osteopeni, skolyoz, sfenoid kanat displazisi, konjenital tibial displazi ve psödartroz gibi iskelet anomalileri gelişebilir (Hirbe & Gutmann, 2014). Özellikle, tibial psödartroz ve sfenoid kanat displazisi nispeten *NF1*'e özgüdür ve başlangıçta *NF1* teşhis kriterlerini karşılamaya yardımcı olan ayırt edici kemik lezyonları olarak kabul edilmişlerdir (Gutmann vd., 1997). *NF1* 'li hastalarda D3 vitamini eksikliği nedeniyle çocuklarda 3.4 kat, 41 yaş üstü yetişkinlerde 5.2 kat olmak üzere kemiklerde kırık oluşumunda artış söz konusudur (Tucker vd., 2009).

2.3 Nörofibromatozis Tip 1 Tanı Kriterleri

NF1 için klinik tanı kriterleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH, ABD) hazırlamış olduğu kriterlere göre yapılmaktadır (Çizelge 2.1). Belirlenmiş olan kriterler çok genç bireyler, mozaik tutulumu olan veya karakteristik deri bulguları olmayan örneklerin dışında çoğu hastada oldukça spesifik ve duyarlıdır. Hastaların yaklaşık %46'sı sporadik *NF1* ile (de novo mutasyonlar) 1 yaşına kadar kriterleri karşılamaz. *NF1*'den şüpheleniliyorsa, *NF1*'in en az 1 özelliğini gösteren çocukların %97' si 8 yaşına kadar tanı kriterlerini karşıladığından, geç çocukluk dönemine kadar yıllık izleme gereklidir (Ly & Blakeley, 2019).

Café-au-lait makülleri, genellikle hastalığın ilk belirtisidir ve doğumda veya yaşamın ilk birkaç ayında ortaya çıkar, yaşamın ilk yıllarında kademeli olarak boyut ve sayıları artar. Pleksiform nörofibromlar varsa doğumda ortaya çıkabilir, koltuk altı ve inguinal çillenme tipik olarak 1-2 yaş civarında ortaya çıkar. Lisch nodülleri gibi diğer belirtiler genellikle daha sonra ortaya çıkar ve etkilenen çocukların yaklaşık %40'ında 6 yaşında bulunur. Hastalığın ortaya çıkan son ana belirtisi, erken ergenlik döneminde zirve yapan kutanöz ve subkutanöz nörofibromlardır (Shofty vd., 2015).

Çizelge 2.1. Nörofibromatozis Tip 1 Tanı Kriterleri (Legius vd., 2021)

Nörofibromatozis Tip 1 Tanı Kriterleri
A. Aşağıdakilerden iki veya daha fazlası mevcutsa, NF1 tanısı almış bir ebeveyni olmayan bir kişide NF1 için tanı kriterleri karşılanır: • Ergenlik öncesi bireylerde çapı 5 mm'nin üzerinde ve ergenlik sonrası bireylerde çapı 15 mm'nin üzerinde altı veya daha fazla café-au-lait lekesi • Aksiller ya da inguinal bölgede çillenme^a • İki ya da daha fazla herhangi bir tipte nörofibrom ya da pleksiform nörofibrom • Optik yolak gliomu • Yarık lamba incelemesiyle tanımlanan iki veya daha fazla iris Lisch nodülü veya optik koherens tomografi (OCT)/yakın kızılötesi yansıma (NIR) görüntüleme ile görüntülenen parlak, yamalı nodüller olarak tanımlanan iki veya daha fazla koroidal anormallik (CA) • Sfenoid displazi^b, tibianın anterolateral eğilmesi veya uzun kemiklerin psödoartrozu gibi belirgin bir kemik lezyonu • Beyaz kan hücreleri gibi görünüşte normal dokuda %50'lik bir varyant alel fraksiyonuna sahip bir heterozigot patojenik NF1 varyantı B. A kategorisindeki kriterleri taşıyan ebeveynin A kategorisindeki kriterlerden herhangi birini taşıyan çocuğu olmak
^aEğer sadece café-au-lait lekeleri ve çillenme bulunuyorsa, tanı büyük olasılıkla NF1'dir, ancak nadiren kişi Legius sendromu gibi başka bir tanıya da sahip olabilir. İki pigmentasyon bulgusundan en az biri (café-au-lait lekeleri veya çillenme) bilateral olmalıdır. ^bİpsilateral orbital plexiform nörofibroma olgusunda sfenoid kanat displazisi ayrı bir kriter değildir.

2.4 Nörofibromatozis Tip 1 Geni

Nörofibromatozis (*NF1*) geni kromozom 17qll.2 üzerinde bulunan tümör baskılayıcı bir gendir. Belirli bir hücrenin kanserli hale gelmesi için, bir tümör baskılayıcı genin her iki alelinin de mutasyona uğradığı Knudson'un çift vuruş hipotezinin gerçekleşmesi gerekmektedir. NF1 ile ilişkili tümörlerin çoğun da *NF1*'in bialelik inaktivasyonu görülmektedir (Philpott vd., 2017).

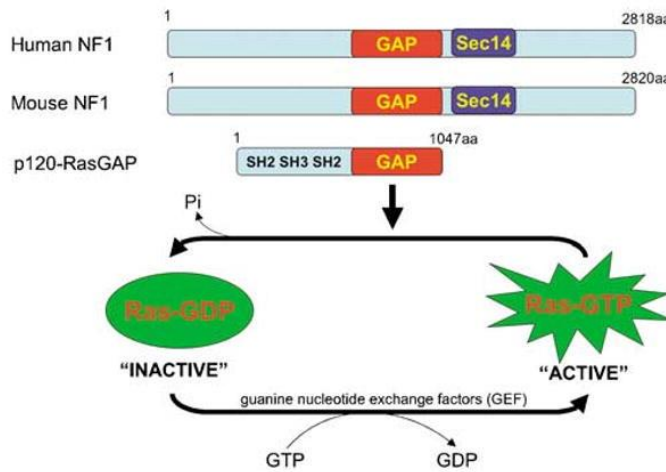
NF1 geninin kodlamış olduğu protein ürünü olan nörofibromin, 1990 yılında tanımlanmıştır (Wallace vd., 1990). *NF1* geni, 280 kb genomik deoksiribo nükleik aside

(DNA) yayılmış ve 57 temel ve 3 alternatif ekzon içeren büyük ve karmaşık bir gendir. *NF1* geni, 8,454 nükleotidlik bir açık okuma çerçevesine sahip bir transkripti kodlar (Messiaen & Wimmer, 2008). Genin büyük boyutu, *NF1* lokusunda yüksek mutasyon insidansını açıklamaya yardımcı olabilir (McClatchey, 2007).

2.5 Nörofibromin Proteini

Tümör baskılayıcı bir gen olan *NF1* geninin protein ürünü nörofibromindir. Nörofibromin, ağırlıklı olarak nöronlarda, Schwann hücrelerinde, oligodendrositler, astrositler ve lökositlerde eksprese edilen sitoplazmik bir proteindir (Trovó-Marqui & Tajara, 2006). Bu proteinin eksikliği veya azalmış aktivitesi, *NF1*'e özgü klinik semptomların başlamasına yol açan hücresel düzeydeki değişikliklerle ilişkilidir. *NF1*'li hastalarda gözlemlenen geniş bir klinik değişiklik yelpazesi, nörofibrominin birçok hücre sinyal yolunun düzenlenmesi ve işleyişinde yer alan çok işlevli bir protein olduğunu düşündürmektedir (Abramowicz & Gos, 2015).

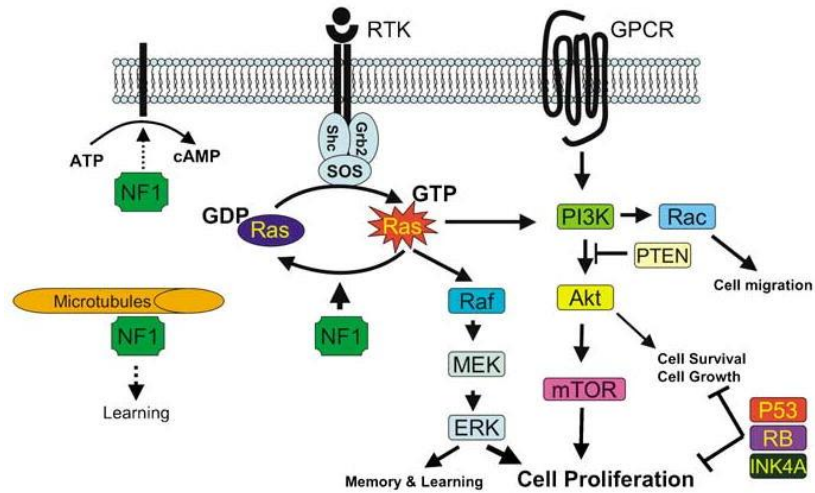
Nörofibromin, 2818 amino aside ve 250 veya 280 kDa (kilodalton) moleküler kütleye sahiptir. Sec14 ve Ras-GTPaz aktive edici protein (Ras-GAP) olmak üzere iki fonksiyonel domaine sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 2.5). Ras-GAP ile ilgili alan (Ras-GRD), 1125-1537 amino asitleri arasında uzanır ve 20-27a ekzonlarına karşılık gelir. RAS inaktivasyonunda görev alır (Trovó-Marqui & Tajara, 2006). Sec14-etkileşimli alan, 1545-1816 amino asitleri arasında yer alır ve mayada hücre içi proteinleri ve lipitleri düzenlediği bilinen Sec14p domainiyle homologdur.



Şekil 2.5. *NF1*'in işlevsel alanları (Le & Parada, 2007)

NF1, bir Ras-GTPaz aktive edici protein olan nörofibromini kodlar. *NF1* gen defektleri, AKT/mTOR ve Raf/MEK/ERK yollarının aktivasyonuna yol açan Ras hiperaktivasyonuna neden olur. Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), Gama-aminobütirik asit (GABA) salınımını modüle eden *SYN1*'i aktive eder. Ras-GTP ayrıca Rac1 ve Cdc42 yollarını aktive ederek PAK1'in aşırı aktivasyonuna yol açar (Tamura, 2021). Nörofibromin proteini, Ras sinyal yolağının negatif regülasyonunun yanı sıra, pek çok hücrede siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerinin kontrolünde, dopamin homeostazında, mTOR sinyal yolağının düzenlenmesinde, aktin iskeletinin organizasyonunda ve mikrotübül-bağımlı transportta da rol almaktadır (Bergoug vd., 2020).

Ras, büyüme faktörü reseptörlerinin spesifik ligandlara bağlanması üzerine plazma zarında aktive edilir ve adaptör protein büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (Grb2) ve Ras guanin nükleotit değişim faktörü SOS'u reseptör tirozin kinaz aktivasyonu bölgesinde kompleks oluşturur. Burada Ras, guanozin trifosfata (GTP) bağlı durumuna geçmek için katalize edilir. Ras'ın bu aktif formu daha sonra Raf'ı ve fosfoinositid-3 kinaz (PI3K)'yı bağlar ve aktive eder; bu daha sonra bir kinaz kaskadı başlatarak mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve PI3K yollarının aktivasyonunu sonlandırır. Bu sinyallerin bazıları daha sonra hücre çoğalmasını, hücre ölümünü, farklılaşmasını ve göçünü kontrol eden genlerin ifadesini düzenleyerek çekirdeğe iletilir (Şekil 2.6) (Le & Parada, 2007).



Şekil 2.6. NF1 etkileşimlerinin Ras ve PI3K yollarıyla temsili (Le & Parada, 2007)

2.6 Nörofibromatozis Tip 1 Geni Domainleri

2.6.1 Sistein ve serin açısından zengin alan" (CSRD)

Sistein ve serin açısından zengin alan (CSRD), 14-21'inci ekzonlar tarafından kodlanan 543-909 amino asitlerinden oluşur ve fosforilasyon ile nörofibrominin aktin ile ilişkisini arttırdığı gösterilmiştir. Bu alanda mutasyonu olan hastalarda optik glioma gelişme riski daha yüksektir. Ek olarak, bir mikrotübüle bağlı protein (MAP) alanı, CSRD içinde bulunur ve nörofibromin ile mikrotübüller arasındaki ilişkiyi düzenlediği düşünülmektedir (Mo vd., 2022).

2.6.2 Tubulin Bağlama Alanı (TBD)

Tubulin Bağlama Alanı (TBD), mikrotübüller ile etkileşime girer ve bu ilişkinin, *NF1*'in Ras-GAP aktivitesini etkilediği gösterilmiştir. Syndecan1 ve Syndecan2 alanlarının, *NF1*'in plazma zarındaki sindekan içeren mikro alanlara lokalizasyonunda işlev gördüğü öne sürülmüştür. C-terminal Alanı, 14-3-3g ile PKA fosforilasyonuna bağlı bir şekilde etkileşime girer ve *NF1* GTPaz aktive edici protein (GAP) aktivitesini inhibe eder (Arun vd., 2013).

Nörofibromin ve tubulin arasındaki etkileşim, mikrotübül depolimerize edici ajan kolşisine duyarlıdır. Nörofibromin GAP aktivitesi, düşük tübülün konsantrasyonlarında bile inhibe edilir. Bununla birlikte, GAP aktivitesinin maksimum inhibisyonu sadece-%70'tir, bu da nörofibromin tübülün kompleksinin GAP aktivitesini koruduğunu düşündürür. Bu azalmış aktivite, Ras'a olan afinitesinde 4 kat azalma ile yansıtılır (Bollag vd., 1993).

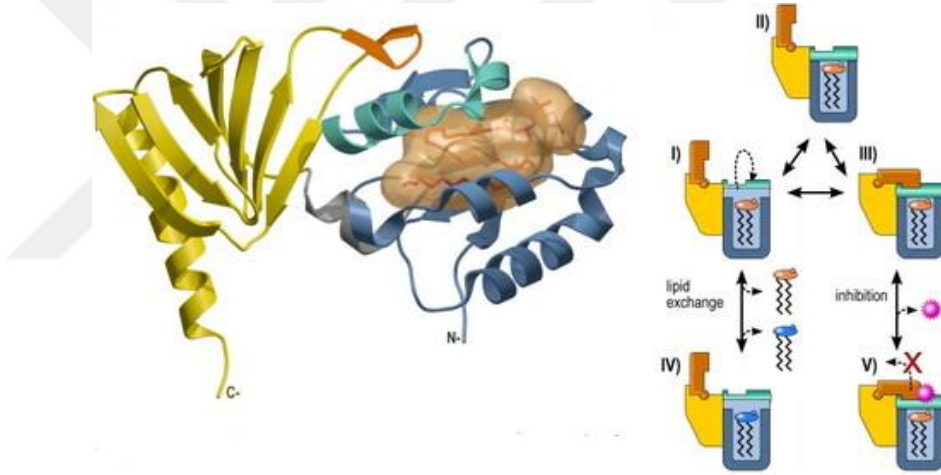
2.6.3 GTPaz aktive edici proteinle ilgili alan (GRD)

Nörofibrominin en iyi karakterize edilen işlevsel alanı, 21–27a ekzonları tarafından kodlanan Ras-GRD'dir. Ras-GTPase alanı, maya IRA-1 ve IRA-2 proteinlerinin yanı sıra memeli GAP katalitik alanı ile benzerlik gösterir. Tüm proteinin yaklaşık %10'u nörofibrominin GRD'sinin in vitro ve in vivo olarak Ras-GAP aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. *NF1* GRD, nörofibromin proteinine tümör baskılayıcı fonksiyon verir, çünkü onkogen Ras üzerinde negatif kontroller uygular, bu da hücresel proliferasyon ve büyümenin azalmasına neden olur. GAP'ler, nörofibromin gibi, aktif GTP'ye bağlı Ras'ın aktif olmayan guanozin trifosfata (GDP) bağlı Ras'a dönüşümünü

hızlandırarak işlev görür. Ras'ın anormal aktivasyonu birçok insan malignitesi ile ilişkilidir (Barron & Lou, 2012).

2.6.4 SEC14 - PH

Neurofibromin, gliserofosfolipid bağlayıcı Sec14-PH modülü içerir. Sec14 benzeri alanlar başlangıçta, zar bölmeleri arasında lipid mekikleri olarak görev yaptıkları mayadaki küresel lipid bağlayıcı proteinler olarak tarif edilmiştir. İki alan arasındaki etkileşim, Sec14p'de lipid bağlama kafesine gliserofosfolipid bağlanmasını kontrol etmek için önerilen Sec14 kısmının korunmuş sarmal kapak segmenti ile temas halinde PH'den türetilmiş fırkete benzeri bir çıkıntı getirir. PH benzeri bölümün ilgili bölgesine ligand bağlanması konformasyonel değişiklikleri indükleyebilir, böylece sarmal kapağın salınmasını veya kapanmasını tetikleyebilir (Şekil 2.7) (Scheffzek & Welte, 2012).



Şekil 2.7. SEC14 - PH Mekanizması (Scheffzek & Welte, 2012)

2.6.5 CTD C- (C-Terminal Alanı)

NF1 proteini, Ras aktivitesini inhibe eden yüksek oranda korunmuş bir GTPaz aktive edici protein alanı içerir ve C-terminal bölgesi, adenilil siklazaın G-proteinine bağımlı aktivasyonu yoluyla cAMP seviyelerini düzenler. NF1 proteininin C-terminal bölgesi, serotonin ve histamin gibi nörotransmitterler tarafından uyarılabilen G-proteinine bağımlı AC yolunu kontrol eder (Ho vd., 2007).

2.6.6 SBD (Sindekan Bağlama Bölgeleri)

Nörofibrominin, bir transmembran heparin sülfat proteoglikan ailesi olan sindekanlara bağlandığı bildirilmiştir. Nörofibrominin sindekan bağlama bölgeleri (SBD), GRD bölgesi içinde 30-33'üncü ekzonlar ve 53-56'ıncı ekzonlar tarafından kodlanır. Nörofibrominin plazma zarının özel bölgelerine bağlanan kısmı ise 53-56'ncı ekzonlar tarafından kodlanır. Bu lokalizasyonun fonksiyonel sonuçları henüz bilinmemekle birlikte, muhtemelen hücre adezyonu ve hücre içi sinyal iletimi ile ilgilidir (Mo vd., 2022).



Şekil 2. 8. Nörofibromin alanlarının şematik gösterimi (CSRD: sistein ve serin açısından zengin alan, TBD: Tubulin Bağlama Alanı GRD: GTPaz aktive edici proteinle ilgili alan, Sec: Sec14 homolog alan, PH: pleckstrin homolog alan CTD: C-Terminal Alanı, NLS: nükleer lokalizasyon sinyali Amino asit sayıları şekil altında belirtilmiştir (Bergoug vd., 2020).

2.7 Nörofibromatozis Tip 1 Geni ve Mutasyonları

NF1 geni için İnsan Gen Mutasyon Veritabanı'nda (HGMD®) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) 3000'den fazla patojenik varyasyon rapor edilmiştir. Bu nedenle *NF1*, insan genomunda en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. Genin büyük boyutu, çoklu psödogenlerin varlığı ve hot spot mutasyon noktalarının olmaması, mutasyon taramasını zorlaştırır. Vakaların yaklaşık yarısı aileseldir, geri kalanı ise *NF1* geninin de novo mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. *NF1*'li hastalar yapısal olarak inaktive edilmiş bir alele sahiptir ve diğer alelde ikinci bir mutasyonun varlığı, tümör gelişimine neden olur (Ece Solmaz vd., 2021).

NF1 hastalarının yaklaşık %5'inin sadece *NF1* genini değil aynı zamanda komşu genleri de içeren tüm gen delesyonları gösterdiği bildirilmektedir. *NF1* hastalarının yaklaşık %2'si multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) tarafından saptanan intragenik kopya sayısı değişiklikleri (ekzon veya multiekszon delesyon /duplikasyonlar) gösterir. Diğer olgularda nükleotid değişiklikleri, küçük delesyonlar ve insersiyonlar görülür. DNA/RNA çalışmaları, kanonik kırılma dizilerinin etkilenmediği durumlarda bile, mutasyonların önemli bir kısmının genden kopyalanan mesajcı RNA'nın

(mRNA) olgunlaşması sırasında doğru kırılma/eklenme süreçlerini etkilediğini ortaya koymaktadır (Pros vd., 2008).

2.8 Nörofibromatozis Tip 1 Gen Ekspresyonu

NF1, tam penetrans ve değişken ekspresyon ile seyreden otozomal dominant bir hastalıktır. Mutasyonlar gen boyunca dağılmıştır; çoğu, gen ürününün ifade eksikliğine yol açar. Nükleotit değişiklikleri, insersiyon veya delesyonlar, kırılma bölgesi mutasyonları dahil olmak üzere hemen hemen tüm mutasyon türleri meydana gelebilir (Korf, 2013). *NF1* gen ekspresyonu, mRNA transkriptinin alternatif eklenmesi, mRNA düzenlemesi ve eşit olmayan alellik ekspresyon dahil olmak üzere üç farklı mekanizma tarafından düzenlenir.

NF1’de hastalar arasındaki değişken ifade sebebiyle RNA işlemindeki sapmaların söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Bu düşünce şunlarla desteklenmektedir;

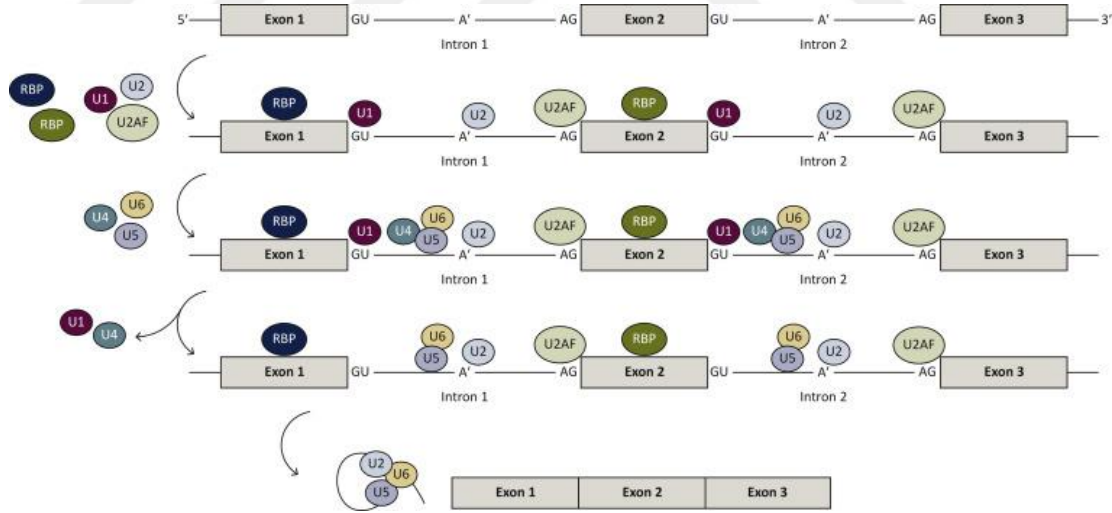
- (i) Tümör olmayan dokularla karşılaştırıldığında NF1 tümörlerde tip I ve tip II (ekzon 23a üzerine 21 aminoasit eklenen) varyantlarının nispi oranlarındaki farklılıklar; (Nishi vd., 1991)
- (ii) NF1 hastalarından türetilen kültür hücrelerinde mutant ve normal *NF1* alellerinin eşit olmayan ifadesi;
- (iii) NF1 olmayan tümörlerde *NF1* geninde mutasyon bulunduran tümörlere göre daha düşük mRNA düzenleme seviyelerinin gözlemlenmesi
- (iv) Belirli alternatif *NF1* transkriptlerinin dokuya özgü ve gelişim aşamasına özgü ifadesi (Skuse & Cappione, 1997).

2.9 Kırılma

Olgun bir mRNA’dan istenilen proteinin translasyonu için, öncelikle pre-mRNA’nın kırılma işlemi adı verilen, pre-mRNA üzerindeki ekzon-intron sınırlarını tanımlayan ‘cis’ dizileri yardımıyla olgun bir m-RNA’ya çevrilmesi gerekmektedir (Şekil 2.9). Ancak ekzon ve intronlarda bulunabilen bu dizilerde bazı durumlarda mutasyonlar oluşabilmektedir. Bu mutasyonlar sonucunda mevcut kırılma düzenleyici dizileri bozulabilir veya yenileri oluşabilir. Genellikle bu tür mutasyonlar, kırılma işlemi

sırasında hatalara neden olur ve uygun olmayan intron çıkarılmasına ve dolayısıyla açık okuma çerçevesinin değişmesine neden olabilir (Anna & Monika, 2018).

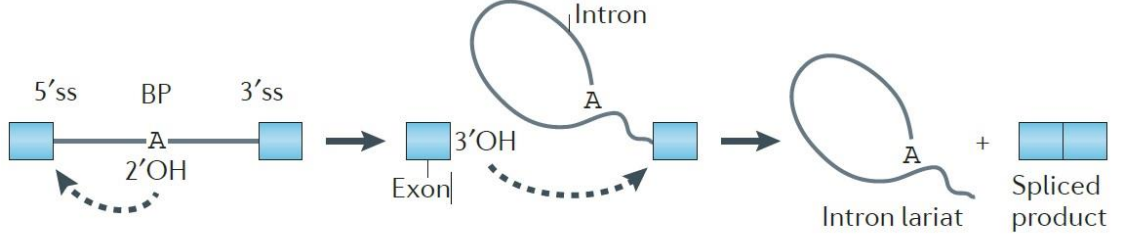
Kırılma işlemi 300'den fazla farklı protein içeren bir protein-RNA kompleksi olan spliceosome tarafından katalize edilir. Spliceosome'un temel bileşenlerinin, her biri küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP) olarak adlandırılan beş küçük RNA'yı (U1, U2, U4, U5 ve U6) içermektedir. Uygun intron kırılma işlemi 5' ek yeri (5'ss) U1, 3' ek yeri (3'ss) U2AF ve dal bölgesinin U2 snRNP kompleksi tarafından tanınmasıyla başlar (Anna & Monika, 2018; Chabot & Shkreta, 2016; Nilsen, 2003). İntronların genellikle 5' ucunda GU ve 3' ucunda AG nükleotidleri bulunur (%1'den azında GC-AG) bulunur. Ek olarak, ekzonik/intronik uç birleştirme arttırıcıları (ESE ve ISE) ve ekzonik/intronik uç birleştirme susturucuları (ESS ve ISS) olarak adlandırılan bir dizi ekzonik ve intronik sekans elemanı uç birleştirme sonucunu etkiler. Bunlar, serin arginin açısından zengin (SR) proteinler ve heterojen ribonükleo proteinler (hnRNP) gibi çeşitli RNA bağlayıcı proteinler tarafından tanınır (Wai vd., 2019).



Şekil 2.9. Splaysozom ile normal ekleme (Venkataramany vd., 2022)

İntronların çıkarılması ve ardından ekzon ligasyonu olan RNA ekleme, iki aşamalı bir biyokimyasal işlemdir (Şekil 2.10). Ardışık transesterifikasyon reaksiyonları, 2', 5' ile bir intron lariat ara ürününün oluşumuyla sonuçlanan aşağı akış intronundaki dal adenozin (dal noktası; BP) tarafından 5' birleşme yerine (5'ss) nükleofilik bir fosfodiester

bağı ile başlatılır. Bunu, 3'e 5'in aracılık ettiği bir aktivite izler, bu da intron kementinin çıkarılmasına ve eklenmiş RNA ürününün oluşmasına yol açar (Scotti & Swanson, 2016).

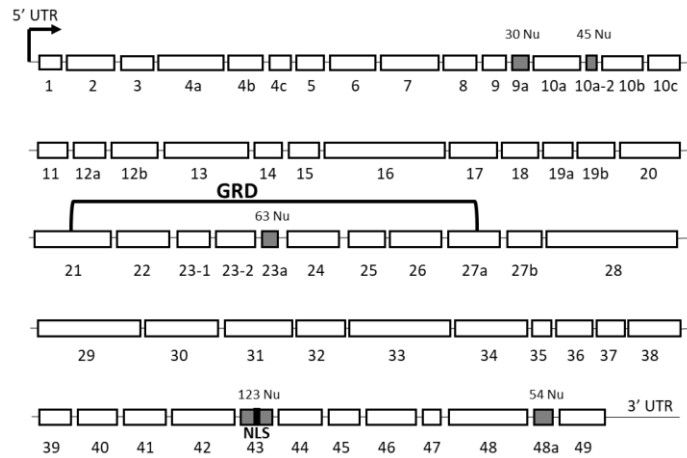


Şekil 2.10. İntronların çıkarılması (Scotti & Swanson, 2016)

2.9.1 Alternatif Kırılma

Alternatif kırılma olayı tek bir transkript üzerinden birçok RNA üretilmesini sağlayan bir mekanizmadır. Bu mekanizma sayesinde protein fonksiyonlarında çeşitlilik, proteinin uzaysal ve zamansal (spatiotemporal) kontrolü ve genom plastisitesinde artış sağlanmaktadır (Assunto vd., 2019).

NF1'in pre-mRNA'sında alternatif kırılma sonucunda oluşabilen birkaç transkript varyantı belirlenmiştir. Bu transkript varyantlarının dokuya özgü ekspresyonları ve düzenlenmeleri olduğu tespit edilmiştir. Farklı *NF1* izoformlarının ifadesine yol açan alternatif olarak eklenmiş beş ekzon özellikle incelenmiştir: 9a, 10a-2, 23a, 43 ve 48a (Şekil 2.11) (Bergoug vd., 2020).



Şekil 2.11. İzoformlar (Bergoug vd., 2020)

Alternatif ekzon olan 9a/9br'ye nükleotid dahil edilmesi *NF1* transkriptine 30 nükleotid ekler ve etkisi merkezi sinir sistemi ile sınırlıdır (Danglot vd., 1995). Alternatif ekzon 48a, *NF1* transkriptine 18 kodon eklemektedir ve kalp ve iskelet kası dokularında etkisinin görülmesi yüksektir (Gutmann vd., 1995). Ekzon 23a ise proteine 63 nükleotid eklemektedir ve GRD alanı içerisinde bulunarak iki protein izoformu oluşturmaktadır. Eğer ekzon 23a atlanırsa tip I, ekzon 23a dahil edilirse tip II izoform oluşur. Ras aktivitesini aşağı doğru düzenlemesinde *NF1* tip II izoformu daha aktiftir ve bu izoformlar ağırlıklı olarak nöronlarda ifade edilirler (Andersen vd., 1993).

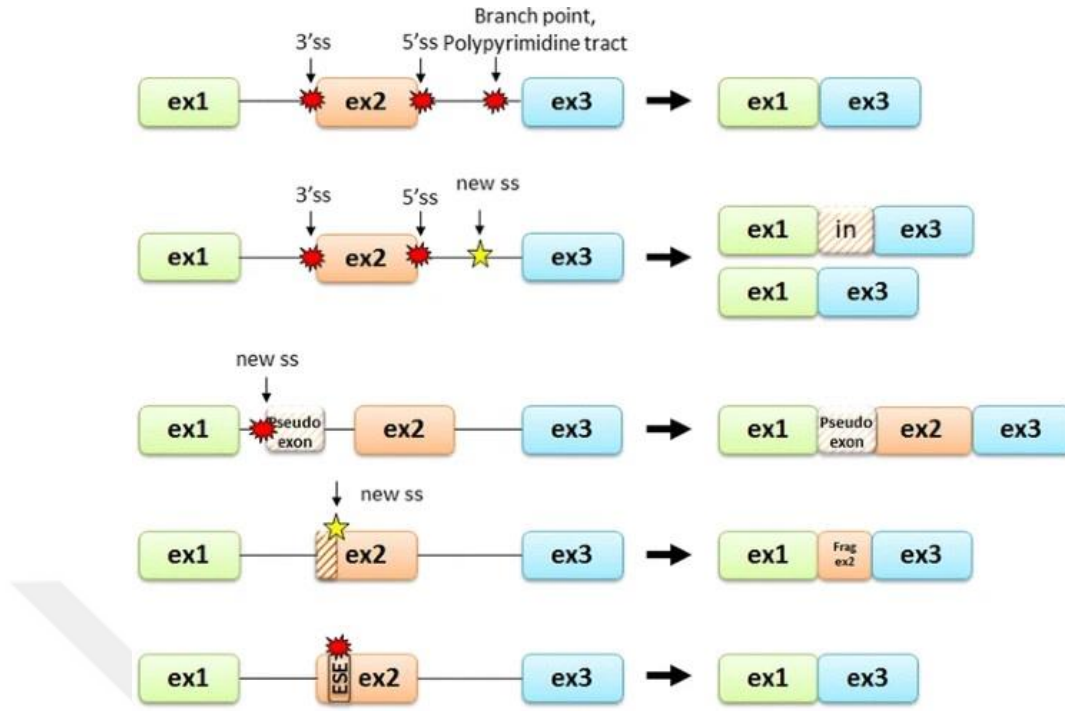
Ekzon 10a-2 ise 10a ve 10b arasındaki N-terminaline yerleştirilmiş 15 ilave amino aside sahiptir. Bu nörofibromin izoformunun hücre içi membranlarda bir rolü olduğunu düşünülmektedir. Başka bir *NF1* izoformu ise ekzon 43'ün 123 nükleotidlik delesyona uğraması sonucu oluşan delta E43 izoformudur. Delesyona uğrayan alan işlevsel bir nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) bulunduğu alandır. Bu nedenle Delta E43 izoformu görülen kişilerin, nöronlarındaki düşük nörofibromin ekspresyonu NLS'nin nöronlarda önemli bir nükleer fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir. (Bergoug vd., 2020).

2.10 Nörofibromatozis Tip 1 Geninde Kırpılma Bölgesi Mutasyonları

NF1'de mRNA işlemlerini etkileyen kırpılma mutasyonlarını DNA düzeyinde mutasyon tipi ve mRNA üzerinde gözlemlenen etkisi bakımından 5 ana başlık altında inceleyebiliriz (Çizelge 2.2 , Şekil 2.12) (Pros vd., 2008).

Çizelge 2.1. mRNA İşlemlerini etkileyen kırpılma bölgesi mutasyonları (Pros vd., 2008)

5' ve 3' birleşme bölgelerinde ekzon atlama ile sonuçlanan mutasyonlar
Kriptik ekzonların dahil edilmesiyle sonuçlanan derin intronik mutasyonlar
Ekzonlar içinde yeni ekleme yerleri yaratan ve bir ekzonun bir kısmının silinmesiyle sonuçlanan mutasyonlar
Bir ekzonun kısmen silinmesine veya bir intronun kısmen yerleştirilmesine yol açan, kanonik 5' ve 3' ekleme bölgelerini etkisizleştiren ve kriptik ekzonik veya intronik ekleme bölgelerinin kullanımını teşvik eden mutasyonlar
Ekzon atlamasına neden olan ekzonik mutasyonlar



Şekil 2.12. Kırılma bölgesi mutasyonları (Anna & Monika, 2018)

2.11 Nörofibromatozis Tip 1 Genetik Tanısında Kullanılan Yöntemler

2.11.1 Sanger Dizileme

İnsan genomunun gizemini çözmemizde bizlere büyük faydası olan Sanger dizileme yöntemi 1977 yılında F Sanger, S Nicklen, AR Coulson tarafından ortaya atılmış, dideoksinükleotid zincir sonlandırma (ddNTP-dideoksi nükleotid trifosfat) temelli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Aynı yıllarda kimyasal kırılma yöntemine dayanan ve radyoizotop ve toksik kimyasallar kullanan Maxam ve Gilbert'ın DNA dizileme yöntemi de bulunmuştur (Sanger vd., 1977). Maxam ve Gilbert'ın yöntemi daha tehlikeli ve zahmetli olduğu için Sanger yöntemi daha çok tercih edilmiştir.

Sanger dizileme yönteminde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Dizilemenin temeli ddNTP'leri kullanarak DNA zincir sentezinin sonlandırılmasıdır. Normalde DNA replikasyon yönü 5' yönünden 3' yönüne doğrudur ve bu 5' ve 3' OH gruplarına fosfodiester bağı oluşturulması ile olur. Sanger yönteminde ise deoksiribozun üçüncü C atomu deoksi halde bulunduğundan fosfodiester bağı oluşumu engellenir ve zincir uzaması sonlanır. Floresan işaretli

dideoksinükleotidlerin kullanıldığı sonlandırma işleminden sonra örnekler pürifiye edilip sekans cihazına yüklenir ve cihaz otomatik olarak örnekleri kapillere çeker, yürütür ve lazer ışığı altında optik sensör tarafından okur, bilgileri bilgisayar programına aktarır.

2.11.2 MLPA

MLPA yöntemi, genlerin kopya sayısındaki varyasyonları hedefli olarak tespit edebilen bir tekniktir. Bu nedenle MLPA, patogenezi spesifik genlerin delesyon/duplikasyonlarına dayanan genetik hastalıkların moleküler tanısında kullanılabilir. Ayrıca MLPA testi, anormal DNA metilasyonunun varlığı ile karakterize edilen genetik hastalıkların moleküler tanısında da kullanılmaktadır (Stuppia vd., 2012).

MLPA, büyük genomik delesyonları tespit etmek için rutin olarak kullanıldığından, komplementer DNA'da (cDNA) *DMD* ve *BRCA1* gibi genlerdeki ekzon atlama olaylarını başarıyla tespit ettiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Brandão vd., 2012).

NF1 genindeki tek ve çoklu ekzon delesyon/duplikasyonlarının tespit edildiği bir çalışmada ise çalışmaya 65 hasta dahil edilmiş ve hastaların %7.7'sinde (5/65) *NF1* genindeki ekzon delesyonları MLPA ile gösterilmiştir (Laczmańska vd., 2014). Yapılan diğer bir çalışmada ise *NF1* olduğundan şüphelenilen bir olgu MLPA ile analiz edilmiş ve *NF1* geninin ekzon 13'ünde bir değişiklik saptanmış. Ekzon 13'ün sekanslanmasıyla, anormal bir ekleme bölgesi oluşturan ve NCBI'nın (*National Center for Biotechnology Information*) veri tabanında patojenik olarak kaydedilen bir missense mutasyon (NM_000267.3:c.1466A>G) tespit edilmiştir (Laurito vd., 2015).

2.11.3 Yeni Nesil Dizileme

İnsan genomunun kodunun çözülmesiyle birlikte hastalıkların genetik ile ilişkileri daha da önem kazanmıştır. Bu nedenle daha koruyucu, spesifik ve tanısal stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmış ve maliyeti az, hızlı, kapsamlı dizileme çalışmaları geliştirilmiş ve Sanger dizileme gibi yöntemlerin aksine daha yüksek verimliliğe sahip YND (Yeni Nesil Dizileme) teknolojisi önem kazanmıştır (Xuan vd., 2013).

YND (NGS, Next Generation Sequencing, Massively Parallel Sequencing, Deep Sequencing olarak da bilinmektedir) platformları, fragment enzimleri ile rastgele kesilmiş milyonlarca küçük DNA parçasının dizilemesini gerçekleştirir. Dizilenen parçalar

biyoinformatik analizlerle, insan referans genomuna eşlenir ve analiz edilir. İnsan genomundaki üç milyar bazın her biri birden çok defa dizilenir, bu da veri kalitesini artırır (Behjati & Tarpey, 2013). YND günümüzde birçok klinik laboratuvarında germ-hattı ve somatik mutasyon tespiti için, hedefli panel, tüm ekzom, tüm genom veya mitokondriyal DNA dizilemesi yapılarak kullanılmaktadır (Yohe & Thyagarajan, 2017).

YND için kütüphane hazırlığı kısa okumalar için 3 temel adımda sıralanabilir:

- 1.Uygulamaya özgü uzunluklara göre DNA'nın fragmentlere parçalanması
- 2.Parçaların mikroçipler, mikro boncuklar gibi yüzeylere bağlanmasını kolaylaştırmak için adaptörlerin bağlanması
- 3.Dizilerin tespit edilmesi için her bir örneğin amplifikasyonu

Uzun okuma platformlarında, amplifikasyon adımı gerekmediğinden ve bazılarında orijinal DNA veya RNA molekülü doğrudan dizilendiğinden kütüphane hazırlamalarında farklılık gösterir (Kumar vd., 2019).

2.11.4 RNA Dizileme

RNA dizileme, hücrenin transkriptomuna ait bilgi sağlayan yüksek verime sahip bir yöntemdir. Gen ekspresyonunun incelenmesi, yeni transkriptlerin keşfedilmesi, alternatif genlerin ve alel spesifik ekspresyonun tespitinde önemlidir. RNA dizileme mRNA transkriptlerinin haricinde total RNA, pre-mRNA, mikroRNA ve uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA) gibi RNA'ların araştırılmasında da kullanılmaktadır (Kukurba & Montgomery, 2015).

Tek nükleotid değişikliklerinin (SNV'lerin) %62'sinin patojenik olduğu ve RNA kırılmasını etkileyebileceği düşünülmektedir. (Wai vd., 2020). *NF1* genindeki fonksiyonel varyantların yaklaşık %10'luk kısmı da RNA eklemesini etkiler. Ekleme varyantlarının derin intronik dizilerde yer alması ve ekzonların içinde sessiz varyantlar olarak translasyonun erken sonlandırma kodonuna yol açması nedeniyle önemlidir. Bu varyantlar geleneksel DNA tabanlı yöntemler ve in siliko ekleme tahmin programları tarafından gözden kaçabilmektedir. NF1 için teşhis kriterlerini karşılayan bireylerin ~% 10-20'sinde DNA tabanlı yöntemler kullanıldığında patojenik varyant tespit

edilememektedir. Bu sebeple RNA dizileme ekleme varyantları ve anormal ekspresyon tayininde oldukça önemlidir (Douben vd., 2022; Koster vd., 2021; Saeidian vd., 2020).

2.12 TEDAVİ

Nörofibromatozis tip 1'deki kırpılma bölgesi mutasyonları, *NF1* germ hattı mutasyonlarının %27'sini oluşturur. Mutasyonların büyük kısmı ekzon atlama ile sonuçlanırken %2'lik kısmı ise yeni 5' veya 3' bölge oluşturarak psödoekzon oluşturan derin intronik tek nükleotid değişiklikleridir. Ekleme bloke edici antisens oligonükleotidin (ASO), *NF1* derin intronik mutasyonları bulunan hücrelerde mutant ekzonları atlamada ve nörofibromin ekspresyonunu geri kazandırdığı gösterilmiştir (Walker & Upadhyaya, 2018).

Derin intronik mutasyonlar, kodlama bölgelerinden uzak olduklarından terapötik düzeltmeler için güzel noktalardır ve kanonik kırpılma bölgelerini etkilemezler. Antisens oligonükleotitler mutasyon sonucu oluşan ekleme bölgesini etkisizleştirerek kriptik ekzonun ekleme makinesi tarafından tanınmasını önler ve normal birer ekleme gerçekleşir (Pros vd., 2009).

Antisens oligolar, pre-mRNA transkriptlerini tamamlayan sekanslara sahip, genellikle 15-30 deoksinükleotitten oluşan sentetik polimerlerdir. Gen ekspresyonunu baskılamak, ekzon eklenmesini sağlamak, kriptik ekleme bölgelerini (CSS) gizlemek ve ekzonları atlamak için kullanılabilirler (Leier vd., 2020).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hastalar

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine, Nörofibromatozis Tip 1 bulguları ile gelen ve yapılan genetik analiz sonucunda *NF1* geninde kırılma bölgesinde varyasyon belirlenmiş dört olgu ve *NF1* geninde mutasyon belirlenmemiş dört sağlıklı kontrol bireyi dahil edildi. Hasta grubu, daha önce literatürde ve veritabanlarında, hastadan alınan cilt biyopsisi ve/veya kan doku örneklerinde RNA düzeyinde fonksiyonel çalışma bulunmayan 1 kanonik, 2 kanonik olmayan üç farklı kırılma bölgesi varyasyonuna sahip ikisi kadın ikisi erkek dört olgudan oluşmaktaydı. Olgularımızdan üçü ailesel biri sporadik olgu idi ve 3 farklı aileye mensup bireylerdi.

Nörofibromatozisli hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu eşliğinde, Deri ve Zührevi Hastalıklar polikliniği biriminde bulunan tam donanımlı tedavi odasında, 4 mm punch biyopsi aleti kullanılarak deri biyopsisi alındı. Aynı zaman da her hasta ve kontrolden EDTA'lı tüpe izolasyon için 2ml kan alındı.

3.1.1.1 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Olgularımızdan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları, olgulara araştırılmanın neden ve nasıl yapılacağı ve sahip oldukları haklarla ilgili bilgilendirme yapıldıktan sonra okutularak yazılı onayları alındı ve saklandı (Ek-1).

3.1.1.2 Etik Kurul ve TÜBAP Onayı

Çalışmamız için gerekli etik kurul onayı Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulundan 18/10/2021 tarih, 20/11 karar numarası ve sayılı belgesi (TÜTF-BAEK 2021/409) ile alındı (Ek-2).

3.1.2 Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

Hastalar için;

- Nörofibromatozis tip 1 klinik bulgularına sahip olmak
- NF1* geninde kırılma bölgesi varyasyonuna sahip olmak

Kontroller için;

- *NF1* geninde patojenik varyasyon taşımamak
- Araştırmaya dahil olduğu tarihte herhangi bir kanser tanısı almamış olmak

3.1.3 Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

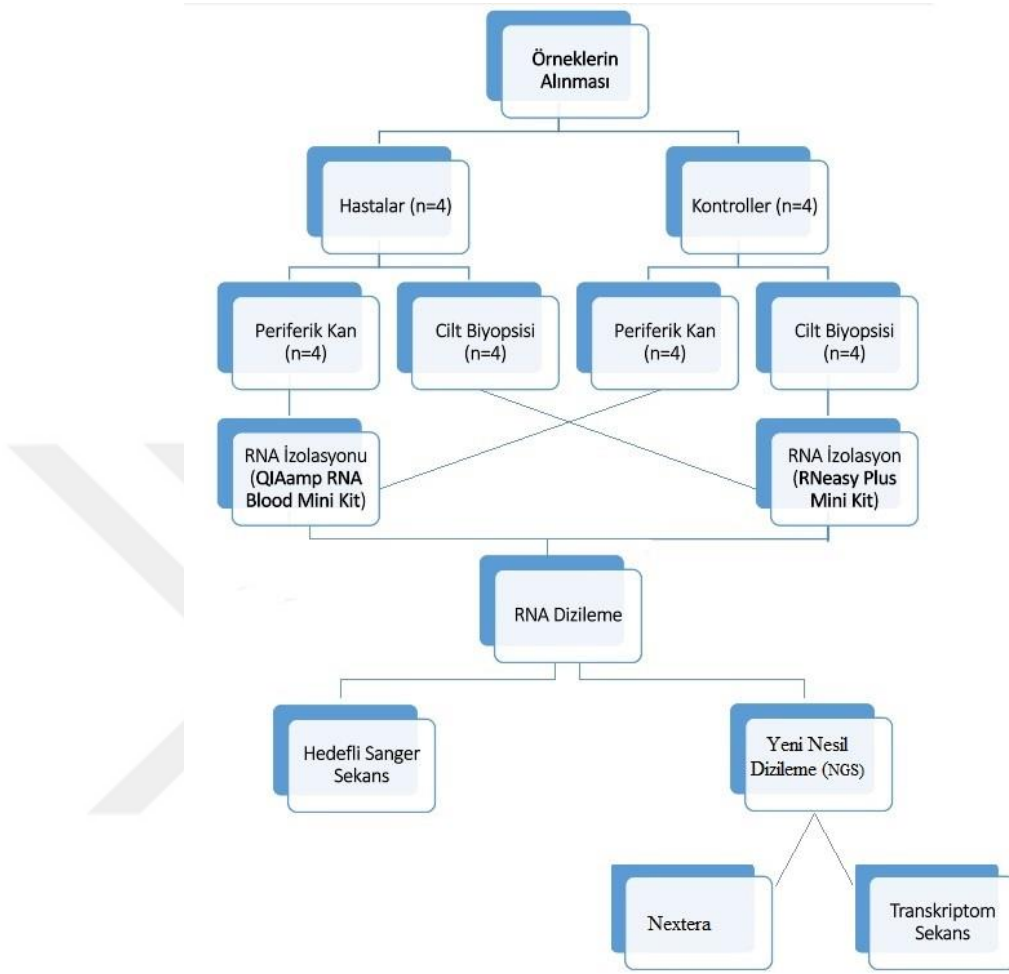
Hastalar için;

- Nörofibromatozis tip 1 klinik bulgularına sahip olmamak
- NF1* geninde kırılma bölgesi varyasyonu dışında bir patojenik varyasyona sahip olmak

Kontroller için;

- NF1* geninde patojenik varyasyon taşımak
- Araştırmaya dahil olduğu tarihte herhangi bir kanser tanısı almış olmak.

3.2 Yöntem



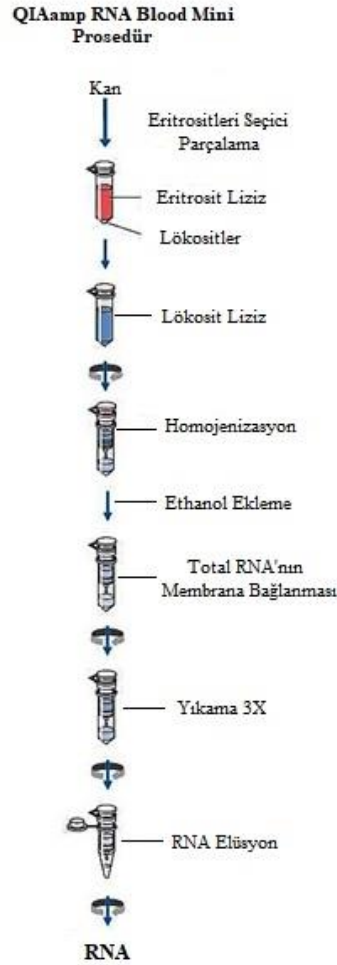
Şekil 3.1. *NF1* geninde belirlenen kırılma bölgesi varyasyonlarının RNA düzeyindeki etkilerinin araştırılması iş akışı

Dört hasta ve dört kontrolden oluşan çalışma grubumuzdaki her bir gönüllüden periferik kan ve cilt biyopsisi olmak üzere iki farklı dokuya ait numune alındı. Alınan total kan örneklerinden QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ve cilt biyopsi örneklerinden ise Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Sanger sekans ve Nextera ile RNA dizileme işlemi için izolasyon örnekleri *ipsogen*® RT (Qiagen, Hilden, Germany) kiti ile cDNA'ya çevirildi. Olgulara ait DNA örneklerinde daha önce belirlenmiş olan mutasyon bölgelerinin *NF1* mRNA'larındaki olası sonuçlarını görmek için cDNA örnekleri Sanger sekans ve Nextera işlemlerine tabi tutuldu. Kırılma bölgesi mutasyonlarının mRNA düzeyindeki etkilerini

görmek ve olgular ile kontrollere ait iki farklı doku tipindeki ekspresyon farklılıklarını belirlemek için tüm örnekler Yeni Nesil Dizi Analizi ile RNA Dizileme yaklaşımına dayanan transkriptom sekans işlemine tabi tutuldu (Şekil 3.1).

3.2.1 Periferik Kandan Total RNA Eldesi

Hasta ve kontrollerden bilgilendirilmiş onam formu eşliğinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda alınan 2 ml. periferik kan örneğinden total RNA eldesi (Şekil 3.2), Qiagen RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak yapıldı. RNA pürifikasyon işlemi QIAcube HID Differential Washing Station (Qiagen, Hilden, Germany) cihazında QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ile gerçekleştirildi. Saflaştırılan RNA örneklerinin konsantrasyon ve kalite ölçümleri NanaDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.



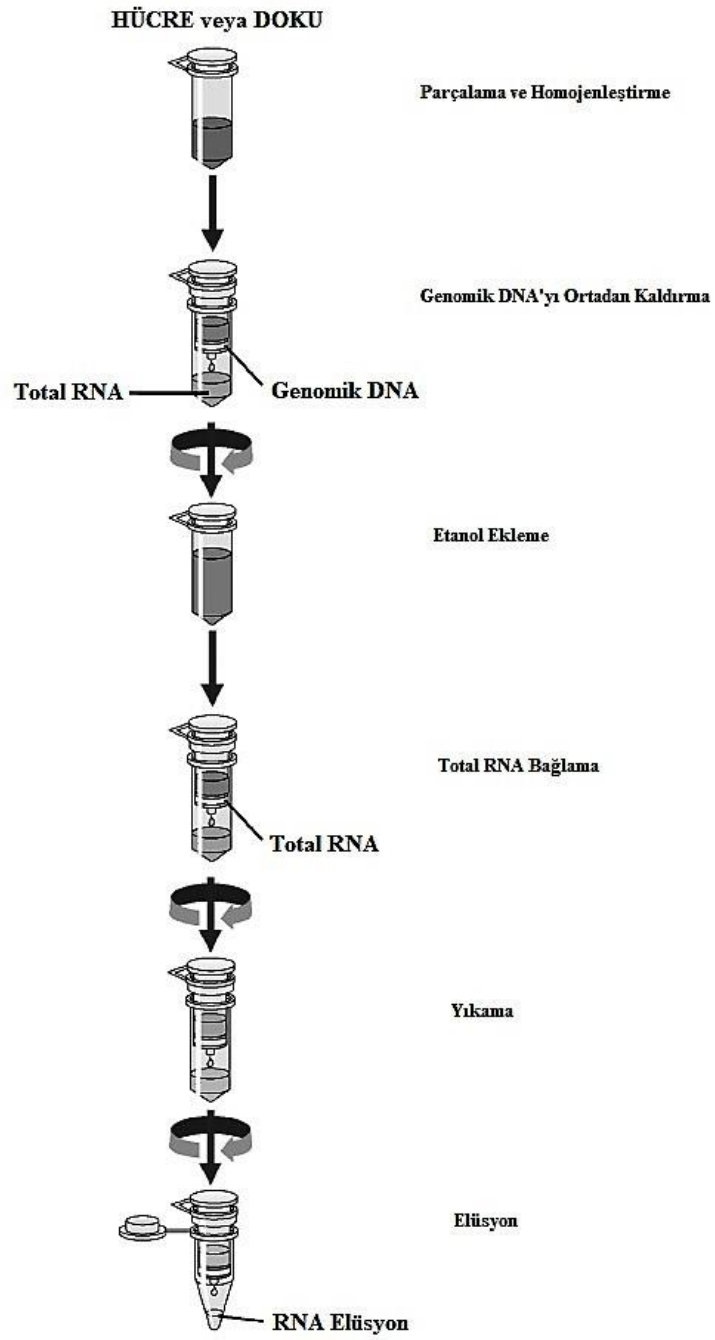
Şekil 3.2. Kandan RNA izolasyonu işlemi şematik gösterimi

3.2.2 Cilt Biyopsisi Örneklerinden Total RNA Saflaştırılması

Olgu ve kontrollerden, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde bulunan tam donanımlı tedavi odasında, cilt biyopsisi örnekleri alındı. Cilt biyopsisi, her gönüllüden normal görünümlü deri bölgesinden 2 adet olmak üzere, Deri ve Zührevi Hastalıklar Polikliniği'nde, 4 mm punch biyopsi aleti kullanılarak alındı. Biyopsi alınacak bölgeye işlem öncesi lidokain enjeksiyonu yapılarak lokal anestezi sağlandı.

Hasta sayıları sağlanana kadar, biyopsi örnekleri hücresel RNA'yı 37°C'de 1 gün, 25°C'de 1 hafta, 4°C'de 1 ay ve -20°C'de süresiz olarak stabilize halde saklamamıza imkan veren İnvitrogen RNAlater (Thermo Fisher Scientific) Stabilizasyon Solusyonu içerisinde saklandı. Dokudan RNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini kiti (Qiagen, Hilden, Germany) protokolüne uygun bir şekilde izolasyon işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.3).

İzolasyon işlemi için önce dokular Buffer RLT Plus (Qiagen, Hilden, Germany) içerisinde uygun hacimlerde homojen bir hale gelinceye kadar parçalandı. Homojenize lizat, 2 ml'lik bir tüpe yerleştirilip bir gDNA Eliminator spin kolonuna aktarıldı. 8000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi. Kolonu atıldı ve kolon altına 1 hacim (genellikle 350 µl veya 600 µl) %70 etanol eklenerek ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. 700 µl'ye kadar numune bir RNeasy spin kolonuna aktarıldı. Kapak kapatılıp ≥ 8000 x g'de 15 saniye santrifüjleyip süzüntü atıldı. RNeasy Mini spin kolonuna 700 µl RW1 Tamponu eklendi. Kapağı kapatılıp ≥ 8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi ve süzüntü atıldı. RNeasy spin kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi. 8000 x g'de 15 saniye santrifüjlenip süzüntü atıldı. RNeasy spin kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi ve 2 dakika ≥ 8000 x g'de santrifüjlendi. Kolon son olarak iyice kuruması için 1 dk maksimum hızda santrifüjlendi. RNeasy spin kolonu yeni bir 1.5 ml tüpe yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranına 30–50 µl RNaz içermeyen su eklendi. RNA'yı ayrıştırmak için ≥ 8000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. RNA elüsyonunu 0.2 ml'lik tüplere paylaştırıldı.



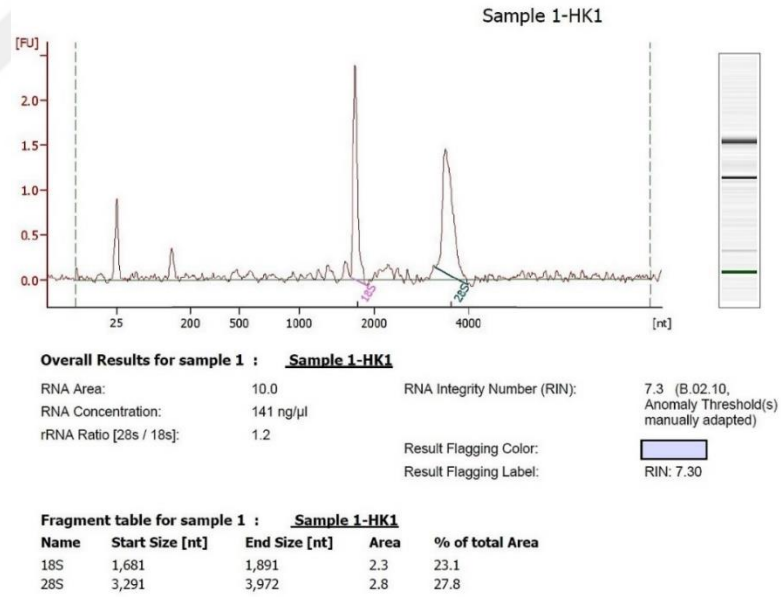
Şekil 3.3. Dokudan RNA izolasyonu işlemi şematik gösterimi

3.2.3 Total RNA Kalite ve Kantite Ölçümleri

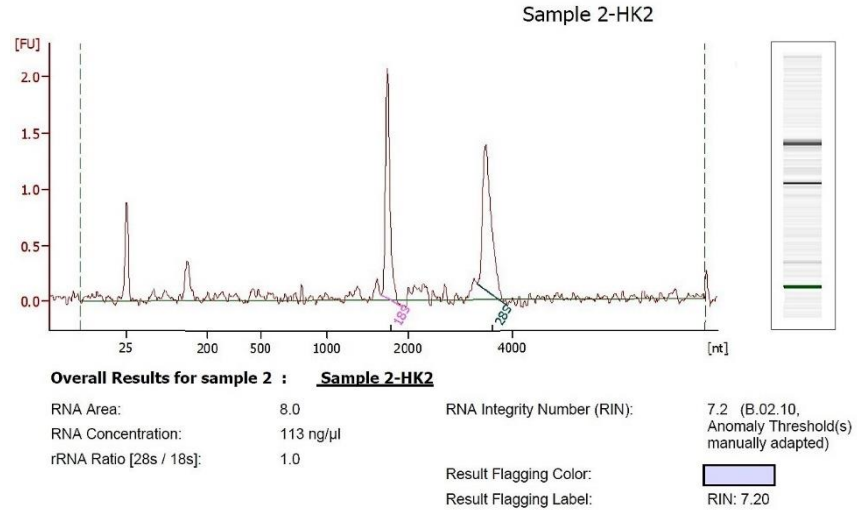
RNA analizi bilimsel çalışmalarımızda önemli bir yere sahiptir. Günümüzde artan RNA çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edebilmek ve zamandan tasarruf sağlayabilmek için RNA materyallerinin kalite ölçümlerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. RNA ortamdaki RNaz'lerden sıcaklık ve enzimatik sindirim gibi faktörlerden etkilenebilmektedir.

Çalışmamızda RNA konsantrasyonları ve saflık değerleri RNA 6000 Pico Kiti (Agilent Technologies, Santa Clara, California) kullanan bir Agilent 2100 Biyoanalizör (Agilent Technologies, Santa Clara, California) sistemi kullanılarak tespit edildi. İzole edilen RNA örneklerinin RNA bütünlük numarası (RIN) ve RNA kalite numarası (RQN) değerleri Şekil 3.4'den 3.21'e kadar belirtildi.

3.2.3.1 Kan RNA Elektroferogram Özeti



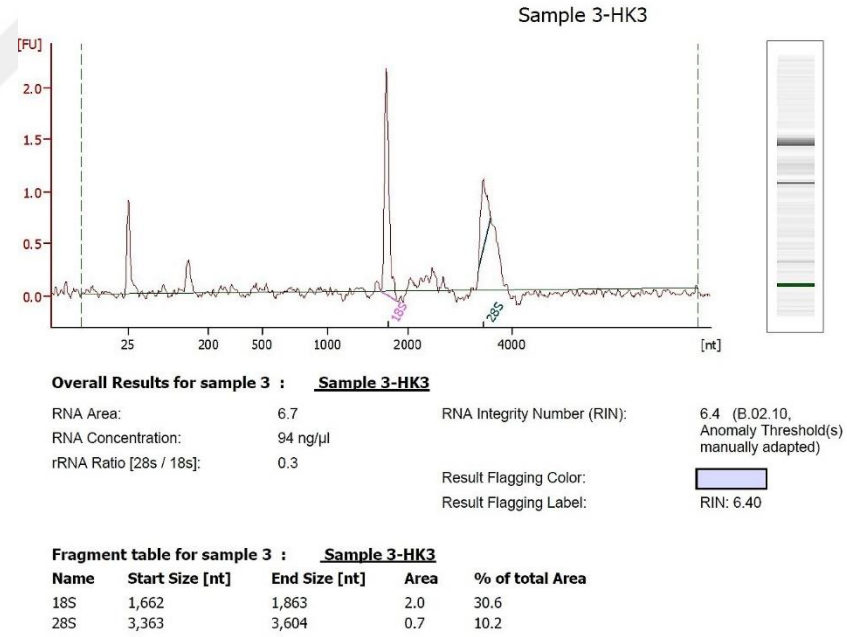
Şekil 3.4. Olgu 1 kan RNA izolasyon değerleri



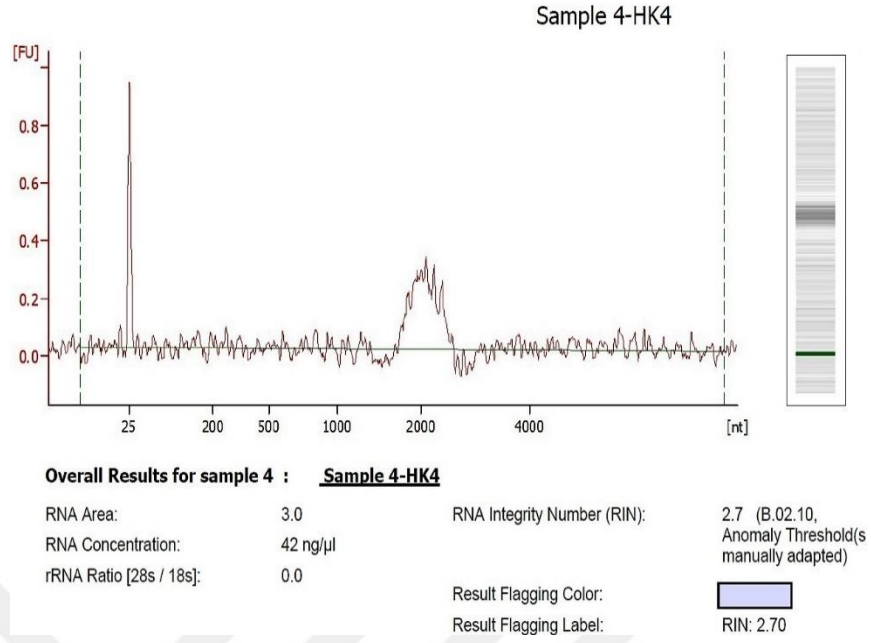
Fragment table for sample 2 : **Sample 2-HK2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,660	1,916	1.9	24.0
28S	3,320	3,900	2.0	25.0

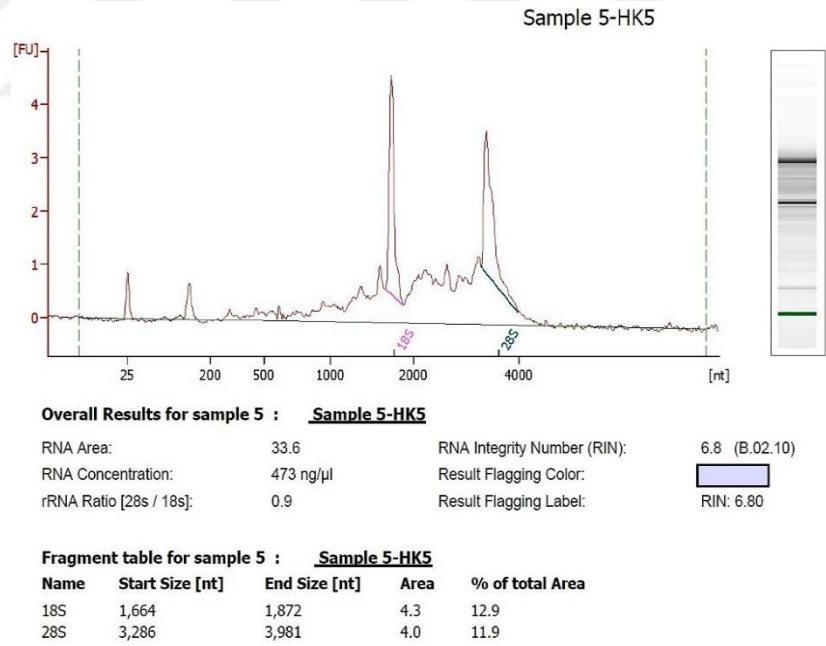
Şekil 3.5. Olgu 2 kan RNA izolasyon değerleri



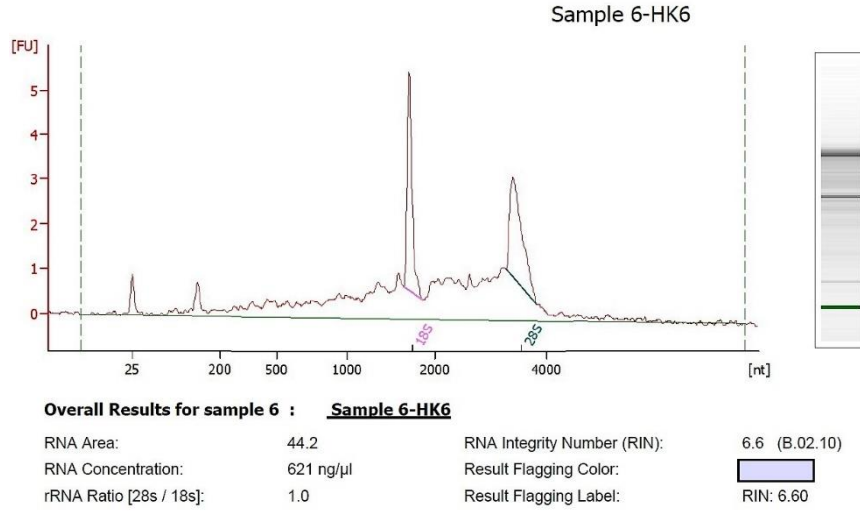
Şekil 3.6. Olgu 3 kan RNA izolasyon değerleri



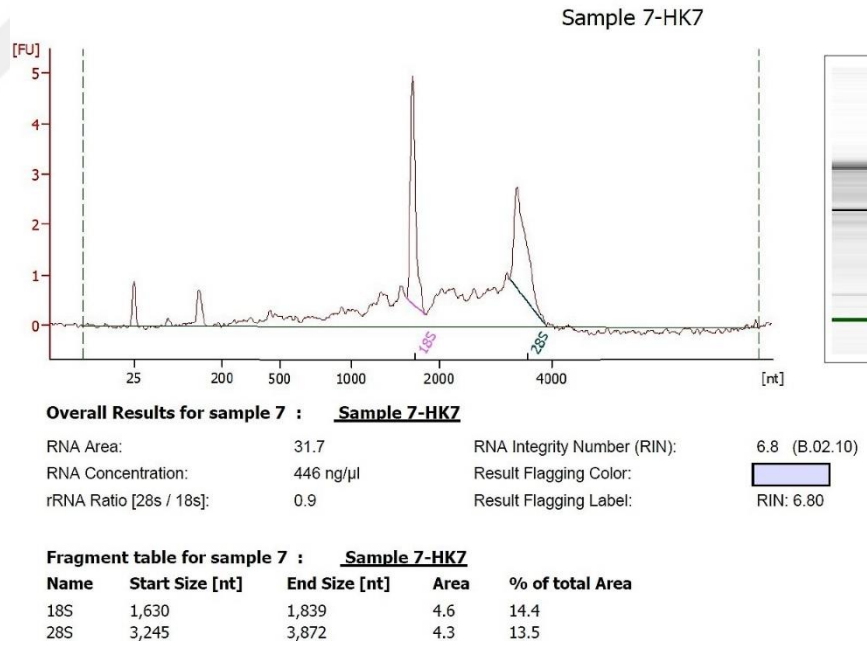
Şekil 3.7. Olgu 4 kan RNA izolasyon değerleri



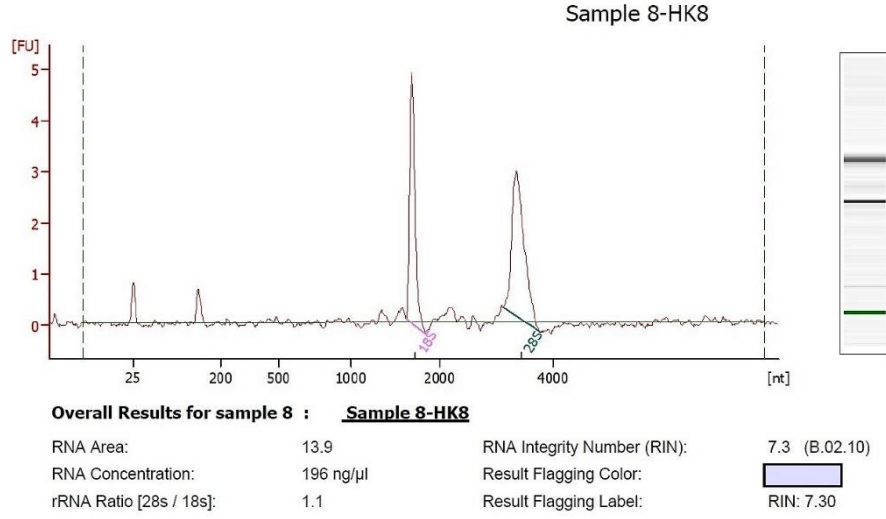
Şekil 3.8. Kontrol 1 kan RNA izolasyon değerleri



Şekil 3.9. Kontrol 2 kan RNA izolasyon değerleri



Şekil 3.10. Kontrol 3 kan RNA izolasyon değerleri

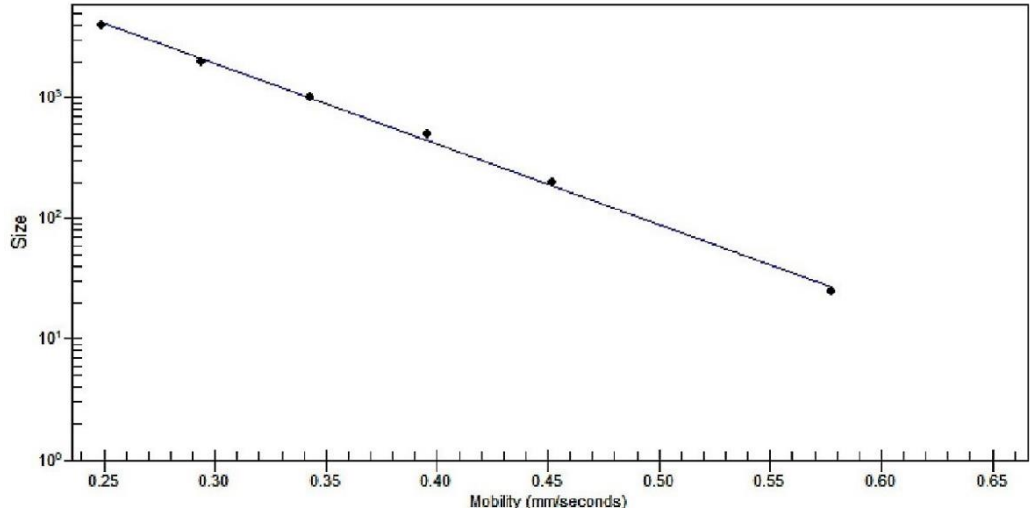


Fragment table for sample 8 : Sample 8-HK8

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,620	1,830	5.0	36.2
28S	3,116	3,770	5.7	41.2

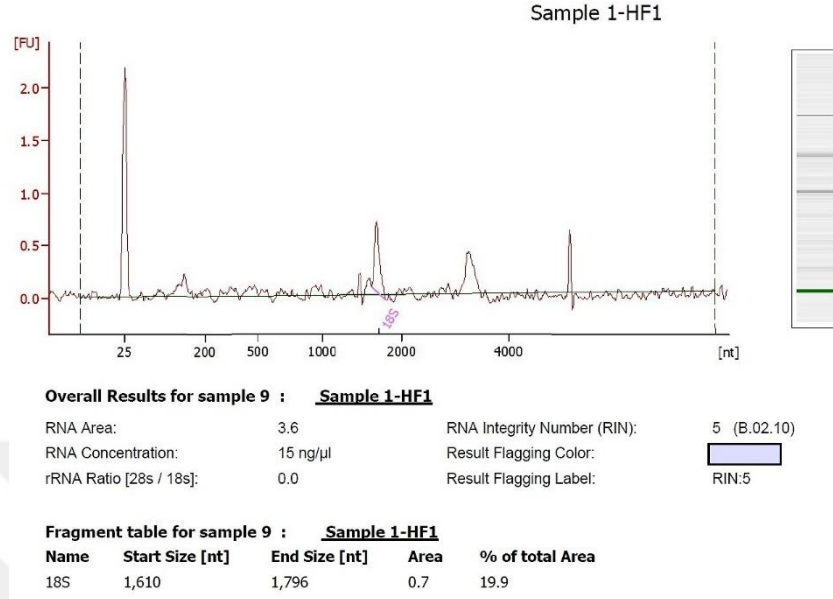
Şekil 3.11. Kontrol 4 kan RNA izolasyon değerleri

Standard Curve

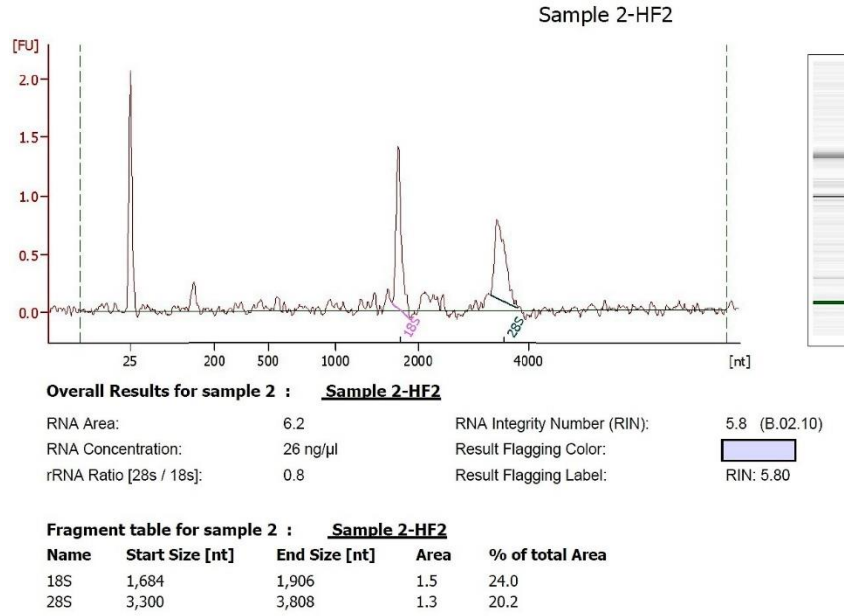


Şekil 3.12. Kan RNA izolasyon standart eğri değerleri

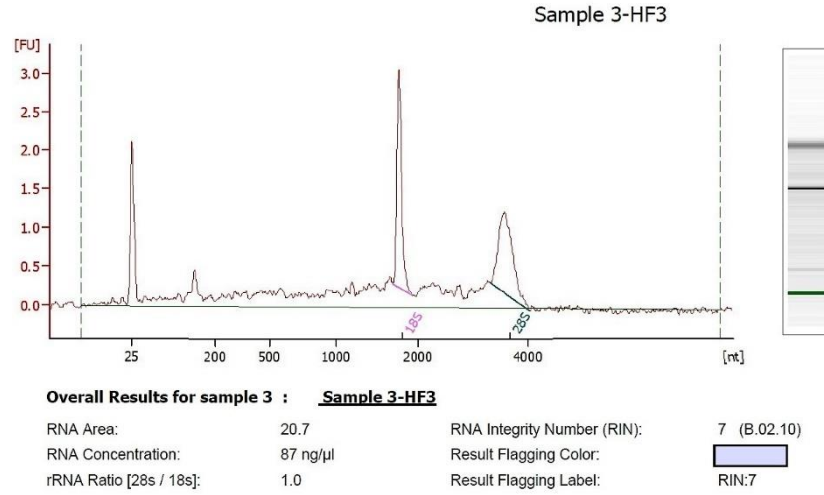
3.2.3.2 Cilt Biyopsisi RNA Elektroferogram Özeti



Şekil 3.13. Olgu 1 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri



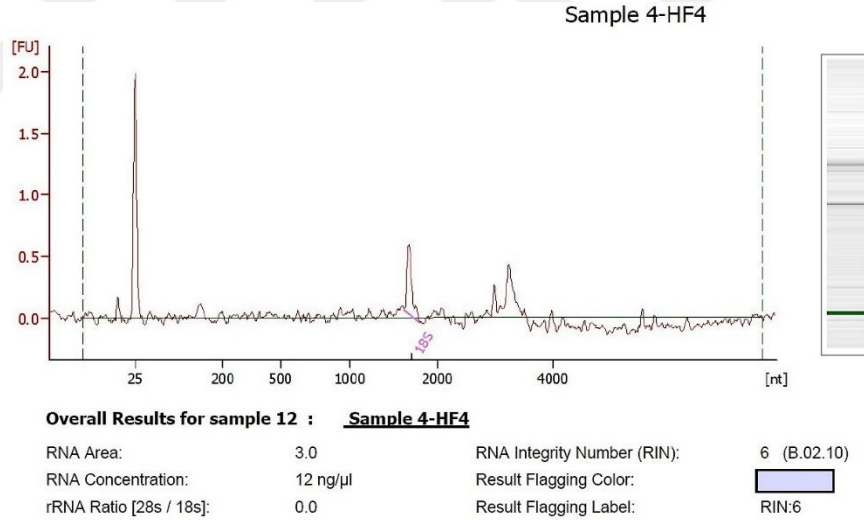
Şekil 3.14. Olgu 2 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri



Fragment table for sample 3 : Sample 3-HF3

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,694	1,923	2.7	13.1
28S	3,320	4,025	2.6	12.7

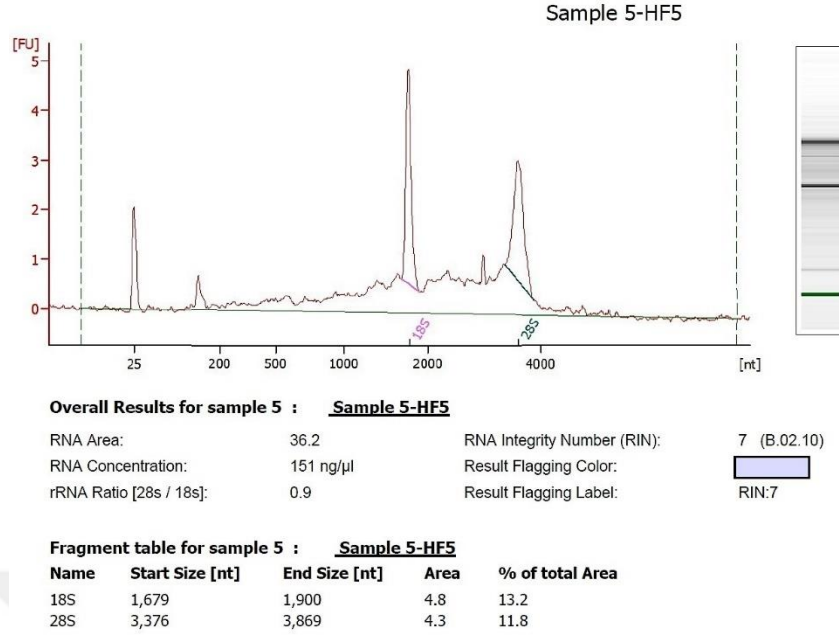
Şekil 3.15. Olgu 3 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri



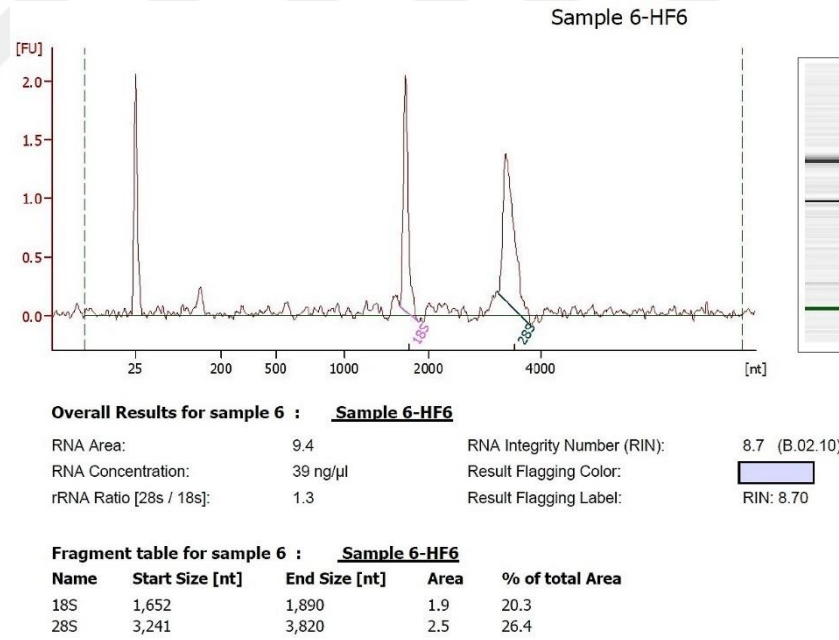
Fragment table for sample 12 : Sample 4-HF4

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,619	1,802	0.6	18.8

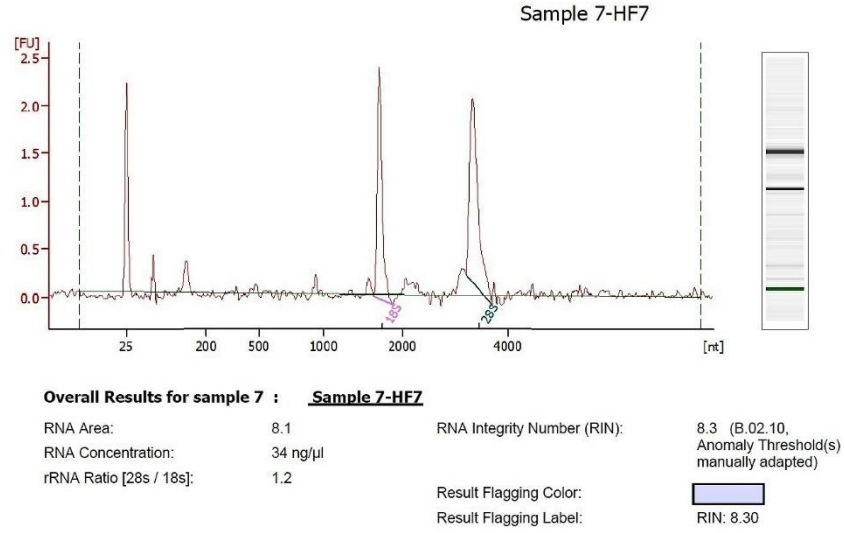
Şekil 3.16. Olgu 4 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri



Şekil 3.17. Kontrol 1 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri



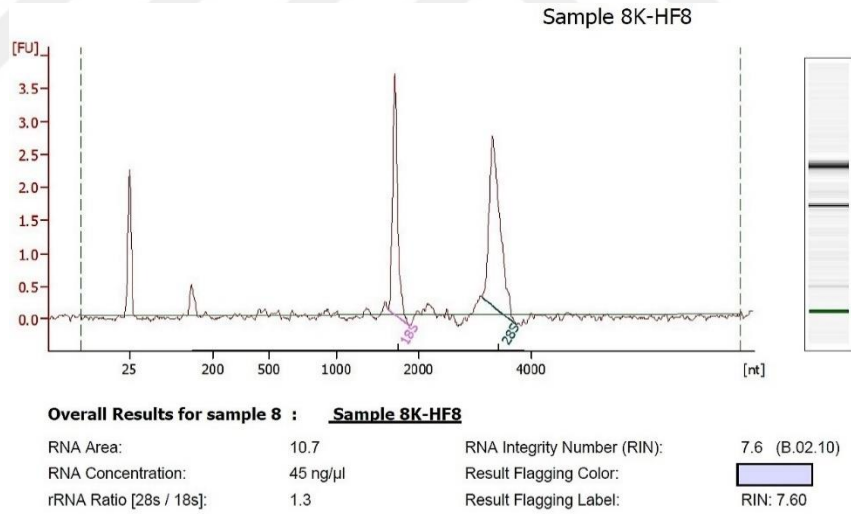
Şekil 3.18. Kontrol 2 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri



Fragment table for sample 7 : Sample 7-HF7

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,634	1,881	2.4	30.3
28S	3,210	3,708	2.9	35.7

Şekil 3.19. Kontrol 3 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri

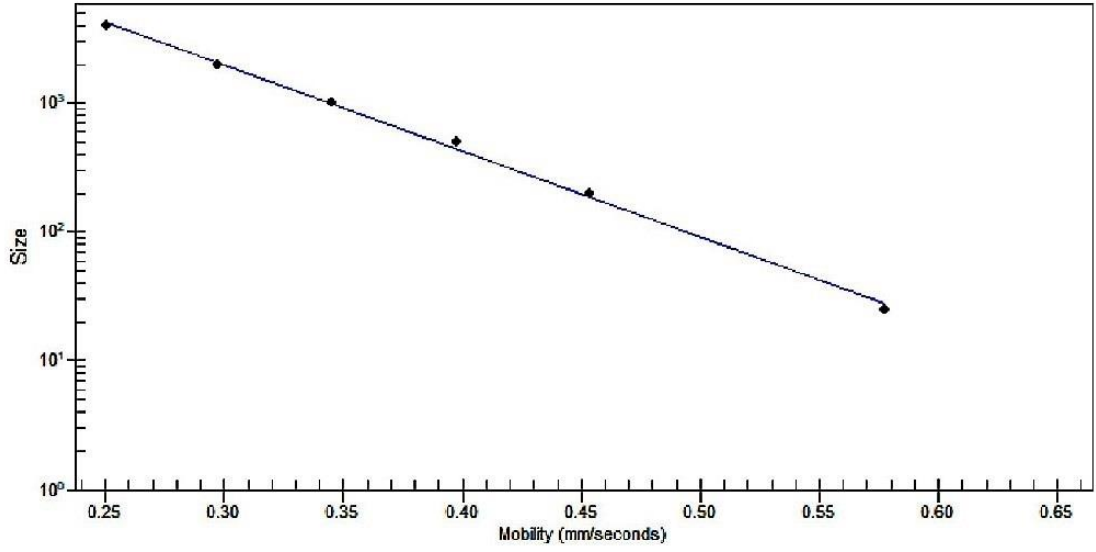


Fragment table for sample 8 : Sample 8K-HF8

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,630	1,863	3.8	35.6
28S	3,120	3,729	4.9	45.8

Şekil 3.20. Kontrol 4 cilt biyopsisi RNA izolasyon değerleri

Standard Curve



Şekil 3.21. Cilt biyopsisi örnekleri RNA izolasyon standard eğri değerleri

3.2.4 Sanger Sekans

Sanger sekans yöntemi ile, daha önce olgularda DNA düzeyinde belirlenen intronik varyasyonların RNA düzeyindeki sonuçlarının hedefli olarak ortaya koyulması amaçlandı. Bu doğrultuda ilk olarak ilgili varyantlara özgü primer tasarımı Ensemble veri tabanı, FastPCR (PrimerDigital Ltd, Finland), Primer Blast ve UCSC (*University of California Santa Cruz Genomics Institute*) açık erişimli veri tabanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Olgulardan elde edilen kan ve cilt biyopsi örneklerinden QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ve Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen total RNA'lar *ipsogen*® RT (Qiagen, Hilden, Germany) kit kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Merkez içi tasarladığımız PCR primerleri (Çizelge 3.1) ve uygun PCR programları ile ilgili bölgeler çoğaltıldı. Bölgelerin amplifiye olup olmadıkları %2'lik agaroz jel ile tespit edildi. PCR ürünlerinin pürifikasyonu için ExoSap-IT kullanıldı. Pürifikasyon işleminin ardından *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* kit v3.1 ile Forward ve Reverse nükleotid dizilerinin belirlenmesi için Sanger sekans işlemi gerçekleştirildi. Sekans polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işleminden sonra Sephadex® G-50 Fine (Ge Healthcare Bio-

Sciences AB, Uppasala, Sweden) prosedürü ile pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Saflaştırılmış örnekler Applied Biosystems ABI 3500 (Applied Biosystem, Kalifornia, ABD) Sanger sekans dizileme cihazında dizilendi. Dizileme işleminde sonra Chromas ve BioEdit programlarıyla analizleri gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Varyantlara uygun tasarlanan primer dizileri

1 ve 2 Numaralı Olgu F primeri	CAGGAATTAAGTGTGTTTCAGAAAGACAATG
1 ve 2 Numaralı Olgu R primeri	TTATTCATGTTGTTTTCATCAACCACGTCTTT
3 Numaralı Olgu F primeri	CACACATGCCAGAGATTGCTCA
3 Numaralı Olgu R primeri	GGAGAAAGTGACAGGAACTTCTATCTGCC
4 Numaralı Olgu F primeri	CAAAATGAGGAGAGTAGCAGAACTGATTATG
4 Numaralı Olgu R primeri	TTCAGTGGTTTCTTCATCAATTCCAGGCA

3.2.5 Nextera (Nextera XT DNA Library Preparation Kit)

NF1 geninin ilgili bölgelerinin NextSeq 550 Sistemi (Illumina, San Diego, CA) üzerinde dizilenmesi için hedef zenginleştirme yöntemi olan, Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) kullanıldı. Hastaların mutasyon bölgelerine özgü merkez içi dizayn edilen Primerleri ve TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) kullanılarak PCR'ler gerçekleştirildi. Tüm ampliconlar daha sonra Agencourt AMPure XP sistemi (Beckman Coulter, Pasadena, CA, ABD) kullanılarak saflaştırıldı ve başlangıç DNA kütüphanesinin miktarı, Qubit dsDNA BR Test kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) kullanılarak belirlendi. Hedefli kütüphaneler, uçları parçalamak için transpozom kullanan ve aynı anda adaptör ve barkodlama dizileri ekleyen Nextera XT hazırlama kılavuzuna (Illumina, San Diego, CA, ABD) göre hazırlanıp miks haline getirildi ve Next Seq550 (Illumina Inc., San Diego, CA, ABD) dizileme cihazı kullanılarak dizilendi. IGV 2.16.1 (<https://software.broadinstitute.org/>) üzerinde varyant arama ve analizi yapıldı.

3.2.6 Transkriptom Sekanslama

Çalışmamızda cilt biyopsisi ve kan örneklerinden izole edilen total RNA'nın mRNA transkriptom değişikliklerinin belirlenmesi için faydalanılan Illumina Stranded mRNA Prep Ligasyon kiti (Illumina Inc, San Diego, CA, ABD), total RNA'daki haberciyi

(mRNA) 384 adede kadar çift zincirli kütüphaneye dönüştürür. Oligo(dT) manyetik boncuklar, polyA kuyrukları içeren mRNA moleküllerini yakalar ve saflaştırır. Bu kit, mRNA moleküllerinin iki zincirini ayırt edebilen (stranded) bir teknolojiye sahiptir.

Saflaştırılmış mRNA parçalanır ve ters transkriptaz ve rastgele primerler kullanılarak birinci zincir tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) kopyalanır. İkinci bir iplik cDNA sentezi adımımda, dUTP, iplik özgülüğünü (stranded) elde etmek için dTTP'nin yerini alır.

Son adımlar, parça uçlarına ve bağdaştırıcılara adenin (A) ve timin (T) bazları ekler. Elde edilen ürünler saflaştırılır ve bir Illumina sistemi üzerinde dizileme için seçici olarak amplifiye edilir.

Protokol (Şekil 3.22), 25-1000 ng yüksek kaliteli toplam insan RNA'sı için optimize edilmiştir.



Şekil 3.22. Illumina tek iplikçikli mRNA hazırlama kiti (Illumina, San Diego, CA) ligasyon aşamaları

3.2.6.1 mRNA Fragmentasyon ve Pürifikasyon

Bu adımda polyA kuyukları ile haberci RNA'ları (mRNA'lar) yakalamak için oligo(dT) manyetik boncuklar kullanılmıştır. RNA fragmentlere ayrılarak cDNA sentezi için hazırlanmıştır.

3.2.6.2 mRNA Yakalama (mRNA Capture)

Her bir RNA örneği, nükleaz içermeyen ultra saf su ile 25 µl'lik bir hacimde 25-1000 ng total RNA içerecek şekilde seyreltilmiştir. Her örneğe 25 µl RPBX eklenerek pipetaj yapıldı. Thermal döngüleyicide daha önceden hazırlanan “mRNA CAP” programında (Çizelge 3.2) PCR işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2. mRNA yakalama işlemi PCR koşulları

PCR Kapak Sıcaklığı 100°C'ye ayarlandı			
65°C	4°C	23°C	23°C
5 dakika	30 saniye	5 dakika	Sabit

3.2.6.3 mRNA Elüsyonu

Protokole uygun olarak mRNA yakalama işleminin ardından pürifikasyon için örnekler manyetik standa alındı ve 2 dakika bekletilerek süpernatant atıldı. Manyetik standtan alınan her örneğe 100 µl BWB eklenerek pipetaj yapıldı ve manyetik stand üzerine tekrar yerleştirilerek 2 dakika bekletildi. Tüm süpernatant atıldı. Manyetik standtan tekrar çıkarılarak üzerlerine 25 µl ELB eklendi ve pipetaj yapıldı. Daha sonra mRNA_EL T (Çizelge 3.3) programı çalıştırılarak pcr işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. mRNA ELT PCR koşulları

PCR Kapak Sıcaklığı 100°C'ye ayarlandı	
80°C	25°C
2 dakika	Sabit

3.2.6.4 mRNA Temizleme

Temizleme işleminde kullanılacak olan Fragmentation Master Mix'i hazırlamak için nükleaz içermeyen ultra saf su (10.5 µl) ve EPH3 (10,5 µl) sarf malzemelerinden örnek başına belirtilen hacimlerde alınarak karışım hazırlandı. Her kuyucuğa 25 µl BBB solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından manyetik standta 2 dakika bekletildi ve 50 µl süpernatant atıldı. Ardından manyetik stand üzerinden örnekler indirildi ve üzerlerine 100 µl BWB eklenip pipetaj işlemi gerçekleştirildi. Örnekler manyetik standta iki dakika bekletildi ve süpernatant atıldı. Örnekler manyetik standdayken üzerlerine 19 µl Fragmentation Master Mix eklendi. Boncuklar yeniden süspanse edilene kadar pipetaj işlemi gerçekleştirildi ve örnekler oda sıcaklığında iki dakika inkübe edildi.

3.2.6.5 mRNA Fragmentasyon ve Denatürasyonu

Temizleme basamağından çıkan örnekler ilgili PCR programına (Çizelge 3.4) alındı. Ardından örnekler manyetik stant üzerine alındı ve her kuyucuktan 17 µl süpernatant yeni bir PCR plakasına aktarıldı.

Çizelge 3.4. DEN94_8 PCR programı

PCR Kapak Sıcaklığı 100°C'ye ayarlandı	
94°C	4°C
8 dakika	Sabit

3.2.6.6 cDNA İlk Zincir Sentezi

Bu adım, birinci sarmal tamamlayıcı DNA'yı (cDNA) üretmek için heksamerle hazırlanmış RNA fragmanlarını ters kopyalar. First Strand Synthesis Mix, RNA'ya bağlı senteze izin veren, DNA'ya bağımlı sentezi önlerken iplik özgüllüğünü iyileştiren Actinomycin D'yi içerir (Perocchi vd., 2007).

Protokole uygun olarak cDNA İlk Zincir Sentezi için örnek başına 9 µl FSA ve 1 µl RVT içeren First Strand Synthesis Master Mix karışımını hazırlandı. Karıştırmak için First Strand Synthesis Master Mix'i iyice pipetlendi. Her kuyucuğa 8 µl First Strand Synthesis Master Mix eklendi ve pipetaj işleminden sonra FSS programında (Çizelge 3.5) PCR işlemine tabi tutuldu.

Çizelge 3.5. FSS PCR programı

PCR Kapak Sıcaklığı 100°C'ye ayarlandı			
25°C	42°C	70°C	4°C'de
10 dakika	15 dakika	15 dakika	Sabit

3.2.6.7 cDNA İkinci Zincir Sentezi

Bu adımda RNA şablonu kaldırılır ve kör uçlu, çift sarmallı cDNA fragmanları oluşturmak için bir yedek sarmal sentezlenir. Deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine deoksiüridin trifosfat (dUTP), amplifikasyon sırasında ikinci ipliği söndürmek ve iplik spesifikliğini elde etmek için dahil edilir.

Protokolün taze hazırlanmış %80 EtOH gerektiren üç temizleme adımı olduğu için ilk önce EtOH hazırlandı.

3.2.6.8 cDNA Sentezi

PCR plakasının her kuyucuğuna 25 µl SMM eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından önceden programlanan SSS programında (Çizelge 3.6) PCR'a tabi tutuldu.

Çizelge 3.6. SSS PCR programı

PCR Kapak Sıcaklığı 40°C'ye ayarlandı	
16°C	4 °C
1 Saat	Sabit ≤ 16 Saat

3.2.6.9 cDNA'yı Temizleme

Protokole başlamadan önce AMPure XP yeniden homojenize etmek için hafifçe çalkalandı ve her kuyucuğa 90 µl AMPure XP eklendi. Boncuklar ve örnekler süspanse edilene kadar yavaşça pipetlendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra manyetik stant üzerine alındı ve 5 dakika bekletildi. 130 µl süpernatant atıldı. Boncuklar manyetik stant üzerinde her kuyucuğa 175 µl taze %80 EtOH koyularak yıkandı ve 30 saniye bekletildi. Tüm süpernatant atıldı. Yıkama işlemini ikinci kez tekrarlandı. Tüpün içerisinde kalan bütün EtOH uzaklaştırılacak şekilde tüm sıvı atıldı. Manyetik stant üzerinde 2 dakika hava ile kurumaya bırakıldı. Tüpler manyetik stanttan çıkarıldı ve her kuyucuğa 19.5 µl RSB eklendi. Boncuklar yeniden süspanse edilene kadar yavaşça pipetlendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra manyetik standı yerleştirilip 2 dakika bekletildi. Her kuyudan 17.5 µl süpernatant, boncuklar alınmayacak şekilde yeni bir PCR plakasına aktarıldı. Bu noktada örnekler -25°C ila -15°C'de 7 güne kadar saklanabilmekteydi.

3.2.6.10' Uçların Adenilasyonu

Bu adım, adaptör ligasyonu sırasında birbirlerine bağlanmalarını önlemek için kör fragmanların 3' uçlarına bir adenin (A) nükleotidi ekler. Adaptörün 3' ucundaki karşılık gelen bir timin (T) nükleotidi, adaptörün parçaya bağlanması için tamamlayıcı bir bağlantı noktası sağlar.

Bu adımda her kuyucuğa 12,5 µl ATL4 eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından ATAIL (Çizelge 3.7) programını çalıştırılarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.7. ATAIL PCR programı

PCR Kapak Sıcaklığı 100°C'ye ayarlandı		
37°C	70°C	4°C
30 dakika	5 dakika	Sabit

3.2.6.11 Bağlantı Çapaları

Bu adım, çift sarmallı cDNA fragmanlarının uçlarına çift indekslemeye hazırlamak amacıyla ön indeksleme çapalarını bağlar. Sonraki PCR amplifikasyon adımında, indeks adaptör dizileri eklenir (Şekil 3.23).

Listelenen sırayla her bir kuyucuğa (Çizelge 3.8)'deki ölçülerle RNA İndeks Çapaları eklendi. Pipetaj işleminden sonra LIG programını (Çizelge 3.9) çalıştırarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

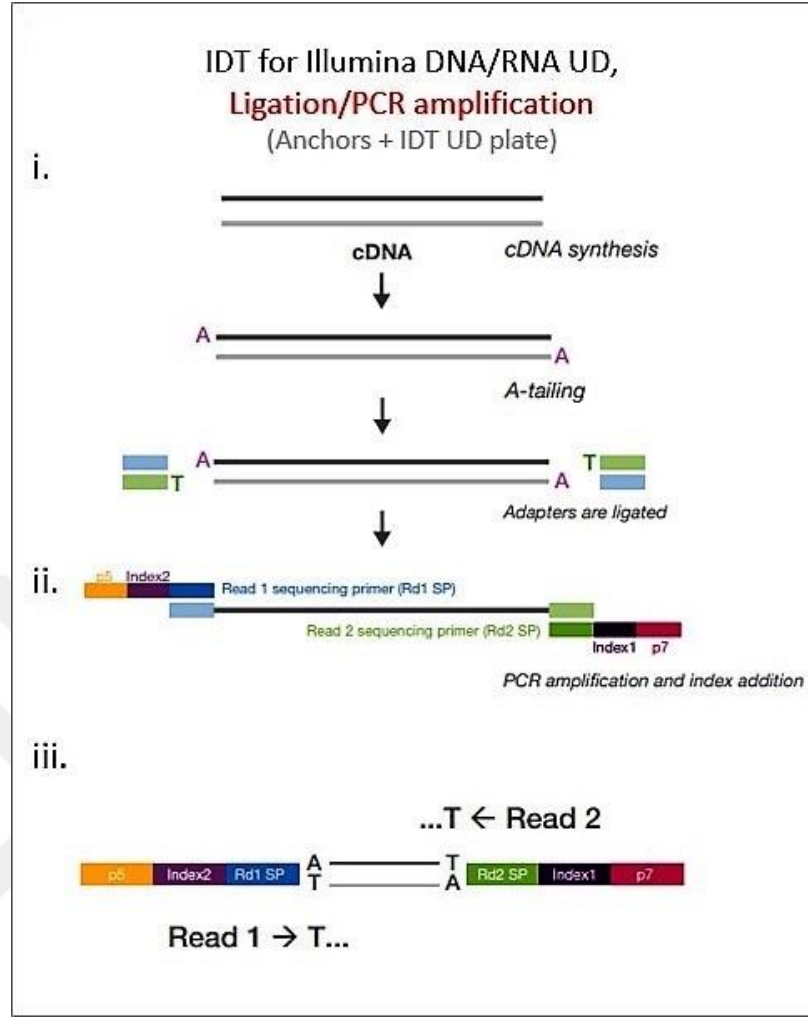
PCR işlemi bittikten sonra her kuyucuğa 5 µl STL ekleyerek pipetaj yapıldı ve ligasyon işlemi sonlandırıldı.

Çizelge 3.8. Bağlantı çapaları reaktif miktarları

Ekleme Sırası	Reaktif	Örnek Girişi Hacmi ≤ 100 ng (µl)	Örnek Girişi Hacmi > 100 ng (µl)
1	RSB	2.5	0
2	RNA Index Anchors	2.5	5
3	LIGX	2.5	2.5

Çizelge 3.9. LIG PCR programı

PCR Kapak Sıcaklığı 100°C'ye ayarlandı	
30°C	4°C
10 Dakika	Sabit



Şekil 3.23. Adaptör ligasyonu ve indeks ekleme işlemlerinin şematik gösterimi

3.2.6.12 Fragment Temizleme

Bu adım, adaptörle bağlanmış parçaları saflaştırmak için manyetik boncukları kullanır. Manyetik boncukları yeniden süspanse etmek için AMPure XP vortekslendi. Her kuyucuğa 34 µl AMPure XP eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon işlemi bittikten sonra örnekler manyetik standıya yerleştirildi ve 5 dakika bekletildi. Ardından tüm süpernatant atıldı ve üzerine 175 µl taze %80 EtOH eklendi. Tüm süpernatant atıldı ve üzerine tekrar 175 µl taze %80 EtOH eklendi, sonrasında tüm EtOH atıldı. Örnekler manyetik standı üzerinde 2 dakika havada kurutuldu. Manyetik standtan çıkarılan örnekler 22 µl RSB eklendi ve pipetaj yapıldı.

Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon sonrasında örnekler manyetik stantta 2 dakika bekletildi. 20 µl süpernatant yeni bir PCR plakasının kuyucuğuna aktarıldı. Bu noktada örnekler -25°C ila -15°C'de 7 güne kadar saklanabilmektedir.

3.2.6.13 Kütüphanenin Çoğaltılması

Bu adım, çapa ile bağlanmış DNA parçalarını seçici olarak amplifiye etmek ve küme üretimi (cluster generation) için indeksler ve primer dizileri eklemek amacıyla PCR'yi kullanır. PCR işleminden sonra çift dizinli kütüphaneleri saflaştırmak için manyetik boncukların kullanıldığı yıkama işlemi gerçekleştirilir. Ortaya çıkan ürün, her iki ucunda adaptörler bulunan çift dizinli bir kütüphanedir.

Protokolün bu aşamasında her kuyu için yeni bir pipet ucu kullanarak, kullanılması planlanan indeksler aşağıdaki hacimleri listelenen sırayla PCR plakasının ilgili kuyucuklarına eklendi.

UDP0XXX dizin adaptör plakasından PCR plakasına aktarıldı

- UDP0XXX (10 µl)

- EPM (20 µl)

Karıştırmak için pipetaj yapıldı ve önceden programlanmış PCR cihazına yerleştirildi.

- Kapak ön ısıtma seçeneğini seçildi ve 100°C'ye ayarlandı.

98°C 30 saniye

- 15 döngü;

- 10 saniye için 98°C

- 30 saniye için 60°C

- 30 saniye için 72°C

- 5 dakika için 72°C

- 4°C'de ≤ 16 saat

Çizelge 3.10. Örnek giriş miktarları ve PCR döngü sayıları

Giriş Miktarı (ng)	PCR döngü sayısı (x)
25	15
100	13
1000	10

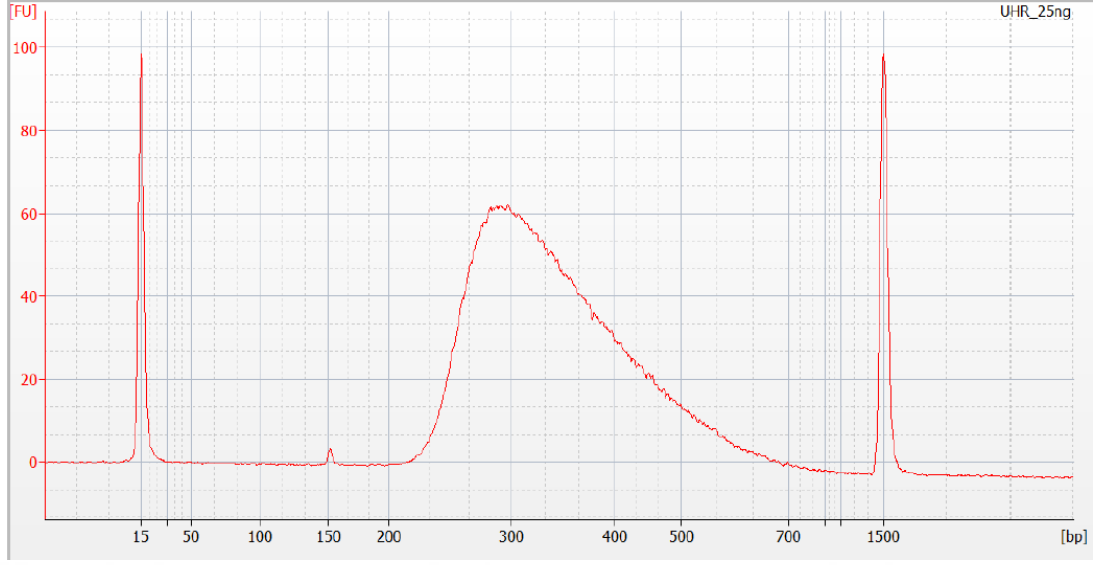
3.2.6.14 Kütüphanenin Temizlenmesi

Bu adımda çift zincirli kütüphaneleri saflaştırmak için manyetik boncuklar kullanıldı. AMPure XP'yi yeniden süspanse etmek için vortekslendi ve her kuyucuğa 50 µl AMPure XP eklendi. Boncuklar ve örneklerden oluşan karışım iyice pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüpler manyetik standı yerleştirildi ve 5 dakika inkübe edildi. 90 µl süpernatantı atıldı. Boncuklar manyetik standı üzerinde 175 µl taze %80 EtOH ile yıkandı ve 30 saniye bekletildikten sonra tüm süpernatant atıldı. Aynı işlem ikinci kez tekrarlandı ve tüm EtOH'ü attıktan sonra manyetik standı üzerinde 2 dakika boncuklar kurutuldu. Ardından örnekler manyetik standıdan çıkarıldı ve her kuyucuğa 17 µl RSB ekleyene pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon işleminden sonra manyetik standı örnekler yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi. Her bir kuyucuktan 15 µl süpernatant yeni bir PCR plakasına aktarıldı. Örnekler bu aşamada 30 güne kadar -25°C ila -15°C'de saklanabilmekteydi.

3.2.7 Kütüphane Kontrolü

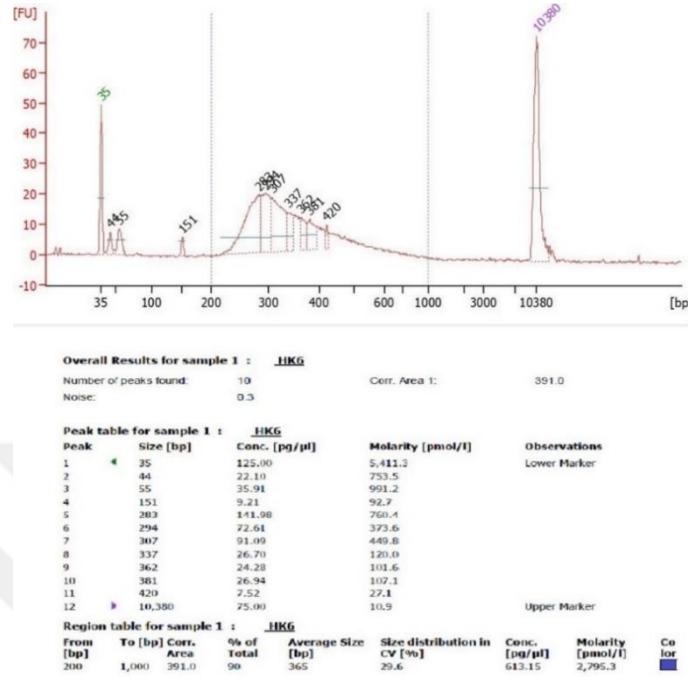
Bu aşamada hazırladığımız kütüphanelerin son konsantrasyon ve kalite değerleri üç farklı cihaz üzerinde ölçüldü. İlk ölçüm cihazımız olan Qiagen QIAxcel (Qiagen, Hilden, Germany) cihazında QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak ölçüm yapıldı. Ölçüm aşamasında referans olarak QX DNA Size Marker (Qiagen, Hilden, Germany) 100bp-2.5kb marker kullanıldı. Qiagen- QIAxcel cihazı analizi sonucunda net bir bant görüntüsü alamadığımız kütüphane örnekleri ikinci ölçüm platformumuz olan Thermo-Qubit 4 cihazı aracılığıyla Qubit® dsDNA HS Assay Kit kullanılarak saptandı (Çizelge 3.11-3.12). Alınan sonuçların ikinci bir cihazda değerlendirilmesi için bazı örnekler son ölçüm platformumuz olan Agilent 2100 Biyoanalizör cihazında, DNA 1000 Kit'i kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar (Şekil 3.25 ve Şekil 3.28) arasında belirtildi.

Denatüre olmamış RNA örnekleri için ortalama parça uzunluğu ~300–400 bp'dir. Beklenen ekleme boyutu ~160 bp'dir. Yirmi beş ng Universal İnsan Referansı (UHR) RNA girişinden oluşturulan kütüphane için (Şekil 3.24)'de örnek belirtilmiştir.

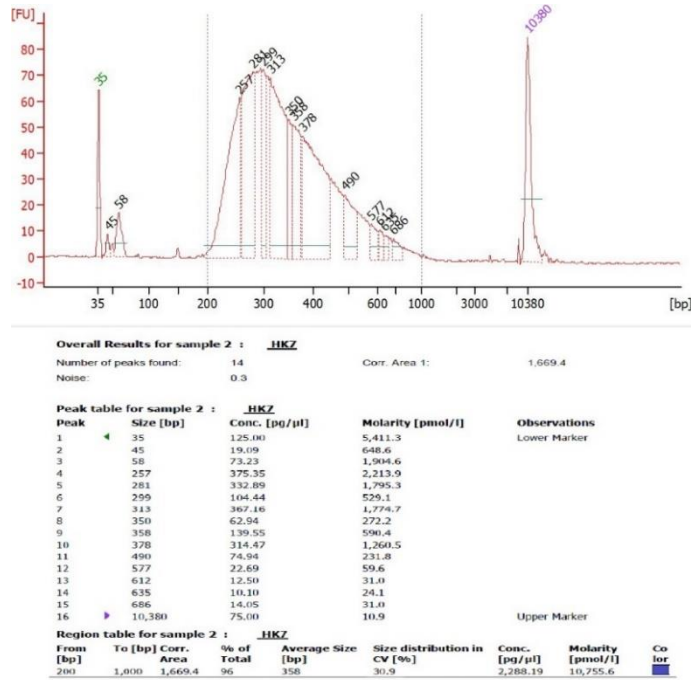


Şekil 3.24. Biyoanalizör ölçümünde 25 ng Evrensel İnsan Referansı (UHR) görüntüsü

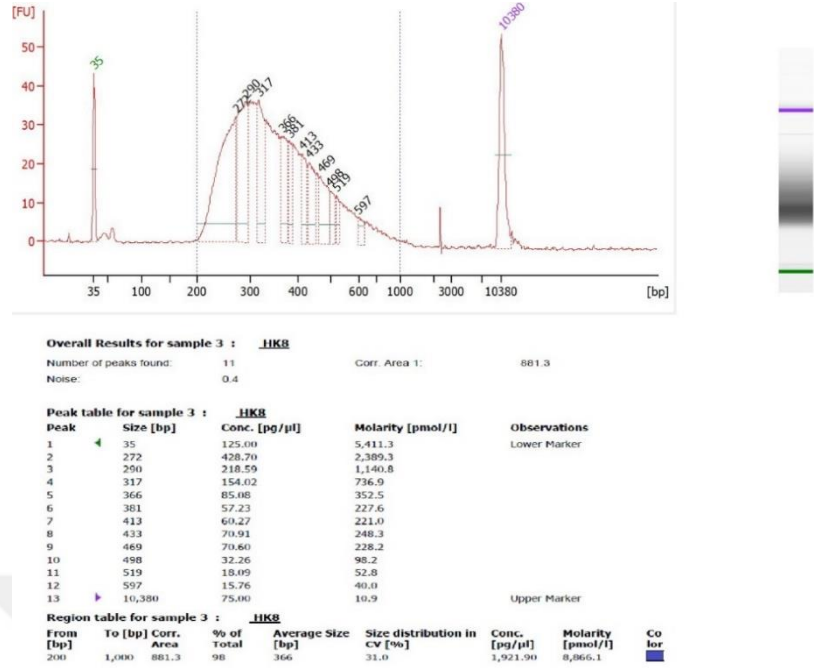
3.2.7.1 Kütüphanelerin Biyoanalizör ile Ölçüm Değerleri



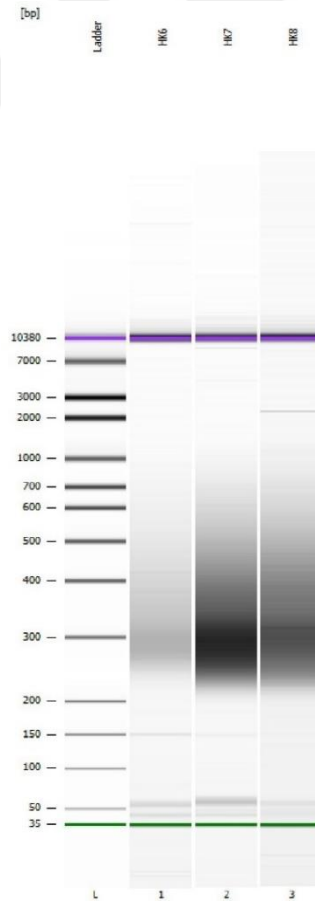
Şekil 3.25. Kontrol 2'nin kan biyoanalizör ölçüm değeri



Şekil 3.26. Kontrol 3'ün kan biyoanalizör ölçüm değeri



Şekil 3.27. Kontrol 4'ün kan biyoanalizör ölçüm değeri



3.2.8 Kütüphane Başlangıç Konsantrasyonu Hazırlama

Bu adımda kütüphaneler Illumina NextSeq 550 (Illumina Inc. San Diego, CA, ABD) sistemi için başlangıç konsantrasyonuna seyreltildi (Çizelge 3.13, Çizelge 3.14). Başlangıç konsantrasyonuna seyreltikten sonra, kütüphaneler denatüre edilmeye ve nihai yükleme konsantrasyonuna seyreltilmeye hazırıldı (Çizelge 3.15).

1. Başlangıç konsantrasyonu hazırlarken ilk adım olarak kütüphanenin molarite değeri hesaplandı (Şekil 3.29).

$$\frac{ng/\mu l}{660 g/mol \times average library size} \times 10^6 = Molarity (nM)$$

Şekil 3.29. Molarite hesaplama

2. Molarite değerini kullanarak, kütüphanelerin istenen başlangıç konsantrasyonuna seyreltilmesi için gereken RSB ve kütüphane hacimlerini hesaplandı.
3. 1 nM'e getirdiğimiz kütüphanelerden 5'er mikrolitre alındı.

Çizelge 3.11. Hasta ve kontrol örneklerinden izole edilen RNA'dan elde edilen transkriptom kütüphanelerinin konsantrasyon değerleri

Cilt Biyopsisi Örneklerinden İzole Edilen Rna Konsantrasyonları					
	NanoDrop-Başlangıç	BiyoAnalizör-Başlangıç			Qubit-Final (Kütüphane)
Olgular	Konsantrasyon	RIN	Area	Konsantrasyon	Konsantrasyon
HF1	17,7 ng/μl	5	3,6	15 ng/μl	2,01 ng/μl
HF2	47,3 ng/μl	5,8	6,2	26 ng/μl	6,05 ng/μl
HF3	49 ng/μl	7	20,7	87 ng/μl	0,86 ng/μl
HF4	12,6 ng/μl	6	3	12 ng/μl	1,74 ng/μl
KF5	78,8 ng/μl	7	36,2	151 ng/μl	0,88 ng/μl
KF6	32,5 ng/μl	8,7	9,4	39 ng/μl	0,63 ng/μl
KF7	34 ng/μl	8,3	8,1	34 ng/μl	0,66 ng/μl
KF8	61,9 ng/μl	7,6	10,7	45 ng/μl	1,54 ng/μl

Çizelge 3.12. Hasta ve kontrollerin periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'dan elde edilen transkriptom kütüphanelerinin konsantrasyon değerleri

Kan Örneklerinden İzole Edilen Rna Konsantrasyonları					
	NanoDrop-Başlangıç	BiyoAnalizör-Başlangıç			Qubit-Final (Kütüphane)
Olgular	Konsantrasyon	RIN	Area	Konsantrasyon	Konsantrasyon
HK1	48,4 ng/μl	7,3	10	141 ng/μl	2,46 ng/μl
HK2	56 ng/μl	7,2	8	113 ng/μl	3,99 ng/μl
HK3	56,1 ng/μl	6,4	6,7	94 ng/μl	2,81 ng/μl
HK4	13,9 ng/μl	2,7	3	42 ng/μl	0,14 ng/μl
KK5	183 ng/μl	6,8	33,6	473ng/μl	2,40 ng/μl
KK6	141 ng/μl	6,6	44,2	621 ng/μl	0,63 ng/μl
KK7	178 ng/μl	6,8	31,7	446 ng/μl	1,70 ng/μl
KK8	131,6 ng/μl	7,3	13,9	196 ng/μl	2,38 ng/μl

Çizelge 3.13. Cilt biyopsisi örneklerinden izole edilen RNA'dan üretilen hasta ve kontrol transkriptom kütüphanelerinin dilüsyonları

Olgular	NG/μL	NM	Kütüphane (μl)	Su (μl)	Toplam Hacim	NM Değeri
HF1	2.01	8.70	4.00	4.70	8.70	4,00
HF2	6.05	26.19	4.00	22.19	26.19	4,00
HF3	0.86	3.72	4.00	3.45	7.45	2,00
HF4	1.74	7.53	4.00	3.53	7.53	4,00
KF5	0.88	3.81	4.00	3.62	7.62	2,00
KF6	0.63	2.73	4.00	1.45	5.45	2,00
KF7	0.66	2.86	4.00	1.71	5.71	2,00
KF8	1.54	6.67	4.00	2.67	6.67	4,00

Çizelge 3.14. Kan hasta örneklerinden izole edilen RNA'dan üretilen hasta ve kontrol transkriptom kütüphanelerinin dilüsyonları

Olgular	NG/μL	NM	Kütüphane (μl)	Su (μl)	Toplam Hacim	NM Değeri
HK1	2.46	10.65	4	6.65	10.65	4.00
HK2	3.99	17.27	4	13.27	17.27	4.00
HK3	2.81	12.16	4	8.16	12.16	4.00
HK4	0.14	0.61	0.606060606	0	0.61	2.00
KK5	2.4	10.39	4	6.39	10.39	4.00
KK6	0.63	2.73	4,00	1.45	5.45	2.00
KK7	1.7	7.36	4	3.36	7.36	4.00
KK8	2.38	10.30	4	6.30	10.30	4.00

Çizelge 3.15. Sekans sistemlerine göre başlangıç ve son yükleme konsantrasyonları

Sekans Sistemi	Başlangıç Konsantrasyonu (nM)	Son Yükleme Konsantrasyonu (pM)
NextSeq 550-NextSeq500	1	1.1-1.4
NextSeq1000 -NextSeq2000	2	750
NovaSeq6000	0.5	100

3.2.9 Kütüphanelerin Yüklenmesi

3.2.9.1 Kütüphane denatürasyonu ve dilüsyonu

1ml 0.2 N NaOH dilüsyonu hazırlamak için aşağıdaki maddeler bir tüpte birleştirildi.

1. 800 µl su
2. 200 µl 1.0 N NaOH
3. 1 ml 0.2 N NaOH elde edildi

HT1 Hazırlama

1. HT1'i -25°C'den -15°C'ye çıkarıldı ve sonrasında sıcaklığında tamamen çözülde.
2. Denatüre kütüphaneler seyreltmeye hazır olana kadar 2°C ila 8°C'de saklandı.

RSB Hazırlama

1. 1 RSB tüpü -25°C ila -15°C saklama alanından çıkarıp ve oda sıcaklığında eritildi.
2. Kütüphaneler seyreltmeye hazır olana kadar çözölmüş RSB 2°C ila 8°C'de muhafaza edildi.
3. Çizelge 3.16'daki kütüphane hacimleri ve yeni seyreltilmiş 0,2 N NaOH bir tüpte birleştirildi.

Çizelge 3.16. Kütüphane başlangıç konsantrasyonları ve hacimleri

Kütüphane Başlangıç Konsantrasyonu	Kütüphane	0.2N NaOH
4nM	5 µl	5 µl
2nM	10 µl	10 µl
1nM	20 µl	20 µl
0.5nM	40 µl	40 µl

4. Kısa bir süre vortekslendi ve ardından 280 x g'de 1 dakika santrifüjlendi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
6. Çizelge 3.17'de belirtilen hacimde 200 mM Tris-HCl, pH 7 eklendi. Vortekslendi ve ardından 280 x g'de 1 dakika santrifüjlendi.

Çizelge 3.17. Kütüphane konsantrasyonlarına göre eklenecek 200 mM Tris-HCl miktarları

Starting Library Concentration	200mM Tris-HCl, pH7
4 nM	5 µl
2nM	10 µl
1nM	20 µl
0.5nM	40 µl

3.2.9.2. Denatüre Kütüphanelerin 20 pM'a Seyreltilmesi

1. Çizelge 3.18'de belirtilen hacimde önceden soğutulmuş HT1 denatüre kütüphanelere eklendi. Sonuç olarak 20 pM'lık denatüre bir kütüphane elde edildi.
2. Kısaca vortekslendi ve ardından 280 × g'de 1 dakika santrifüjlendi.
3. Son dilüsyona devam etmeye hazır olana kadar 20 pM kütüphane buz üzerinde tutuldu.

Çizelge 3.18. Kütüphanelerin 20 pM'a Seyreltilmesi için kullanılan çözünmüş HT1 miktarı

Başlangıç Kütüphane Konsantrasyonu	HT1
4 nM	985 µl
2nM	970 µl
1nM	940 µl
0.5nM	880 µl

3.2.9.2 Kütüphanelerin Yükleme Konsantrasyonuna Seyreltilmesi

Çalışmamızda Nextseq 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles), (Illumina Inc., San Diego, CA, ABD) kullanıldığı için bundan sonraki adımlar bu kite göre belirlendi.

1. Denatüre 20 pM kütüphane solüsyonunu aşağıdaki gibi 1,8 pM'a seyreltildi.
 - Denatüre kütüphane solüsyonu (117 µl)
 - Önceden soğutulmuş HT1 (1183 µl)
 - Toplam hacmi 1.3 ml olan 1.8 pM'lük havuz kartuşun örnek yükleme kısmına yüklendi.

3.2.10 Yeni Nesil RNA Dizileme ve Diferansiyel Gen İfadesi Analizi İş Akışı

Ham verilerin analizi CLC Genomics Server 22.0.2 (QIAGEN, Aarhus, Denmark, <https://digitalinsights.qiagen.com>) sunucusu içerisine yüklü RNA Dizileme ve Diferansiyel Gen İfadesi Analizi İş Akışı (*RNA-Seq and Differential Gene Expression Analysis Workflow*) kullanılarak yapıldı.

Öncelikle ham dizileme verileri (FASTQ) kırılarak (*trimming*), dizi hizalamasına hazır hale getirildi. Kırılma için kalite skoru 0.05 olarak belirlendi. Kırılacak adaptör dizileri CLC Genomics Server yazılımı tarafından otomatik olarak algılanmaktadır. Kırılmış diziler öncelikle hg19 insan referans genomuna göre hizalandı. Gen, mRNA, kodlayan dizi (CDS) bilgileri için referans olarak Ensembl hg19/v87 kullanıldı. Gen ontolojisi (goa human) bilgisi için 16.05.2022 tarihinde yayınlanan hg19 gen ontoloji bilgileri çekildi.

Dizi hizalama algoritması olarak Karma Tablo/Komut çizelgesi (Hash Table) yöntemi kullanıldı. Hizalama matrisi oluşturulurken aşağıdaki skarlama parametreleri belirlendi:

- Eşleşmeme ceza puanı (*Mismatch cost*): 2
- Nükleotid eklenme puanı (*Insertion cost*): 3
- Nükleotid silinme puanı (*Deletion cost*): 3
- Dizi uzunluk fraksiyonu (*Length fraction*): 0.8
- Dizi benzerlik fraksiyonu (*Similarity fraction*): 0.8

Bir dizi okuması, genomda 10'dan daha fazla bölgeye hizalanmışsa analize dahil edilmedi. Gen ifadesi değerleri dizi okumalarının tamamı kullanılarak hesaplandı. Füzyon gen tabloları hesaplanırken en az 5 dizi okuması kullanıldı.

Yeni nesil dizilemede sonucu elde edilen dizi okumalarının kapsama derinliğinden gen ifadelerinin hesaplanmasını sağlayan RPKM (*Reads per kilobase of transcript per Million reads mapped*) değerleri 5'in altında olan bölgeler analize dahil edilmedi. Gen ekspresyonu ölçümünde katsayı değişimi (fold change) için alt sınır 1,5 olarak belirlendi. Anlamlılık ölçütü olan p değeri sınırı 0,05 olarak belirlenirken düzeltme/standardizasyon yöntemi olarak FDR (*False discovery rate*) kullanıldı.

Yazılım içerisinde bütün transkriptom RNA-Seq (Whole Transcriptome RNA-Seq) seçeneği seçilerek gen ifadelerinin hesaplanması için global TMM normalizasyon yöntemi kullanıldı (https://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/1000/index.php?manual=TMM_Normalization.html).

Ortalama gen ifadesi değerlerinin standardizasyonu için FDR (*False Discovery Rate*) düzeltmesi uygulandı. Örneklerin yazılıma tanıtılması için Çizelge 3.19'daki metaveri/üst veri (*metadata*) tablosu hazırlandı:

Çizelge 3. 19. Metaveri/üst veri (*metadata*) tablosu HF: Olgu Fibroblast, HK: Olgu Kan, KF: Kontrol Fibroblast, KK: Kontrol Kan

ID	Group
HF1_S1 (paired)	HF
HF2_S2 (paired)	HF
HF3_S3 (paired)	HF
HF4_S4 (paired)	HF
KF5_S5 (paired)	KF
KF6_S6 (paired)	KF
KF7_S7 (paired)	KF
KF8_S8 (paired)	KF
HK1_S9 (paired)	HK
HK2_S10 (paired)	HK
HK3_S11 (paired)	HK
HK4_S12 (paired)	HK
KK5_S13 (paired)	KK
KK6_S14 (paired)	KK
KK7_S15 (paired)	KK
KK8_S16 (paired)	KK

Gen ifadesi değişikliklerini içeren tablolar Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN IPA (QIAGEN Inc, <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) yazılımına yüklendi. Karşılaştırmaların yapıldığı gruplar řu şekildedir: Olgu Fibroblast (HF) – Kontrol Fibroblast (KF) ve Olgu Kan (HK) – Kontrol Kan (KK). Veriler, gen ifadesi değişikliklerinden anlamlı biyolojik yolakların belirlenmesini sağlayan IPA yazılımına yüklenirken standart (düzeltilmemiş) p değeri ($\leq 0,05$) ve katsayı değişimleri kullanıldı. Ortalama gen ifadesi değerleri ≤ 10 olan gen ve transkriptler IPA’e yüklenmedi.



BÖLÜM 4

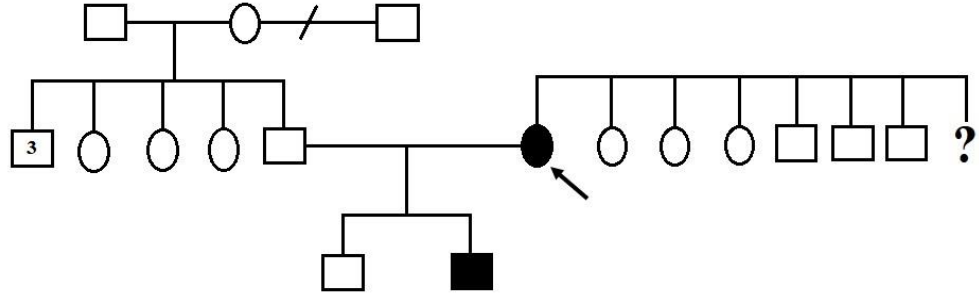
BULGULAR

4.1 Olguların Klinik Bulguları ve DNA-Temelli Genetik Analiz Sonuçları

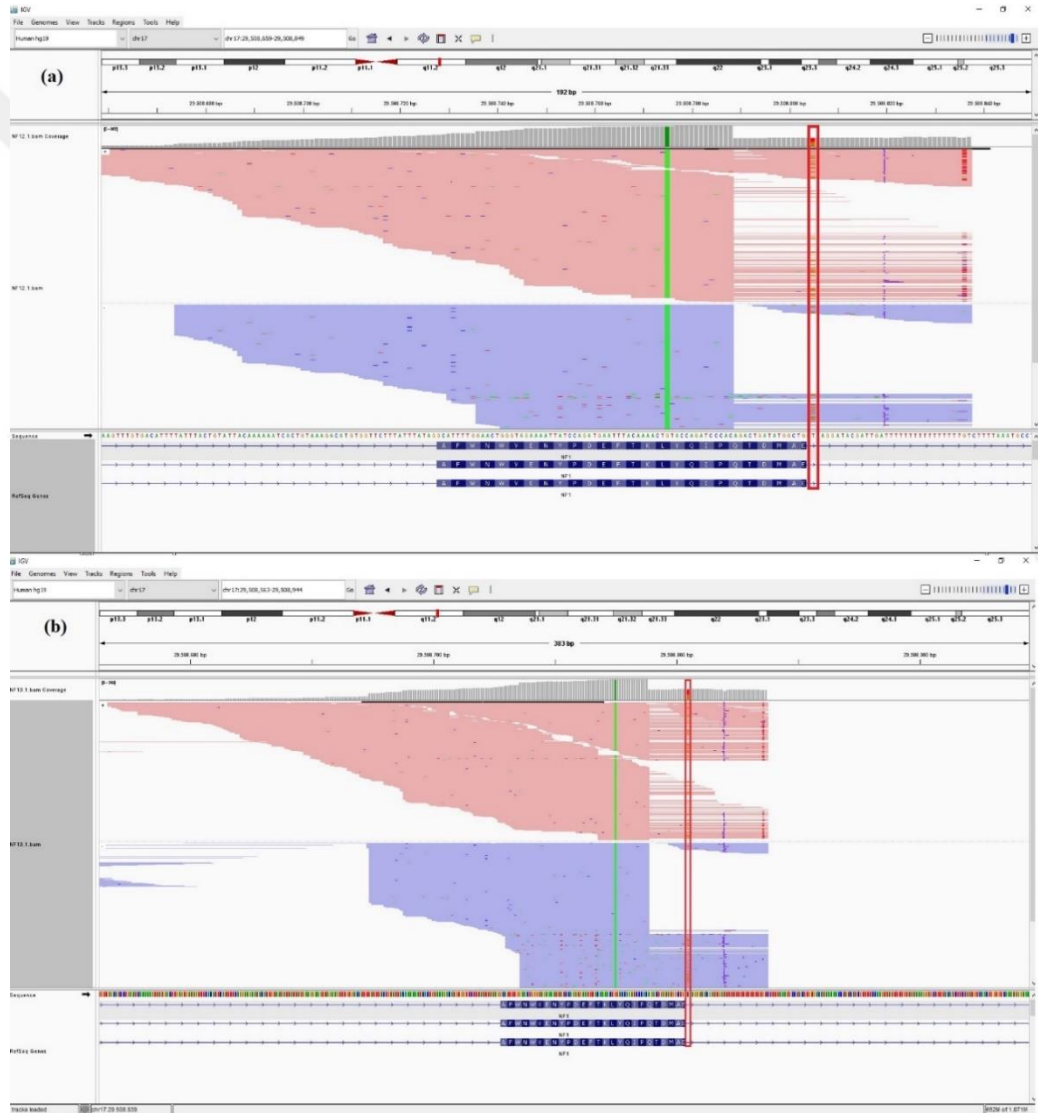
Çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine Nörofibromatozis Tip 1 ön tanısı ile gelen ve periferik kandan izole edilen DNA örneklerinde gerçekleştirilen genetik analiz sonucunda kırılma bölgesi varyasyonları belirlenen üç farklı aileden ikisi erkek ikisi kadın 4 hasta dahil edildi (Çizelge 4.1). Birinci olgumuz ile ikinci olgumuz aynı aileye mensup olan anne ve oğuldu. Üçüncü olgumuz da ailesel bir Nörofibromatozis olgusu idi ancak diğer olgular ile akrabalığı yoktu. Dördüncü olgumuz de novo bir nörofibromatozis Tip 1 olgusuydu.

4.1.1 Olgu 1 ve Olgu 2

Annesinde klinik olarak nörofibromatozis tanısı kendisinde de aksiller çillenme ve cafe-au-lait lekeleri olan 13 yaşındaki erkek olgu (Çalışmamızdaki Olgu 1) 16.08.2018 tarihinde *NF1* geni mutasyon analizi için merkezimize yönlendirilmişti (Olgu 1 ve Olgu 2'ye ait pedigrî Şekil 4.1'de belirtildi). 36 yaşındaki annenin (Çalışmamızdaki Olgu 2) yaygın nörofibromlar ve cafe au lait lekeleri ile bilateral Lisch nodülü mevcuttu. Yapılan genetik analiz sonucunda her iki olguda da 2018 itibarıyla klinik önemi bilinmeyen NM_001042492.3 (*NF1*):c.730+2T>G kırılma bölgesi varyasyonu belirlenmişti (Şekil 4.2). Bu tez çalışmasının planlandığı sırada ClinVar veritabanında çelişkili girdileri nedeniyle yine klinik önemi bilinmeyen varyasyon kategorisinde yer almaktaydı ve hakkında yapılmış fonksiyonel çalışma bulunmamaktaydı.



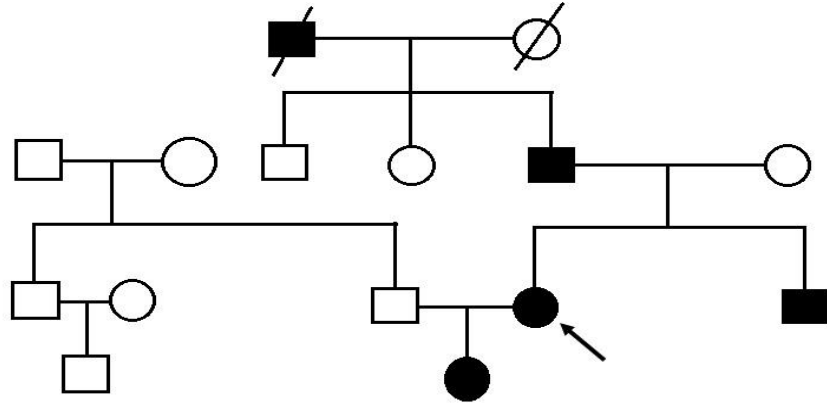
Şekil 4.1. Olgu 1 ve Olgu 2'ye ait pedigr



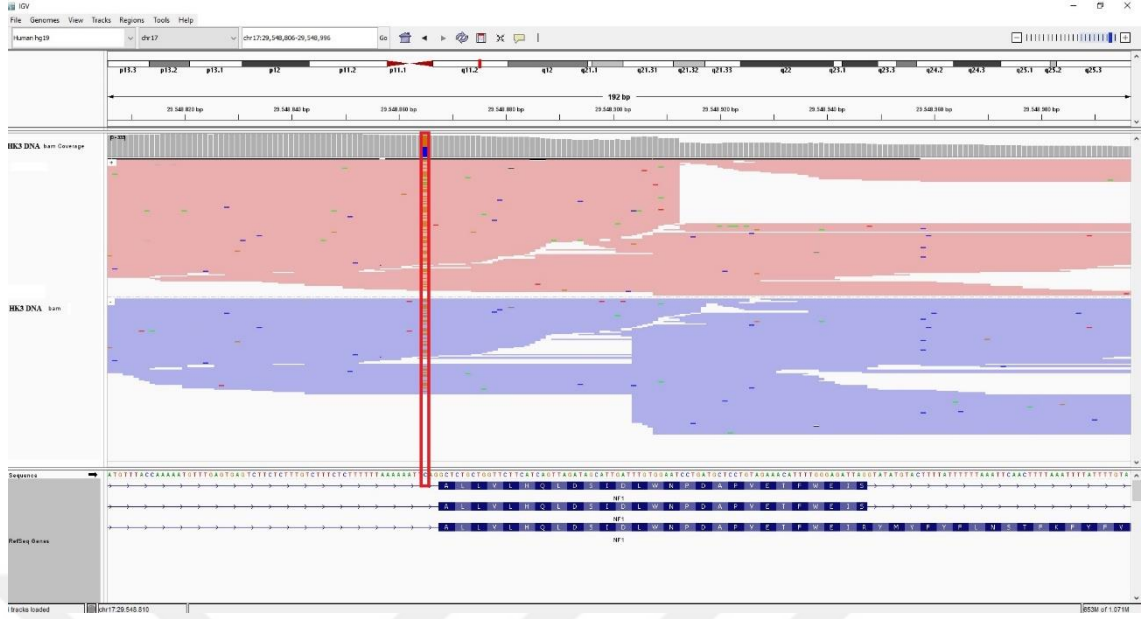
Şekil 4.2. Olgu1 ve 2'nin genomik DNA'da gerçekleştirilen *NF1* Yeni Nesil Dizi Analizi sonucu (a: olgu 1, b: olgu 2. Heterozigot NM_001042492.3 (*NF1*):c.730+2T>G varyasyonu kutucuk içerisinde belirtilmiştir.

4.1.2 Olgu 3

Kendisi ve kızının vücudunda çok sayıda cafe-au-lait lekeleri, kızında koltuk altı ve kasık bölgesinde çillenme ve Lisch nodülü nedeniyle genetik analiz yapılan 29 yaşındaki kadın olguda aynı zamanda epilepsi tanısı mevcuttu. Olgudan alınan öyküde baba ve dedesinde çok sayıda nörofibromlar olduğu bilgisi edinildi (Şekil 4.3). Periferik kan örneğinden izole edilen DNA’da yapılan genetik analiz sonucunda olguda ve kızında rapor tarihi itibarıyla (06.06.2018) klinik önemi bilinmeyen ancak daha sonraki değerlendirmelerimiz sonrasında olası patojenik olarak yeniden klasifiye ettiğimiz heterozigot NM_001042492.3(NF1):c.1642-3C>G varyasyonu belirlenmişti (Şekil 4.4). Haziran 2020 tarihli bir çalışmada puromisin ile muamele edilen mutant lenfosit kültürlerinde ekzon atlattığı literatürde bildirilen bu varyasyonun cilt biyopsisi örneklerinde fonksiyonel çalışması bulunmamaktaydı.



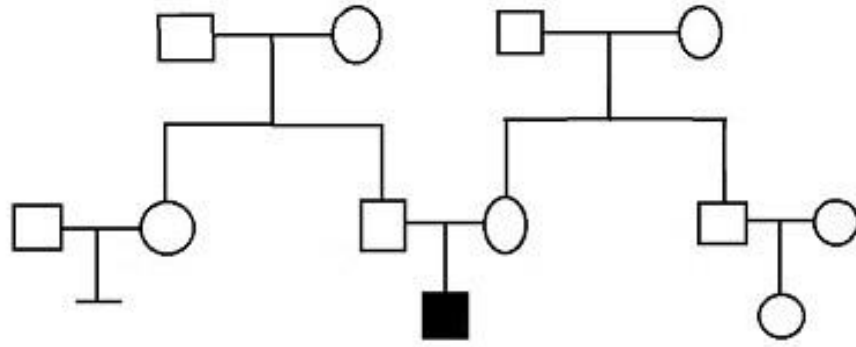
Şekil 4.3. Olgu 3’e ait pedigr



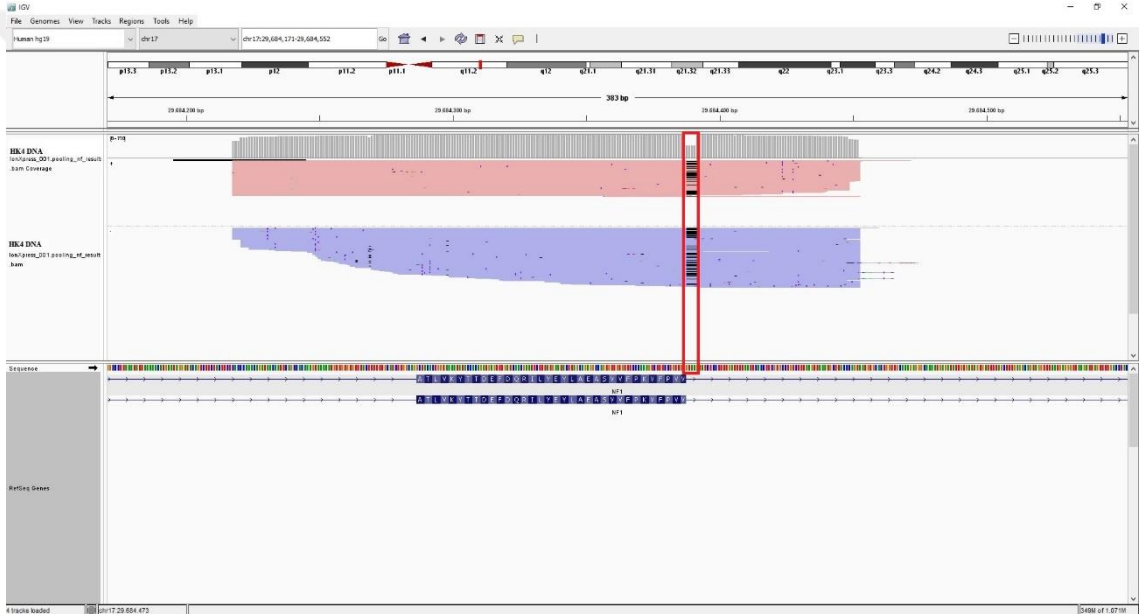
Şekil 4.4. Olgu 3'e ait genomik DNA'da gerçekleştirilen *NF1* Yeni Nesil Dizi Analizi sonucu IGV görüntüsü. Heterozigot NM_001042492.3(NF1):c.1642-3C>G varyasyonu kırmızı kutu içerisinde belirtilmiştir.

4.1.3 Olgu 4

Dört numaralı olgumuz aralarında akrabalık bağı bulunmayan bir çiftin zamanında sezaryen ile doğan tek erkek çocuklarıydı. On dört aylıkken yürümeye başlamış ve 12 aylıkken kelime kullanmaya başlamıştı. Nöbet öyküsü bulunmamaktaydı. Beş yaşındayken ensede şişlik farkedilmiş ancak tanı konulamamıştı. Saçlı derinin sağ tarafında, sağ kolda ve kulak arkasında birkaç tane nörofibrom mevcuttu. Vücudunda çok sayıda sütlü kahverengi lekeler vardı. Göz muayenesi ve işitme muayenesi normaldi. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu tanısı mevcuttu. Yeni Nesil Dizi Analizi sonucunda *NF1* geni 53. Ekzon bitiminde yer alan kırpılma bölgesinde dört bazlık heterozigot delesyon (NM_001042492.3 c.7970+4_7970+7del) belirlendi (Şekil 4.6). NM_001042492.3 c.7970+4_7970+7del varyasyonu rapor tarihi itibarıyla klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırdığımız (14.06.2016), literatürde ve veritabanlarında bildirilmemiş bir varyasyondur. Yapılan segregasyon analizi sonucunda varyasyonun olguda de novo olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5.Olgu 4'e ait pedigrri



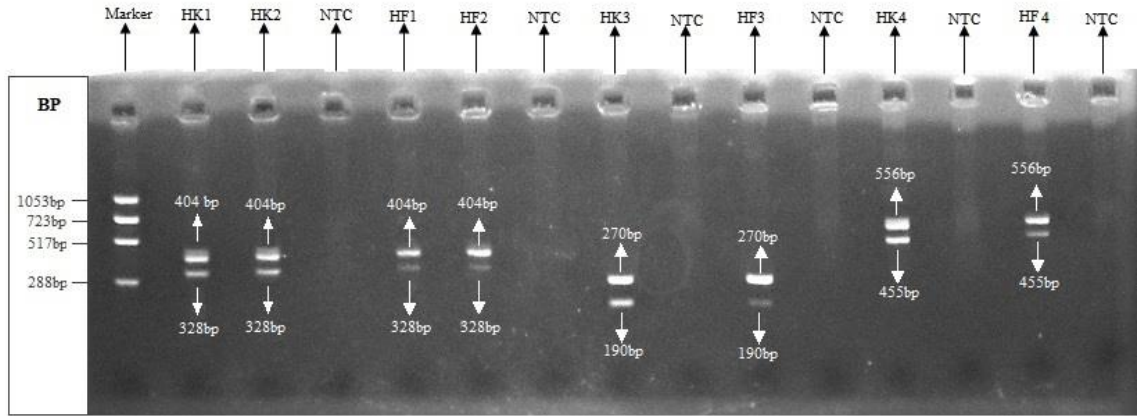
Şekil 4.6. Olgu 4'e ait genomik DNA'da gerçekleştirilen *NF1* Yeni Nesil Dizi Analizi sonucu IGV görüntüsü. Heterozigot NM_001042492.3 c.7970+4_7970+7del varyasyonu kutucuk içerisinde belirtilmiştir. IGV görüntüsünde kromozom üzerinde genin konumu nedeniyle haritalamada kanonik bölge varyasyonu gibi izlenen bu varyasyon aslında non-kanonik (+4. Nükleotidden başlayan) bir kırpılma bölgesi varyasyonudur.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların demografik bilgileri, *NF1* geninde belirlenmiş olan kırpılma bölgesi varyasyonları (NM_001042492.3 transkripti baz alınmıştır)

Olgu No	Cinsiyeti	Tanı Yaşı	Olgunun Klinik Bulguları	Belirlenen <i>NF1</i> Varyasyonu (DNA düzeyinde)
1	K	13	CALMs, aksiller çillenme, annesinde klinik olarak NF1 tanısı	Heterozigot NM_001042492.3(NF1): c.730+2T>G
2	E	36	CALMs, yaygın nörofibromlar, bilateral Lisch nodülü	Heterozigot NM_001042492.3(NF1): c.730+2T>G
3	K	34	CALMs, nörofibromlar, baba ve dedede yaygın nörofibrom öyküsü, epilepsi	Heterozigot NM_001042492.3(NF1): c.1642-3C>G
4	E	16	Nörofibromlar, CALMs, DEHB tanısı	Heterozigot NM_001042492.3 (NF1): c.7970+4_7970+7del

Çizelge 4.2. Olgular ait Veritabanı Kayıt Numaraları, Global Minör Alel Frekansları ACMG patojeniteleri, RNA analizi sonuçları

NF1 Varyasyon (NM_001042492.3)	Veritabanı Kayıt Numaraları (dbSNP/ClinVar/ HGMD)	Global Minör Alel Frekansı	In Silico Tahmin Skorları	ACMG Kriterlerine Göre Patojenitesi	RNA Analizi Sonucu	
					RNA Değişimi	Protein Değişimi
c.730+2T>G	rs200962248 41676 HGMD’de yer almıyor	0.00799	CADD: 34 PhyloP: Yüksek düzeyde korunmuş MaxEntScan: 9.68’den 2.3’e gerileme (%79 azalma) ile olasılıkla hasar görür Mutation Taster: Hastalık Yapıcı	Patojenik (PVS1, PP3, PS3)	r.654_730del76	r. (219_244del) (Ile255Stop)
c.1642-3C>G	rs1597706610 648709 CS54213	0	CADD: 21.4 PhyloP: Yüksek düzeyde korunmuş MaxEntScan: En yakın diğer kırılma bölgesi, ekzon intron kavşağının 3’ yönünde 21 bp uzaklıkta konumlu. Bu nedenle çerçeve içi delesyona neden olabilir. MaxEntScan skorunun 4.83’den-2.4’e gerileme (%100 azalma) ile olasılıkla hasar görür Mutation Taster: Hastalık Yapıcı	Olası Patojenik (PS3, PM2, PP3)	r.1642_1721del79	r. (548_574del) (Ser563Stop)
c.7970+4_7970+7del	rs1064794279 420082 CD1411413	0	CADD: 33 PhyloP: Yüksek düzeyde korunmuş MaxEntScan: Tahmin edilemedi Mutation Taster: Hastalık Yapıcı	Olası Patojenik (PS3, PM2, PP3)	r.7869_7970del	(2623_2657del) (Asn2625stop)



Şekil 4.7. Çalışmaya dahil edilen hastaların kan ve deri biyopsisi örneklerinin jel görüntüleri. Cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen ampliconlara ait jel görüntüsünde, atlanan ekzonun yer aldığı bantların daha zayıf, kan örneğinden çoğaltılan PCR ürünlerinde ise görece daha kuvvetli (yabanıl tip amplicona ait bantlar ile aynı parlaklıkta) olması dikkat çekiciydi.

4.2 cDNA Sanger Sekans Bulguları

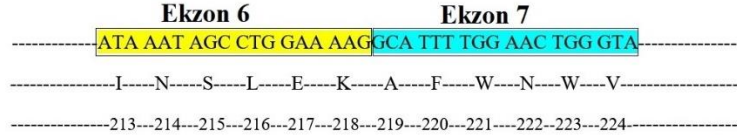
4.2.1 Olgu 1 ve Olgu 2 cDNA Sanger Sekans Bulguları

NM_001042492.3 (NF1):c.730+2T>G varyasyonu taşıyan ilk iki olgumuzda (Olgu 1 ve Olgu 2) hem kan hem de cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen total RNA'dan çoğaltılan cDNA'da, 7.Ekzonun heterozigot halde atlandığı belirlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10) Cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen ampliconlara ait jel görüntüsünde (Şekil 4.7), atlanan ekzonun yer aldığı bantların daha zayıf, kan örneğinden çoğaltılan PCR ürünlerinde ise görece daha kuvvetli (yabanıl tip amplicona ait bant ile aynı parlaklıkta) olması dikkat çekiciydi.

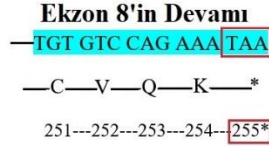
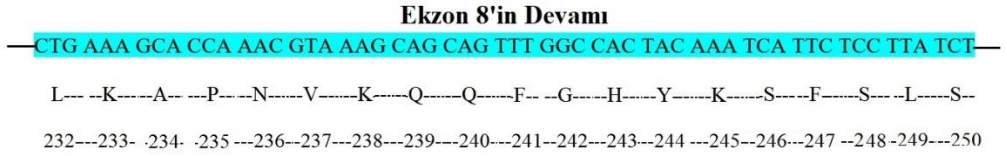
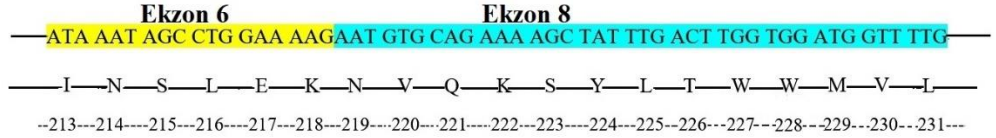
NM_001042492.3(NF1):c.1642-3C>G varyasyonu taşıyan Olgu 3'ün hem kan hem de cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen total RNA'dan çoğaltılan cDNA'da 15. ekzonun heterozigot halde atlandığı ve sonrasında erken sonlandırma kodonu oluşturduğu (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de) belirlendi.

NM_001042492.3 c.7970+4_7970+7del varyasyonu taşıyan Olgu 4'ün cilt biyopsi ve kan örneklerinden elde edilen total RNA'dan çoğaltılan cDNA'da 54. ekzonun heterozigot halde atlandığı ekzon atlanması sonrası erken sonlandırma kodonu oluşturduğu (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de) belirlendi.

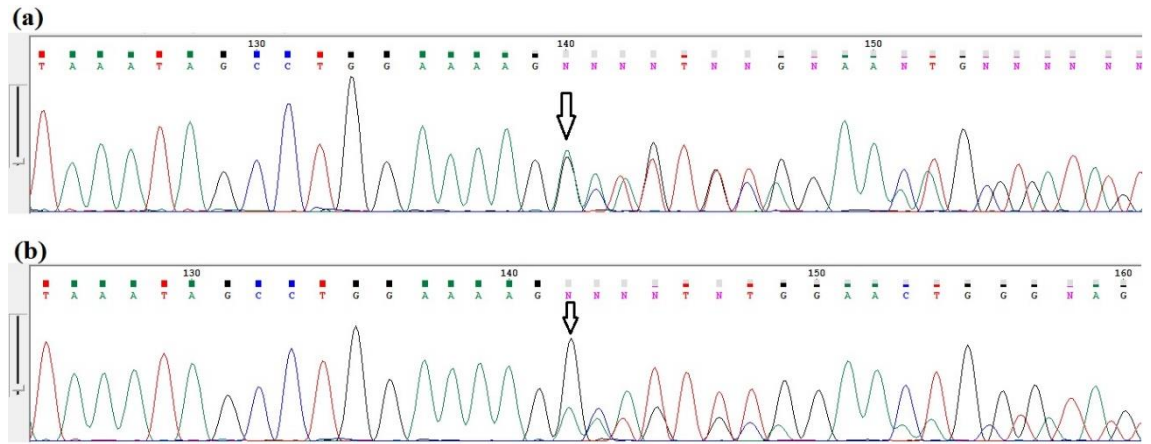
Yabanıl Tip Sekans



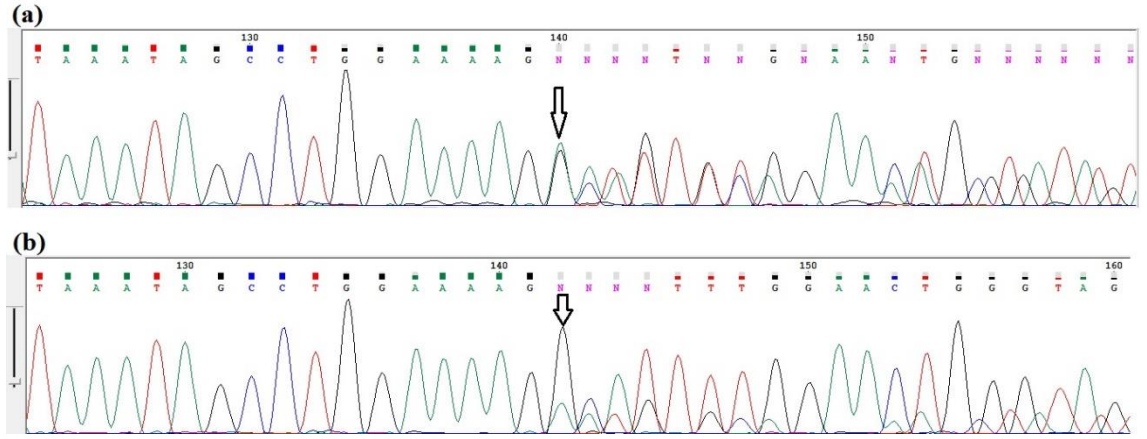
Atlanan Sekans



Şekil 4.8. Olgu 1 ve 2'nin kan ve cilt biyopsilerinin yabanıl tip ve atlanan sekans dizileri



Şekil 4.9. Olgu 1'in kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü. 7. ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir.



Şekil 4.10. Olgu 2'nin kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü. 7. ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir.

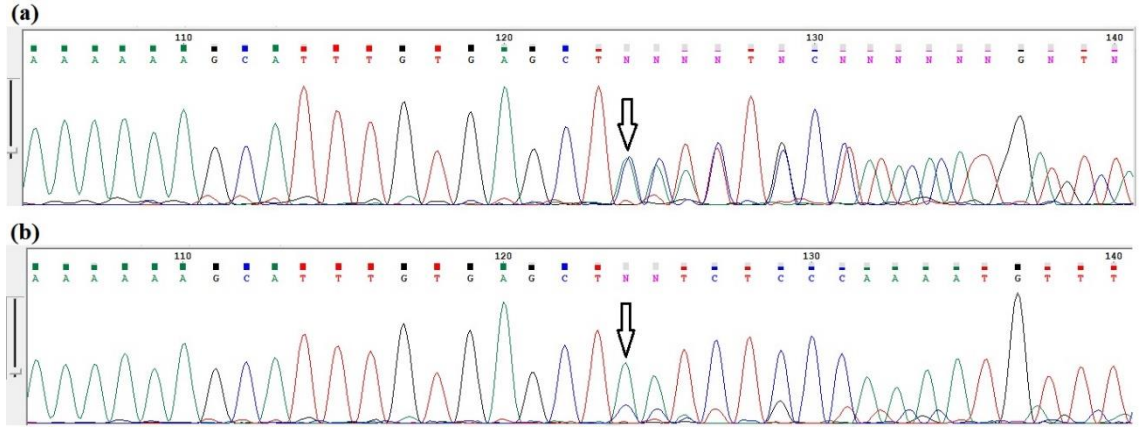
Yabancı Tip Sekans

Ekzon 14 **Ekzon 15**
 -----GCT-CAG-GAA-GCA-ATG-GAG-GCT-CTG-CTG-GTT-CTT-CAT-----
 -----A----Q----E----A----M----E----A----L----L----V----L----H-----
 -----542—543—544—545—546—547—548---549—550---551—552—553-----

Atlanan Sekans

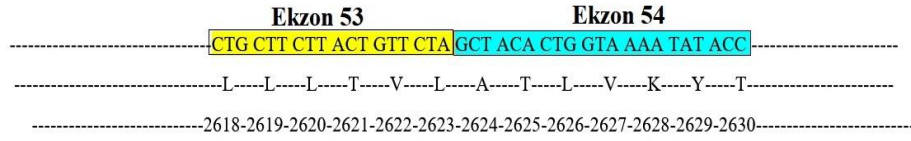
Ekzon 14 **Ekzon 16**
 GCT-CAG-GAA-GCA-ATG-GAG-CTC-ACA-AAT-GCT-TTT-TTA-CAT-CTG-CAA-CAT-CTG-CAA-GAA-ATT-AAC-TAG
 -A--Q--E-----A----M----E--L-----T----N--A--F--L--H----L--Q--H----L-----Q--E--I-----N-----*
 542--543--544--545--546--547--548--549--550--551--552--553--554--555--556--557--558--559--560--561--562--563

Şekil 4.11. Olgu 3'ün kan ve cilt biyopsilerinin yabancı tip ve atlanan sekans dizileri

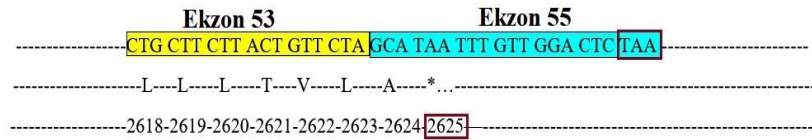


Şekil 4.12. Olgu 3'ün kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA'nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü. 15. ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir (reverse okumalar izlenmiştir).

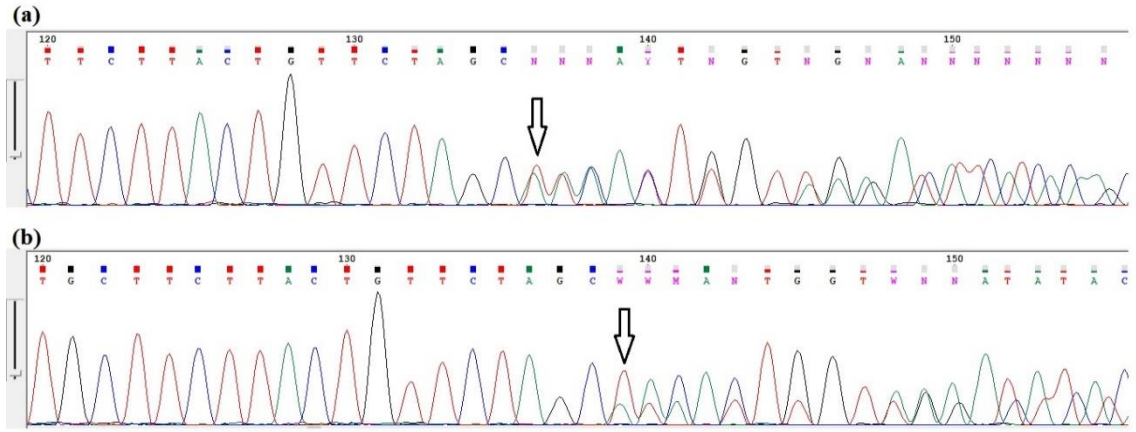
Yabancı Tip Sekans



Atlanan Sekans



Şekil 4.13. Olgu 4'ün kan ve cilt biyopsilerinin yabancı tip ve atlanan sekans dizileri



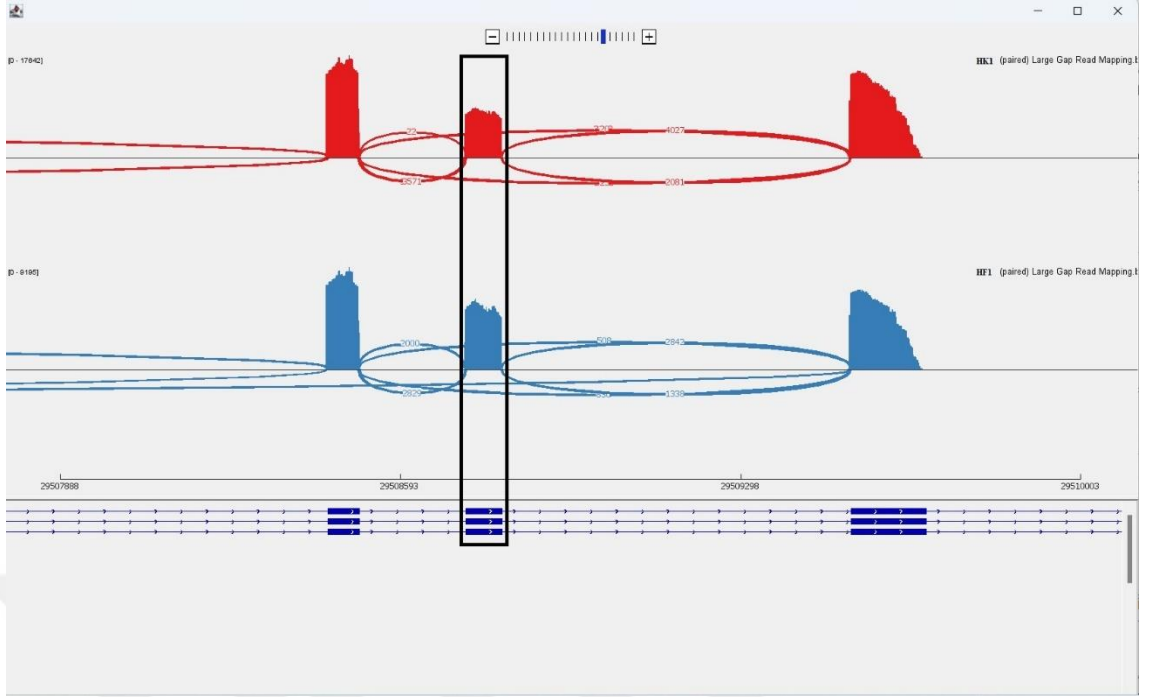
Şekil 4.14. Olgu 4’ün kan (a) ve cilt biyopsi (b) örneğinden izole edilen RNA’nın Sanger Sekans elektroferogram görüntüsü. 54. ekzonun heterozigot halde atlandığı ok işaretli bölgeden itibaren görülen çerçeve kayması ile izlenmektedir.

4.3 Nextera ile Hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi Bulguları

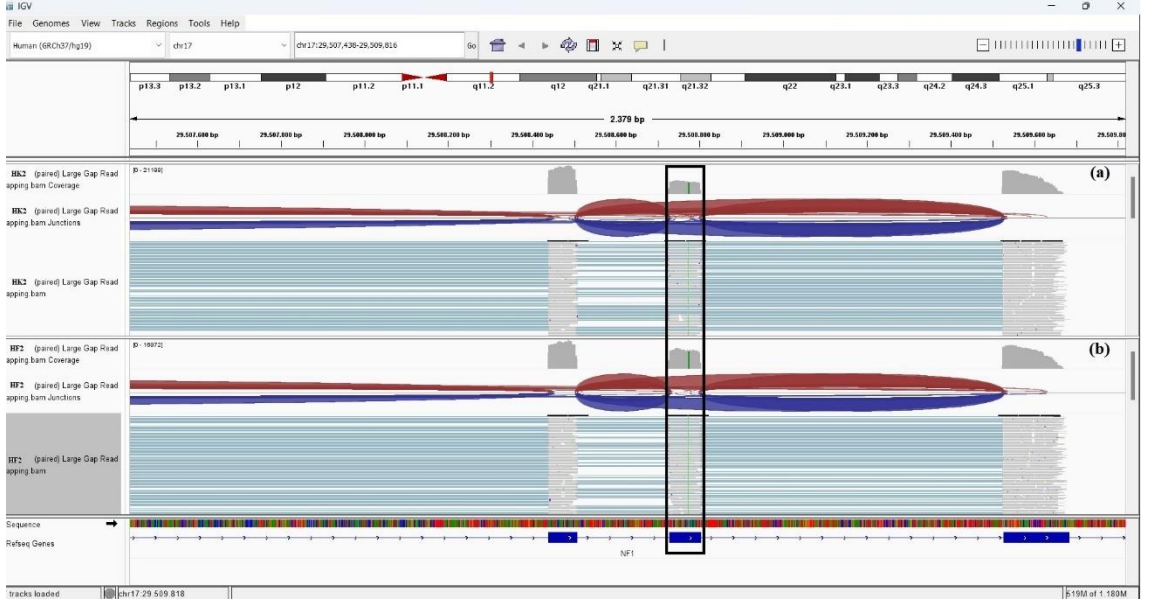
Merkez içi dizayn edilen PCR primerleri ile çoğaltılan cDNA ampliconları Nextera protokolü ile dizilenmiş ve CLC Genomic Workbench 22.0.2 ‘in “Large Gap Mapping” analiz algoritması ile işlenerek atlanan ekzonlar IGV programında görsel olarak değerlendirilmiştir. CLC Genomic Workbench 22.0.2’de “Large Gap Mapping” protokolü ile analiz edilen ampliconlar atlanan ekzonların IGV’de izlenmesine olanak tanımasının yanı sıra, atlanan ekzonların olduğu transkriptleri “yeni (novel) transkript” şeklinde de raporlamaktadır. Analiz bulguları Şekil 4.15 ve Şekil 4.23 arasında belirtildi.



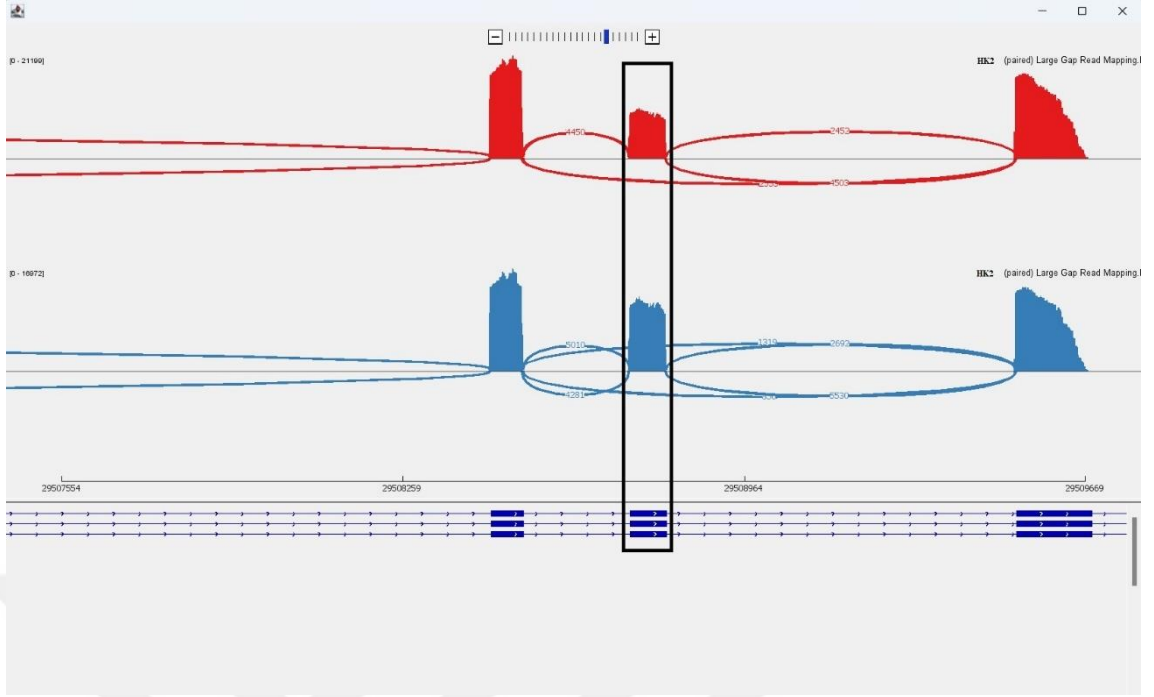
Şekil 4.15. Olgu 1’ ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)



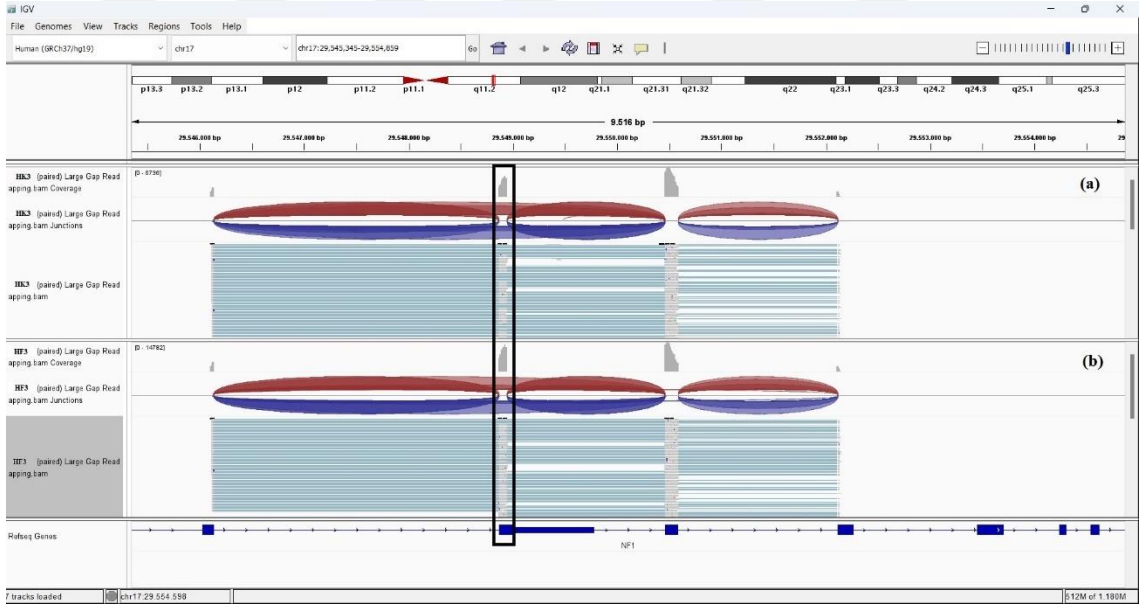
Şekil 4.16. Olgu 1'e ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi) (RNA)



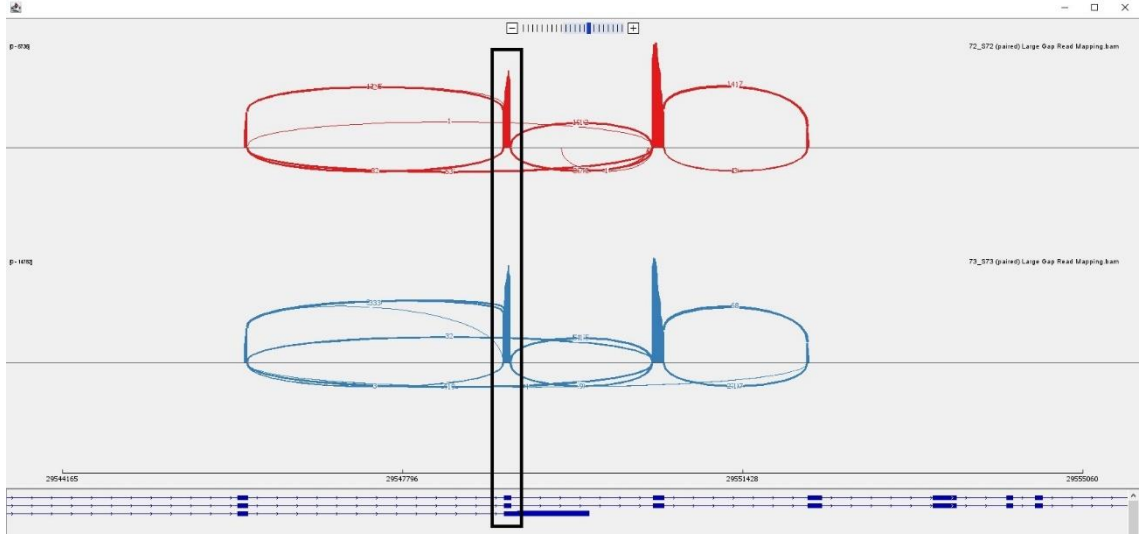
Şekil 4.17. Olgu 2'ye ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)



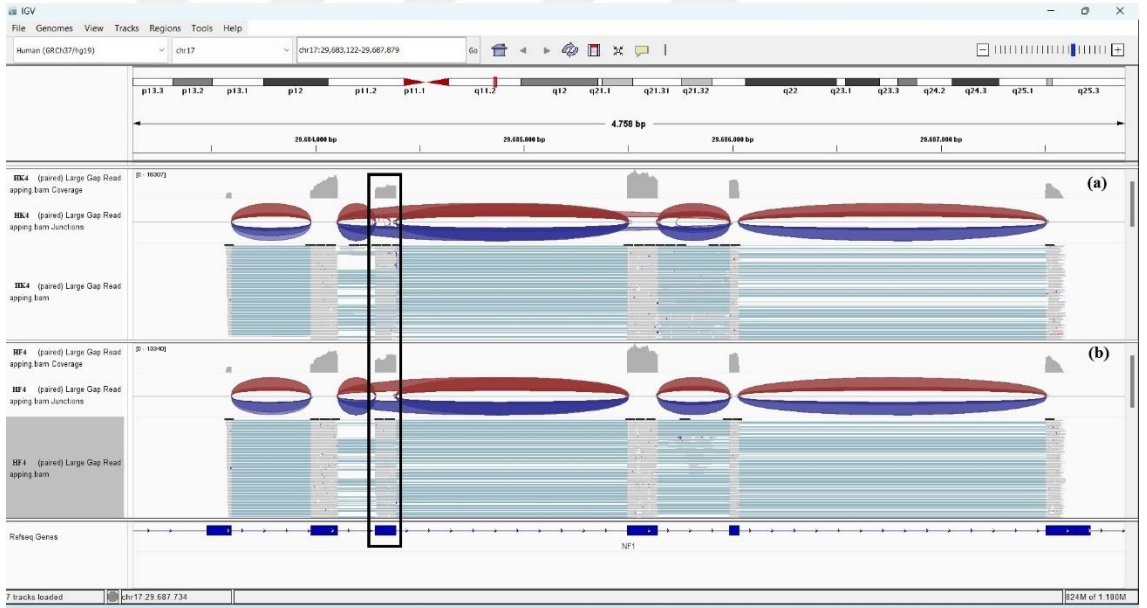
Şekil 4.18. Olgu 2'ye ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (RNA) (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi)



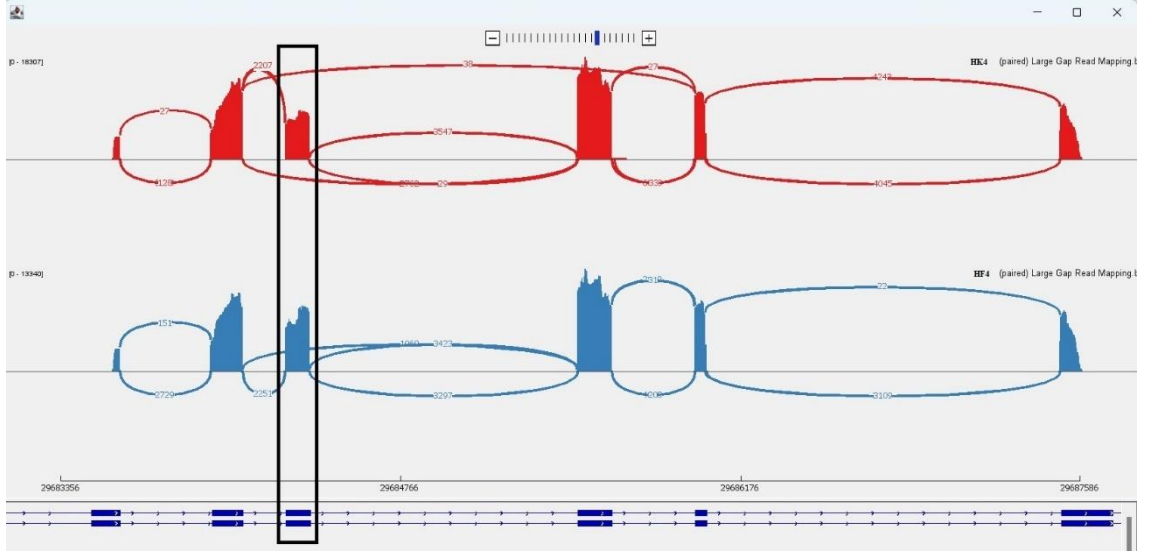
Şekil 4.19. Olgu 3'e ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)



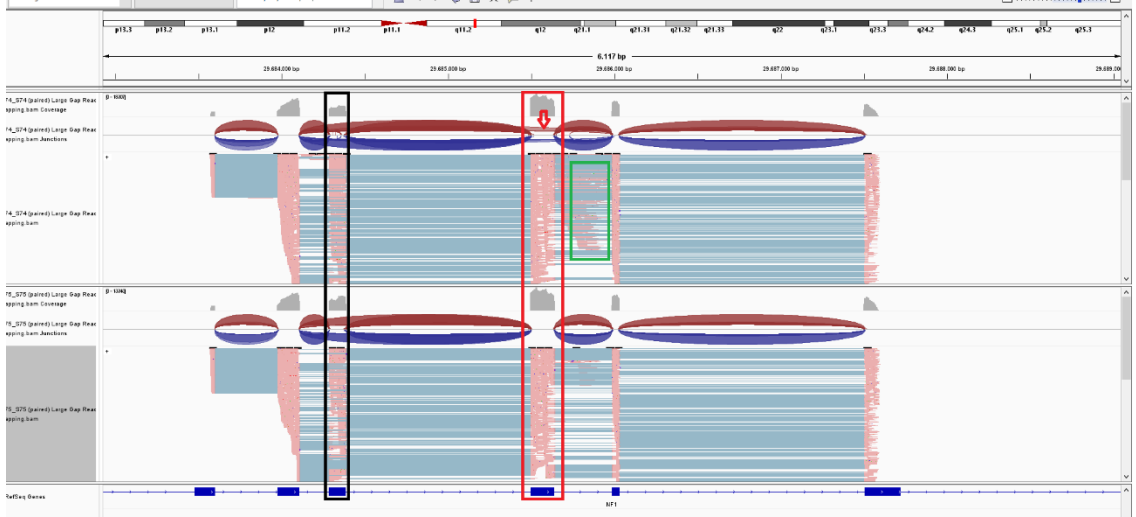
Şekil 4.20. Olgu 3'e ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (RNA) (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsi)



Şekil 4.21. Olgu 4'e ait Nextera görüntüsü (a: kan, b: cilt biyopsi) (RNA)



Şekil 4.22. Olgu 4'e ait kan ve cilt biyopsisine ait Sashimi Plot görüntüleri (RNA) (kırmızı: kan, mavi: cilt biyopsisi)



Şekil 4.23. 4. olgumuza ait kan örneğinden gerçekleştirilen hedefli RNA-Seq (Nextera) analizlerinde 54. Ekzonun (siyah ile belirtilen) yanı sıra 55. ekzonun da (kırmızı ile belirtilen) atlandığı ve takip eden intronun (yeşil ile belirtilen) kısmen dahil edildiği az sayıda transkript de gözlemlendi. Bu bölge ile ilgili detaylı ek analiz planlandı ancak materyal kısıtlılığı nedeniyle gerçekleştirilemedi. Cilt biyopsisi örneğinde ise tüm transkriptlerde sadece 54. ekzonun atlandığı görüldü.

4.4 RNA Transkriptom Bulguları

Transkriptomdan elde edilen gen ekspresyon verilerinin analizleri CLC Genomics Server 22.0.2 (QIAGEN, Aarhus, Denmark), platformunda gerçekleştirildi.

4.4.1 RNA Transkriptom Dizi Okumaları ve Dizi Özgüllüğü

Olgulara ait cilt biyopsisi ve kandan elde edilen RNA transkriptom dizi okumaları ve dizi özgüllüklerine ait bilgiler Çizelge 4.3'den Çizelge 4.18'e kadar olan kısımda belirlendi.

Çizelge 4.3. Olgu 1 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HF1_S1 (eşli)	51.926.250	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar			İkisi birden
Eşlenen okumaların Forward %'si			2.01
Eşlenen okumaların Reverse %'si			97.99
Bilinen iplikçik ile okur			45,633,523
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)			0
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)			0.00

Çizelge 4.4. Olgu 2 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HF2_S2 (eşli)	59.739.426	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar			İkisi birden
Eşlenen okumaların Forward %'si			2.79
Eşlenen okumaların Reverse %'si			97.21
Bilinen iplikçik ile okur			53.473.851
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)			0
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)			0.00

Çizelge 4.5. Olgu 3 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HF3_S3 (eşli)	50.784.218	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.32		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.68		
Bilinen iplikçik ile okur	45.626.199		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.6. Olgu 4 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HF4_S4 (eşli)	58.448.806	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.85		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.15		
Bilinen iplikçik ile okur	41.836.342		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.7. Kontrol 1(cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KF1_S1 (eşli)	43.373.286	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	1.79		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	98.21		
Bilinen iplikçik ile okur	40.748.737		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.8. Kontrol 2 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KF2_S2 (eşli)	46.262.176	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.20		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.80		
Bilinen iplikçik ile okur	39.111.813		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.9. Kontrol 3 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KF3_S3 (eşli)	43.245.516	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	1.86		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	98.14		
Bilinen iplikçik ile okur	40.227.918		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.10. Kontrol 4 (cilt biyopsisi) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KF4_S4 (eşli)	49.159.352	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.09		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.91		
Bilinen iplikçik ile okur	45.692.219		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.11. Olgu 1’in (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HK1_S9 (eşli)	46.897.602	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.03		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.97		
Bilinen iplikçik ile okur	44.713.569		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.12. Olgu 2’nin (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HK2_S10 (eşli)	52.909.242	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.04		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.96		
Bilinen iplikçik ile okur	50.374.279		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.13. Olgu 3’ün (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HK3_S11 (eşli)	58.450.750	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.24		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.76		
Bilinen iplikçik ile okur	55.428.533		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.14 .Olgu 4’ün (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
HK4_S12 (eşli)	20.414.786	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	3.50		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	96.50		
Bilinen iplikçik ile okur	13.350.977		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.15. Kontrol 1 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KK1_S13 (eşli)	54.790.546	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.15		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.85		
Bilinen iplikçik ile okur	51.992.750		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.16. Kontrol 2 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KK2_S14 (eşli)	48.823.090	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	1.97		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	98.03		
Bilinen iplikçik ile okur	46.093.552		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4.17. Kontrol 3 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KK3_S15 (eşli)	58.880.590	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.28		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.72		
Bilinen iplikçik ile okur	55.921.977		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

Çizelge 4. 18. Kontrol 3 (kan) dizi okumaları ve özgüllüğü

SEKANS OKUMALARI			
İsim	Okuma Sayısı	En Uzun Okuma	Eşli
KK4_S16 (eşli)	53.745.108	149	Evet
Eşleştirilmiş Veriler İçin, Çift Olarak İki Okuma Vardır			
ZİNCİR ÖZGÜLLÜĞÜ			
Zincire özgü ayar	İkisi birden		
Eşlenen okumaların Forward %'si	2.17		
Eşlenen okumaların Reverse %'si	97.83		
Bilinen iplikçik ile okur	51.276.589		
Yok sayılan okumalar (yanlış iplikçik)	0		
Yok sayılan okumalar % (yanlış iplikçik)	0.00		

4.4.2 Olgu ve Kontrol Grupları Arasında *NF1* Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Mutasyonlu olgularda ve kontrollerde nörofibromin mRNA ekspresyon farklılıklarını belirlemek için olgu ve kontrollere ait iki farklı dokudan (sırası ile fibroblast ve kan örneklerinden) elde edilen transkriptom verileri *NF1* geni açısından kendi içerisinde karşılaştırıldı (Çizelge 4.19, Çizelge 4.20)

Çizelge 4.19. Hasta cilt biyosi ve kontrol cilt biyopsi ekspresyon değerleri RPKM: Reads per kilobase of transcript per Million reads mapped TPM: Transcript Per Kilobase CPM: Counts Per Million

	RPKM	TPM	CPM	Max Group Means	Fold Change/Log Fold Change	FDR p-value
HF1	0.7902	2.0133	20.9079	2.1549	-2.0537/-1.0382	0.0049
HF2	0.8996	2.6434	23.6219			
HF3	1.1952	3.5760	27.0365			
HF4	0.8956	2.2848	24.1166			
KF1	2.4928	7.7268	49.1729			
KF2	1.9983	5.5536	53.3061			
KF3	2.0255	5.8910	49.1901			
KF4	2.1032	6.0127	48.7755			

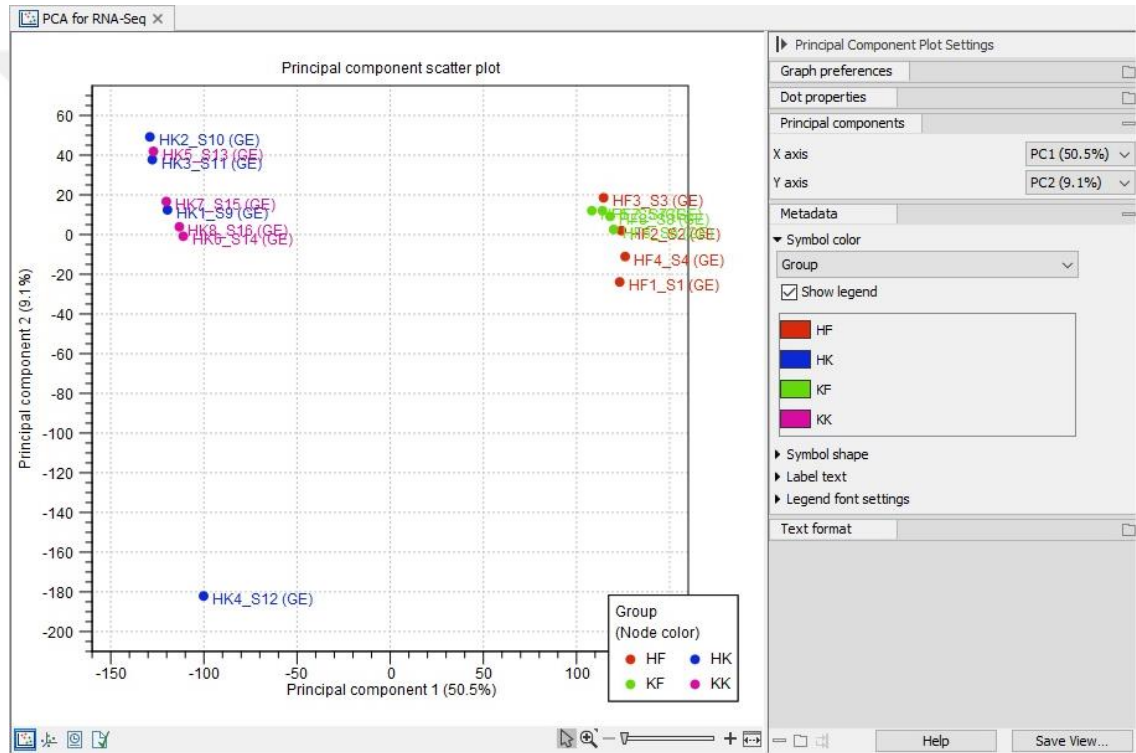
Çizelge 4.20. Hasta kan ve kontrol kan ekspresyon değerleri RPKM: Reads Per Kilobase Million, TPM: Transcripts Per Kilobase Million, CPM: Counts Per Million

	RPKM	TPM	CPM	Max Group Means	Fold Change /Log Fold Change	FDR p-value
HK1	1.9665	8.0440	47.2661	2.0588	-1.2061/-0.2704	0.9999
HK2	1.8886	7.8334	55.0676			
HK3	1.7868	7.4359	46.3592			
HK4	0.4747	1.0120	17.3660			
KK1	2.5618	10.8432	68.9547			
KK2	1.8237	6.6831	42.4331			
KK3	1.9375	7.5782	46.7289			
KK4	1.9122	7.1946	43.5404			

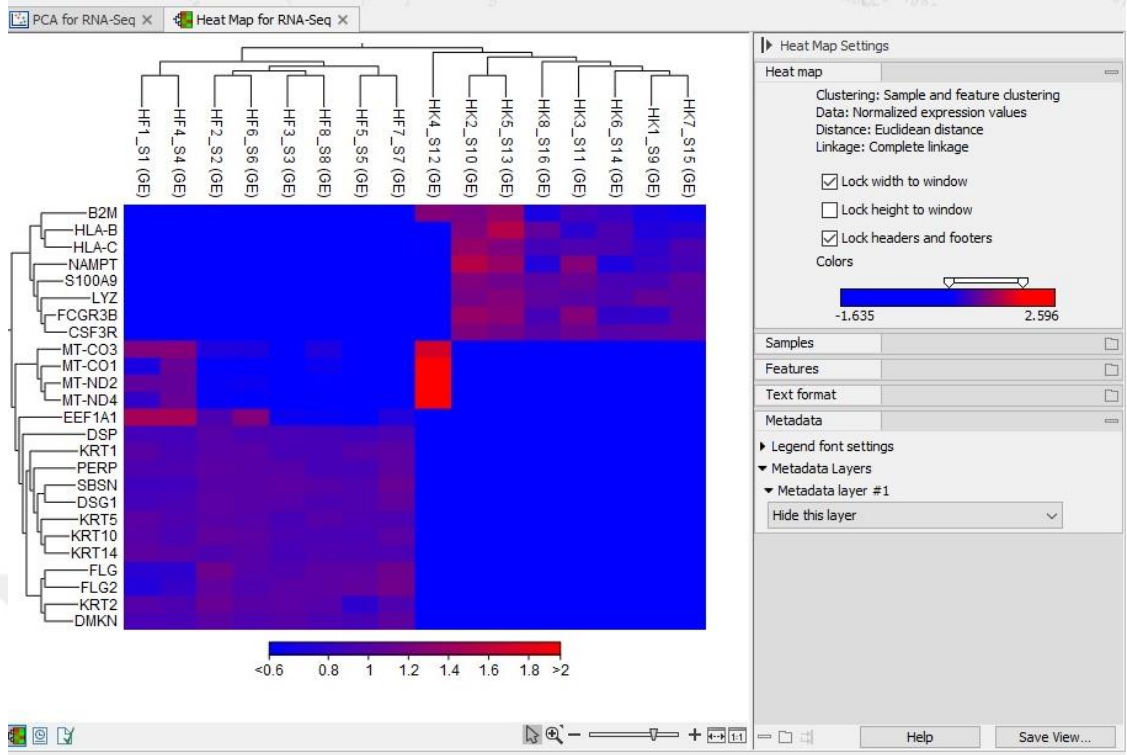
4.4.3 Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis – PCA)

Tüm örneklerin tabi tutulduğu prensipsel bileşen analizinde, olgu ve kontrol gruplarından daha ziyade, kan dokusundan elde edilen RNA'ya ilişkin transkriptom verisi ile cilt biyopsisi örneklerinden izole edilen RNA'ya ilişkin transkriptom verisinin ayrıştığı gözlemlendi (Şekil 4.24). Dört numaralı olguya ait kan dokusundan elde edilen, temel bileşenler analizinde, dört numaralı olguya ait transkriptom bulgularının diğer kan

dokularından ayrıştığı görüldü. Isı haritasında gözlemlediğimiz hiyerarşik kümelenme analizinde dördüncü örneğimize ait transkriptom verilerinin *MT-CO3*, *MT-CO1*, *MT-ND2*, *MT-ND4* genlerinin ekspresyon artışı nedeniyle örneklem grubundan ayrıştığı gözlemlendi (Şekil 4.25). Temel bileşenler analizinde bu olgunun diğer olgulardan ayrışmasının bu ekspresyon profil farklılığından kaynaklanabileceği düşünüldü. Dört numaralı olgumuzun kan örneğinden izole edilen RNA'nın kalite parametreleri de diğer olgulara göre daha düşüktü ve kan dokusundan izole edilen RNA örneğinde *NF1* transkript düzeyi cilt fibroblast dokusundan daha düşük seyreden tek olgumuz dört numaralı olgu idi.



Şekil 4.24. Temel bileşenler analizi (kırmızı: olgu cilt biyopsi, mavi: olgu kan, yeşil: kontrol cilt biyopsi, mor: kontrol kan)



Şekil 4.25. Olgu ve kontrollere ait ısı haritası

4.4.4 Olgu ve Kontrollere Ait Cilt Biyopsisi Tüm Transkriptom Bulgularının Karşılaştırmalı Analizi

Nörofibromatozis Tip 1’de ön plana çıkabilecek kanonik sinyal yolaklarının belirlenmesi amacıyla, RNA sekans sonuçları IPA (QIAGEN Inc., <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) analizlerine tabi tutuldu. Nörofibromin transkript düzeylerinin olgu ve kontroller arasında önemli ölçüde düşüş gösterdiği cilt biyopsisi örneklerinin IPA analizlerinde L- Dopachrome sinyal yolağı ve EIF2 sinyal yolağı ön plana çıkmaktaydı (Şekil 5.1, Şekil 5.2).

Kanonik EIF2 sinyalı yolağı üzerindeki 227 genden 12 tanesi veri setimiz içerisinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farklılığı gösterirken (*RPS15a*, *RPS28*, *RPS27*, *RPS26*, *RPS21*, *RPS7*, *RPL39*, *RPL35*, *RPL34*, *RPL31*, *Rpl17* ve *HRAS* genleri), L-dopachrome kanonik yolağı üzerindeki her iki gende (TYR ve TYRP1) veri setimiz içerisinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farklılığı gösterdi.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), yaklaşık 3500 kişiden 1'ini etkileyen ve *NF1* gen defektlerinden kaynaklanan otozomal dominant bir hastalıktır. *NF1* geninin boyutu, karmaşıklığı ve yüksek mutasyon oranı nedeniyle varyantların tanımlanması zor olabilmektedir (Douben vd., 2022). Mutasyonların önemli bir kısmı RNA kırılmasını etkilemekte ve kriptik kırılma bölgelerinin oluşumuna ya da (Pros vd., 2009) ekzon atlanmasına neden olmaktadır. Mutasyona sahip hastalarda normal transkriptler ya da oran olarak daha az etkilenmiş transkriptler üretilebilmektedir. Aynı mutasyona sahip hastalar arasında bile farklı transkriptler görülebilmektedir (Pros vd., 2006). Çalışmamızda daha önce literatürde herhangi bir doku örneğinde RNA düzeyinde analizi yapılmamış bir olası patojenik *NF1* varyasyonu ile, literatürde kandan izole edilen RNA'da fonksiyonel sonucu bildirilmiş iki farklı kırılma bölgesi varyasyonunun, dört ayrı olguya ait sağlıklı görünümlü cilt bölgesinden alınan biyopsi örneği ve total kandan izole edilen RNA örneklerinde ekzon atlanması sonucu erken terminasyona neden olduğu Sanger sekans ve hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi ile karşılaştırmalı olarak gösterildi. Olgu ve kontrollere ait cilt biyopsilerinden elde edilen tüm transkriptom verilerinin karşılaştırılması ile de melanin biyosentezi ve ribozomal biyogenez ile ilgili kanonik sinyal yollarının iki grup arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$) gösterdiği belirlendi.

NF1 hem aileler arasında hem de aile içinde yüksek bir fenotipik çeşitlilik gösterir. Fenotipik değişkenliğin nedenleri arasında genetik altyapı farklılıkları, mozaizizm, çevresel ve raslantısal faktörler yer alır. Genellikle yaş ilerledikçe fenotip de belirginleşir (Wu vd., 2022). RNA kırılma mekanizmasındaki varyasyonların, kırılma mutasyonunun farklı ifadesine ve bu sebeple mutasyona uğramış mRNA'nın farklı

seviyelerde eksprese edilmesine yol açabileceği düşünülmektedir (de Klerk & t Hoen, 2015). Bu nedenle, *NF1*'de kırılma mutasyonlarının, aynı mutasyonu taşıyan *NF1* hastalarında gözlenen klinik aile içi ve aileler arası değişkenliğin bir kısmının açıklanabileceği düşünülebilir (E. Ars vd., 2000).

Kırılma bölgesi varyasyonlarının fonksiyonel sonuçlarının değerlendirilmesinde RNA-temelli analizler henüz rutin klinik pratikte çok yerleşmemiştir. Total RNA'nın transkriptom verilerinden yola çıkılarak genetik tanı ile ilgili ilk çalışmalar yaklaşık altı yıl öncesine dayanmaktadır (Cummings vd., 2017; Kremer vd., 2017; Yépez vd., 2021). Çalışmamız kapsamında incelediğimiz üç *NF1* kırılma bölgesi varyasyonundan (c.730+2T>G, c.1642-3C>G, c.7970+4_7970+7del) ikisinin (c.1642-3C>G, c.7970+4_7970+7del) kan dokusundan izole edilen RNA'da fonksiyonel çalışması bulunmaktaydı ancak cilt biyopsisi örneklerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştı. c.730+2T>G varyasyonunun RNA düzeyindeki etkisi ile ilgili ise herhangi bir çalışma bulunmamaktaydı. Çalışmamızda ikisi kanonik olmayan biri kanonik üç kırılma bölgesinin de ekzon atlanması sonucu çerçeve kayması ve erken terminasyona neden olduğu iki farklı doku kaynağında Sanger ve hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi ile gösterilmiştir. RNA-NGS ile genetik tanı algoritmaları henüz tam olarak optimize edilemediklerinden (Conesa vd., 2016) ,laboratuvarında rutin uygulamalar öncesi kullanılacak yöntemlerin ve dokuların karşılaştırılması ve optimizasyonu genetik tanı algoritmaları açısından önem arz etmektedir. Tüm transkriptom verilerinde ise, tüm olguların cilt biyopsisi örneklerinde nörofibromin transkript düzeyleri kontrollere göre anlamlı düzeyde azalmış olmakla birlikte, olgularımızdan sadece bir tanesinin kan örneğinde atlanan ekzonun noktasal olarak transkriptom verisinden belirlenmesi mümkün oldu. Bu sonuç, intronik varyasyonların sonuçlarının net olarak belirlenmesinde daha yüksek derinlikli okumaları içeren hedefli yaklaşımların kullanılmasının daha efektif olacağına işaret etmekteydi. Douben ve ark. tarafından 2022 yılında yapılan çalışmada *NF1* genine hedefli olarak yapılan transkriptom sonuçlarına göre kohortun %87'sinde *NF1* için tanı kriterlerini karşılayacak varyasyonlar tespit edilmiş olup (Douben vd., 2022) bu sonuçlar doğrultusunda RNA transkriptom ile *NF1* varyantlarının tespiti, sınıflandırması ve karakterizasyonunun mümkün olabileceğini düşünülebiliriz.

Olgu 1 ve Olgu 2'de *NF1* geninde DNA düzeyinde saptanan c.730+2T>G varyasyonunun hem kan hem cilt biyopsisi örneklerinden izole edilen RNA'da, ilgili

transkriptte 7. ekzonun atlanmasına ve oluşan yeni transkriptte 8. Ekzon içerisindeki 255. kodonda erken terminasyona neden olduğunu Sanger sekans ve hedefli Yeni Nesil Dizi Analizi ile belirledik. Olguların merkezimize başvuru tarihi itibarı ile c.730+2T>G varyasyonu ClinVar veritabanında benign varyasyon olarak yer almaktaydı, bu tezin hazırlandığı sırada ise bir patojenik ve bir de klinik önemi bilinmeyen (bilinen patojenik etkisi olmadığı yönünde) varyant olarak iki giriş daha yapılmıştı. (National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000041676.3],<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000041676.3> (accessed June 8, 2023). Bu varyasyon ile ilgili minör alel (G) frekans bilgilerinde bazı çelişkiler dikkat çekmekteydi (Siberian popülasyonunda 9/18; ALFA çalışmasında 0/143292). Johnston ve ark. tarafından 2012’de, ateroskleroz olgularının genom ve ekzom sekanslama sonuçları arasında ikincil bulgu olarak belirlenen kanserle ilişkili varyantların frekansının araştırılmasına yönelik çalışmada, 469 bireyden 78’inde NF1 geninde c.730+2T>G varyasyonu belirlendiği bildirilmişti (Johnston vd., 2012). Yine Johnston ve ark tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada (Johnston vd., 2015) frekans bildirilmeksizin bu varyasyon yer almaktaydı ancak varyasyon ile ilgili RNA düzeyinde herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktaydı. Yapılan çalışmalar ve bildirilen MAF değerleri DNA düzeyinde yapılan çalışmalardan elde edilen çelişkili sonuçları içermekteydi (National Center for Biotechnology Information.ClinVar;[VCV000041676.3],<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000041676.3> (accessed June 11, 2023). Çalışmamızda bu varyasyonun RNA kırılmasını etkileyerek erken terminasyona neden olduğu hem cilt biyopsisi hem total RNA örneklerinde ilk kez gösterilmiştir.

Üç numaralı olgumuzda bulunan c.1642-3C>G varyasyonunun olgu kan ve cilt biyopsisi örneklerinde 15. ekzonu atlattığı ve 26 amino asitlik bir kayıp sonrasında yeni oluşan transkriptte 563. kodonda bir erken terminasyona neden olduğu tesbit edildi. Literatürde c.1642-3C>G varyasyonu ile ilgili 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada 38 hastadan oluşan bir kohortta Epstein-Barr virüsü (EBV) ile dönüştürülmüş lenfoblastoid hücre hatlarından (LCL) genomik DNA ve Total RNA’da Pirodizileme ve Sanger sekans yapılarak çerçeve kaymasına bu varyasyonun çerçeve kayması (c.1642_1721del) sonucu erken dur kodonuna neden olduğu bildirilmiştir (Brinckmann vd., 2007). Aynı çalışmada hastaların *NF1* ekspresyon seviyelerinin erken terminasyon kodonu oluşumu sonucu

üretileen transkriptin anlamsız aracılı bozunmaya (Nonsense Mediated Decay, NMD) maruz kaldığını işaret edece şekilde azaldığı ortaya koyulmuştur. Çalışmada bir NMD inhibitörü olarak puromisin kullanıldığında mutant alelin kurtarılabildiği bildirilmiştir (Brinckmann vd., 2007). Yapılan diğer bir çalışmada kanonik AG-dinükleotitlerin dışındaki intronik *NFI* 3' kırılma yeri mutasyonlarının tanımlanması için puromisin ile işlenmiş lenfosit kültürlerinden izole edilen *NFI* transkriptlerinin doğrudan dizilenerek, Genomik DNA'da belirlenemeyen ve kırılmayı etkileyen derin intronik varyasyonlar belirlenmiştir. Olgulardan birinde c.1642-3C>G varyasyonu sonucu r.1642_1721del olduğu bu çalışmada bildirilmiştir (Wimmer vd., 2020). Biz de çalışmamızda da hem kan hem de cilt biyopsisi RNA örneklerinden üretilen cDNA'da Sanger ve hedefli Yeni Nesil Sekans ile *NFI* c.1642-3C>G varyasyonunun 15. Ekzonun atlanmasına neden olduğunu gösterdik. Biz çalışmamızda nörofibromin mutasyonlarının iki farklı dokudaki transkriptom boyu etkilerinin hastaya ait hücresel profili daha doğru şekilde yansıtacağını öngörerek örneklere NMD bloklayıcı herhangi bir ajan uygulamadan transkriptom çalışmasını gerçekleştirdik. Hedefli analizlerde, NMD'ye rağmen (mutant alele ait transkript düzeyleri yabancı tip alele ait transkript düzeylerinden düşüktü) varyasyonları gösterdik ancak tüm transkriptom verileri içerisinde *NFI* transkript düzeyleri daha önceki RNA sekans çalışmalarında olduğu gibi (RPKM: 3.574 ± 1.083) bizim çalışmamızda da hem olgular hem de kontrollerde oldukça düşüktü (Fagerberg vd., 2014). Bu bulgular, transkriptom boyu RNA dizileme yoluyla gerçekleştirilecek genetik analizlerde, özellikle *NFI* gibi genel olarak düşük düzeyde eksprese olan genlerde NMD mekanizması ile mutant alellerin ortadan kaldırılmasını önlemek için puromisin gibi NMD blokerleri kullanılarak kültür yapılmasının faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Dördüncü olgumuzda *NFI* geninde bulunan c.7907+4_7907+7del varyasyonunun olgu kan ve cilt biyopsisi RNA'larında 54. ekzonu atlattığı ve 33 amino asiti kodlayan dizinin kaybedildiği belirlendi. Yeni oluşan transkriptin 2625.kodonunda bir erken terminasyon kodonu oluşmaktaydı. *NFI* tanılı 86 hastanın varyasyonlarının DNA düzeyinde belirlendiği bir validasyon çalışmasında pigment lezyonları, Lisch nodülü ve nörofibromların görüldüğü 41 yaşındaki bir olguda *NFI*:c.7970+4_7970+7del varyasyonu rapor edilmiştir (Maruoka vd., 2014). 2020 yılında 250 hasta ile yapılan, bir çalışmada da bu varyasyonun kanda r.7807_7907del101 (s.Thr2604*) ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Bianchessi vd., 2020). Ancak (Bianchessi vd., 2020) tarafından yapılan

çalışmanın metodolojik algoritmasında DNA temelli NGS ve MLPA yöntemleri ile varyasyon bulunamayan olgularda cDNA Sanger sekanslama yapıldığı belirtilmiş olduğundan Sanger sekansın c.7907+4_7907+7del varyasyonlu olguda RNA düzeyinde mi belirlendiği yoksa öngörüselsel olarak mı bildirildiği net olarak anlaşılamamaktadır. Bizim olgumuzda cilt biyopsisinden izole edilen RNA'da 54. Ekzonun atlandığı net olarak ortaya koyulmakla birlikte, kan dokusundan izole edilen RNA'nın hedefli NGS sonuçlarında, 54. Ekzonun yanı sıra 55. Ekzonun da atlandığı ve takibeden intronun kısmen dahil edildiği az sayıda transkriptin de olduğu görüldü. Dördüncü olgumuzda, nörofibromlar ve cafe-au-lait lekelerinin yanı sıra dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu da vardı. Bu olgu, olgu serimiz içerisinde kan nörofibromin transkript düzeyi cilt biyopsisi nörofibromin transkript düzeyinden daha düşük olan tek olgu idi fakat bilinen bir hematolojik bulgusu yoktu. Olgumuzun kan örneğinde belirlemiş olduğumuz, iki ekzonun birden atlanmasına neden olan az sayıdaki transkriptin daha önceki çalışmada (Bianchessi vd., 2020) bildirilmemiş olmasının, mutasyonların fonksiyonel sonuçlarının dokudan dokuya ve bireyden bireye farklılık gösterebilmesi, yapılan diğer çalışmada Sanger'de düşük oranda mutant pik izlenmesi sonucu belirlenememiş olması gibi nedenlerden kaynaklanmış olabileceğini öngörmekteyiz. Genomik DNA varyasyonlarının farklı dokularda, farklı fonksiyonel sonuçlar doğurabileceğine dair farklı çalışmalar bulunmaktadır. Kanonik *CC2D2A* transkriptinden (ENST00000503292.5) ekzon 29 ve e 31'i hedefleyen bir primer çifti kullanarak tam kan, böbrek ve insan idrarından türetilen böbrek epitel hücrelerinden (hUREC'ler) total RNA üzerinde RT-PCR gerçekleştirilmiş, böbrekte ve kanda (daha düşük seviyelerde) saptanan 327 bp'lik tahmin edilen amplifikasyon ürününün yanı sıra, böbrekte daha kısa bir transkript görülmüş ancak, ancak kan RNA'sında görülmemiştir (Barroso-Gil vd., 2021). Bizim çalışmamızda da dördüncü olgunun kan ve cilt biyopsisi dokuları arasında farklı sonuçların elde edilmesi, RNA çalışmalarında kullanılacak hedef doku örneklerinin çalışma sonuçlarını etkileyebileceğine işaret etmektedir.

Ekzon atlanmasına neden olan mutasyonlar erken sonlandırma kodonları yoluyla okuma çerçevesini değiştirdiklerinde güdük protein oluşmasını engellemek için mutant mRNA'lar NMD ile ortadan kaldırılabilmektedir (Hentze & Kulozik, 1999).Yapmış olduğumuz çalışmada, her üç kırılma bölgesi varyasyonunun da NM_001042492.3 (NF1):c.730+2T>G, NM_001042492.3(NF1):c.1642-3C>G, NM_001042492.3

c.7970+4_7970+7del) cilt biyopsi ve kan örneklerinde ekzon atlanması sonrası erken sonlandırma kodunu oluştuğunu gözlemledik. Cilt biyopsisi örneklerinde tüm transkriptom analizlerinde, *NF1* transkript düzeylerinin kontrollere göre olgulara istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük gözlemlenmesi (FDR $p=0.0049$ $p<0.05$; Fold Change: -2.0537/-1.0382) NMD mekanizması ile uyumluydu. Hedefli PCR ile çoğaltılan transkriptlerde mutant ampliconlara ait bantların, yabanıl tip alele ait transkript amplicon bantlarından daha zayıf olması da NMD mekanizmasını destekler nitelikteydi (Şekil 4.7). Ancak kan örneklerinde olguların tüm transkriptom veri seti içerisinde *NF1* transkript düzeyleri nisbeten kontrollerden düşük olmakla birlikte, istatistiksel olarak olgu ve kontroller arasında anlamlı anlamlı farklılık göstermedi (FDR $p=0.9999$ $p<0.05$; Fold Change: -1.2061/-0.2704). Zetoune ve ark. tarafından fare modellerinde yapılan bir çalışmada farklı dokularda NMD etkinliğinin farklı olduğu rapor edilmiştir (Zetoune vd., 2008). Linde ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada, farklı hücre hatları ve nazal epitelyal hücrelerde *CFTR* nonsens transkriptlerinin farklı düzeylerde degradasyonuna neden olacak şekilde değişken NMD etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (Linde vd., 2007). Bulgularımız ileri çalışmalarla bu değişkenliğin RNA ve protein düzeyinde daha detaylı araştırılması ve aynı bireyin farklı dokuları arasında, ya da bireyler arası genetik ve epigenetik olası farklılık kaynaklarının fonksiyonel olarak ortaya koyulması gerektiğini destekler niteliktedir.

NF1 nöronlar, indüklenmiş nöronal hücreler, melanositler, Schwann hücreleri, nörofibromlar ve farklılaşmış MPNST'ler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde etki gösteren bir hastalıktır. Yapmış olduğumuz çalışma NF1'in kan ve cilt biyopsi gibi farklı hücrelerde patolojisi üzerinde etkilerini gözlemlediğimiz bir çalışmadır. Ancak hücre tipleri, NF1 genotipleri ve veri oluşturmak için kullanılan yöntemler nedeniyle doğrudan karşılaştırmalar zordur, ancak bu çalışmalar, NF1 için önemli olan biyobelirteçleri, ilaç hedeflerini ve moleküler yolları tanımlama isteğini ve ihtiyacını karşılamak için önemlidir.

Transkriptom bulgularımızın IPA (QIAGEN Inc., <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) ile analizi sonucunda nörofibrominin ilişkili olduğu 2 kanonik yolak tespit edildi.

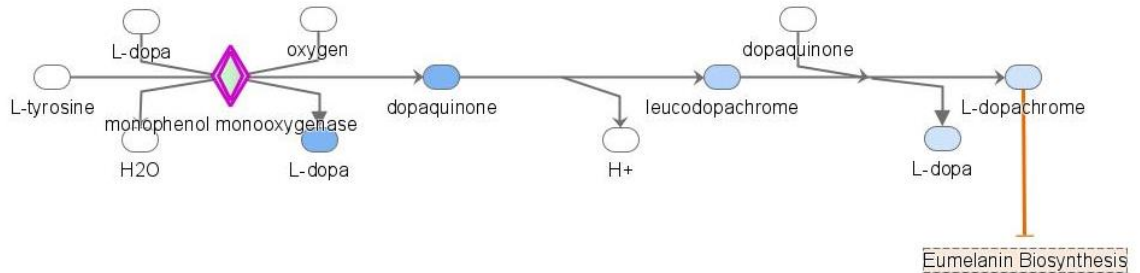
L-Dopakrom Yolağı ve Nörofibromin İlişkisi

Çalışmamızdaki olgu ve kontrollere ait cilt biyopsisi transkriptom bulgularının IPA ile (QIAGEN Inc., <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) kanonik yolak analizinde L-dopakrom kanonik yolağında iki grup arasında anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptandı. L-dopakrom yolağında yer alan iki enzim olan *TYR* ve *TYRP1* transkript düzeylerinin olgularda, kontrollerden anlamlı düzeyde farklı olduğu ($p<0.05$) görüldü.

TYR geni (* OMIM 606933) 11. kromozomun uzun kolunda 11q14.3 konumunda bulunur. İnsan vücudunda cilt ve saç renginin belirlenmesinin yanında, mukoza, retina, pia mater, safra kesesi ve yumurtalıkta da yaygın olarak bulunan melaninin hız sınırlayıcı enzimi olan tirozinaz proteinini kodlar (Zhou vd., 2021).

TYRP1(* OMIM 115501) geni kromozom 9'un uzun kolunda 9q22.33 konumunda bulunur. Tirozinaz ile ilişkili protein 1'i kodlar

L-dopachrome Biosynthesis



Adapted from HumanCyc. © 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

Şekil 5.1.L-dopakrom Biyosentezi

Melanin biyosentezinde yer alan Tirozinaz gen ailesinin üç ana melanozom yardımcı enzimi vardır. Bunlardan ilki Tirozinaz (TYR)'dir. TYR amino asit tirozinin 3,4-dihidroksifenilalanine (DOPA)dönüşümünü ve DOPA'nın dopakinona dönüşümünü gerçekleştiren hız sınırlayıcı bir enzimdir. İkinci enzim dopakrom tautomeraz (TRP-2/DCT) olarak adlandırılan enzimdir. Bu enzim Dopakinonun dopakroma spontan dönüşümünden sonra, dopakromun 5,6-dihidroksiindol2-karboksilik aside (DHICA) dönüşümünü katalize eder. Üçüncü enzim de tirozinaz ile ilişkili protein-1 (TRP-1)'dir. TRP -1 ise DHICA'yı indol-kinonkarboksilik aside dönüştürür (Şekil 5.1). TRP-1 ve

TPR-2/DCT enzimlerinin siyah-kahverengi pigment olan eumelaninin biyosentezinde yer aldıkları tespit edilmiştir (Boucneau vd., 2005).

Boucneau ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan bir araştırmada, bir NF1 hastasına ait normal ve hiperpigment lezyonlu cilt bölgesinden alınan örneğin kültürü ile bir sağlıklı bireyin cilt biyopsisi kültür hücrelerinin gen ekspresyon profillerini mikroarray ile karşılaştırmışlar ve melanosit spesifik dopakrom tautomeraz geni (*DCT*) aktivasyonunda rol alabilecek çeşitli gen ekspresyon farklılıkları belirlemişlerdir. Bu genler arasında *NF1* defektli hücrelerde *KIT* gen ekspresyonunun azaldığı bulgusu bizim verilerimizle uyumludur; biz de olgularımızda *KIT* gen transkriptlerinin kontrollere göre daha az eksprese olduğunu saptadık (kat farkı=-1,64; p=0,04)(Boucneau vd., 2005). Allouche ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada *NF1*'in heterozigotluk kaybının olduğu bir insan embriyonik kök hücre hattını melanositlere farklılaştırarak, cafe-au-lait oluşum mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. NF1 eksikliği olan melanositlerde tirozinaz ve dopakrom tautomeraz gibi melanojenik enzimlerin ve transkripsiyon faktörü MITF'nin yüksek düzeyde eksprese olduğunu Western blot ile göstermişlerdir (Allouche vd., 2015). Bizim çalışmamızda MITF düzeylerinde hasta ve kontroller arasında farklılık yoktu ancak *TYR* ve *TYRP1* transkript düzeyleri hastaların cilt biyopsisi örneklerinde (sırasıyla kat farkı=1.54; p=0.02 ve kat farkı=1,85, p=0.01) genel olarak daha fazla eksprese olmaktadır. Olgularımızın cilt biyopsisi örnekleri cafe-au-lait olan bölgelerden değil sağlıklı-görünümlü bölgeden alınmıştır. Buna rağmen melanin biyosentezi ile ilgili bu iki gen transkript düzeylerinin anlamlı farklılık göstermesi, eumelanin biyosentez yolağının nörofibromin eksikliğinde cafe au lait gelişimine yatkınlık açısından önemli olduğunu desteklemektedir.

EIF2 Sinyal Yolağı

Olgu ve kontrollerin cilt biyopsisi örneklerinden elde edilen transkriptom verilerinin IPA analizlerinde ilişkili bulunduğu bir diğer kanonik yolak EIF2 kanonik yolağı idi (Şekil 5.2).

Ökaryotik başlatma faktörü-2 (*EIF2*) ökaryotik hücrelerde protein sentezi düzenlemesi ve strese karşı verilen hücrel tepkide yol alan bir proteindir. Hücrel stres sırasında eIF2α'nın fosforilasyonu, eIF2'nin başlatıcı Met-tRNA'yı translayon mekanizmasına iletme yeteneğini engeller. EIF2 fosforilasyonunu PKR (protein kinaz R),

PERK (protein kinaz R benzeri endoplazmik retikulum kinaz), *GCN2* (serin/treonin protein kinaz), *HRI* kinaz (Hem tarafından düzenlenen inhibitör kinaz) olarak adlandırılan protein ailesi gerçekleştirir (Jiang & Wek, 2005).

Bu yolağın olgu ve kontroller arasında önemli farklılık gösteren transkriptlere sahip genleri arasında ribozomal biyogenezle ilgili genler *RPS15a*, *RPS28*, *RPS27*, *RPS26*, *RPS21*, *RPS7*, *RPL39*, *RPL35*, *RPL34*, *RPL 31*, *Rpl17* ve *HRAS* yer almaktaydı.

Nörofibromin H-Ras, N-Ras ve K-Ras düzenleyicisi olarak işlev gören bir proteindir. Mutasyon sonucunda gerçekleşen nörofibromin kaybında H-Ras, N-Ras ve K-Ras'ın potansiyel olarak aktif hale geçebilmesi söz konusudur. Nörofibromin kaybı sırasında Ras ailesinin birçok üyesi MPNST hücrelerinde hiperaktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen Ras proteinleri farklı fizyolojik etkiler ortaya çıkarmakta ve sitoplazmik sinyal yollarını aktif hale getirerek tümörjenezin artmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Brossier vd., 2015).

Ribozomal biyogenez genleri ile nörofibromin eksikliği arasındaki ilişkiyi bildiren ilk ve tek çalışma Dasgupta ve ark. tarafından 1 Nisan 2005 tarihinde yapılan çalışmadır. Nörofibrominden yoksun astrosit hücreleri üzerinde yapılan çalışmada Ribozom biyogenezinde bulunan proteinlerin ekspresyonunun, nörofibromin eksikliğinde arttığı bildirilmiştir (Dasgupta vd., 2005). Bizim de yapmış olduğumuz transkriptom çalışmasında 11 adet ribozomal genin hasta cilt biyopsilerinde kontrol cilt biyopsilerine kıyasla ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar ve literatür bilgilerini karşılaştırdığımızda nörofibromin yokluğunda ribozomal biyogenez genlerinin ekspresyon seviyelerinde bir artış olabileceğine dair verileri desteklemektedir. Ayrıca ekspresyon değerlerinde artış bildirdiğimiz ribozomal biyogenez genlerinin pek çok kanserde rolleri farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Çizelge 5.1).



Şekil 5.2. EIF2 sinyal yolağı

Çizelge 5.1. Ribozomal proteinlerin ilişkili oldukları kanser tipleri ekspresyon seviyeleri ve etkiledikleri yollar

Ribozomal Proteinler	Kanser Tipi	Ekspresyon Seviyesi	Hedef Yolak
RPS15A	Kolon Kanseri	Artmış	CDK1 (El Khoury & Nasr, 2021)
	Meme Kanseri	Artmış	Caspase 3/7; ERK1/2, Bad and Chk1 (El Khoury & Nasr, 2021)
	Karaciğer Kanseri	Artmış	Wnt/ β -katenin yolu (El Khoury & Nasr, 2021)
	Pankreas Kanseri	Artmış	Wnt/ β -katenin yolu (El Khoury & Nasr, 2021)
RPS28	Diamond-Blackfan Anemisi		(Kang vd., 2021)
RPS27	Kolon Kanseri	Artmış	JNK/c-Jun (El Khoury & Nasr, 2021)
	Meme Kanseri	Azalmış	FOXO (Lin vd., 2021)
	Melanom	Artmış	mTOR sinyali (Floristán vd., 2020)
	Diamond-Blackfan Anemisi	Artmış	
RPS26	Diamond-Blackfan Anemisi		(Doherty vd., 2010)
RPS21	Prostat Kanseri	Artmış	(Liang vd., 2019)
	Osteosarkoma	Artmış	MAPK (Wang vd., 2020)
RPS7	Akciğer Adenokarsinomu	Artmış	(L. Wu vd., 2021)
	Prostat Kanseri	Artmış	E-cadherin, N-cadherin and Snail; c-Myc (El Khoury & Nasr, 2021)
RPL39	Meme Kanseri	Artmış	(El Khoury & Nasr, 2021)
	Pankreas Kanseri	Artmış	(El Khoury & Nasr, 2021)
RPL35	Kolon Kanseri	↑ DDX10 RPL35↓	E2F (Zhou vd., 2022)
	Nöroblastoma	Artmış	ERK/HIF1 α (W. Wu vd., 2021)
RPL34	Mide kanseri	Artmış	(Liu vd., 2015)
	Akciğer Kanseri	Artmış	(Yang vd., 2016)
	Glioblastoma	Artmış	Bad/Caspase7/PARP (Du vd., 2022)
RPL 31	Prostat Kanseri	Artmış	p53 ve hedefleri: p21 ve MDM2 (El Khoury & Nasr, 2021)
	Kolon Kanseri	Artmış	(El Khoury & Nasr, 2021)
	Mide kanseri	Artmış	JAK-STAT (Wu vd., 2023)
RPL17	Vasküler Düz Kas Büyümesi	Azalmış	KEGG (Smolock vd., 2012)
	Kolorektal Kanser	Artmış	NEK2, β -katenin ve p-ERK (Ko vd., 2022)

BÖLÜM 6

SONUÇ

Çalışmamıza Trakya Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinden Nörofibromatozis Tip 1 geninde 1 kanonik, 2 kanonik olmayan üç farklı kırılma bölgesi varyasyonuna sahip dört ayrı hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen olguların kan ve cilt biyopsisi örneklerinden RNA düzeyinde fonksiyonel olarak yaptığımız çalışmada varyasyonların hem kan hem de cilt biyopsi örneklerinde ekzon atlatmaya neden olduğu tespit edildi.

Yapmış olduğumuz yeni nesil dizilemedeki okumalar ve Sanger dizilemedeki pik boyutları göz önüne alındığında cilt biyopsilerinde NMD mekanizmasının kandan elde edilen örneklerle göre daha etkili olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda RNA transkriptom ile ekzon atlamanın *NF1* geninin okuma düzeylerinin düşüklüğü nedeniyle tespitinin pratik olmadığı ancak elde edilen sonuçlarda ekspresyon değerleri bakımından hastalığın moleküler patogeneze ilişkin anlamlı veriler elde edilebileceği sonucuna ulaştık. RNA transkriptom verileri, nörofibromatozisin en sık klinik bulgularından olan cafe-au-lait lekelerinin olası oluşum mekanizmasında ilişkin lezyonsuz bölgeden alınan örneklerde dahi kanıtlar sunmaktadır. Bunun yanı sıra, bulgularımız, nörofibromin eksikliği ile ribozomal proteinlerin ekspresyonu ve translasyon sürecinde meydana gelen stres ile ilişkili sinyaller arasındaki bağlantıların daha detaylı araştırılması gerektiğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abaloun, Y., & Ajhoun, Y. (2017). [Lisch nodule in neurofibromatosis type 1]. *Pan Afr Med J*, 27, 218. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.27.218.11517> (Nodules de lisch dans la neurofibromatose type 1.)
- Abramowicz, A., & Gos, M. (2015). [Neurofibromin - protein structure and cellular functions in the context of neurofibromatosis type I pathogenesis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 69, 1331-1348. <https://doi.org/10.5604/17322693.1185213> (Neurofibromina – budowa i funkcje białka w kontekście patogenezy nerwiakowłóknikowości typu I.)
- Allouche, J., Bellon, N., Saidani, M., Stanchina-Chatrousse, L., Masson, Y., Patwardhan, A., Gilles-Marsens, F., Delevoye, C., Domingues, S., Nissan, X., Martinat, C., Lemaitre, G., Peschanski, M., & Baldeschi, C. (2015). In vitro modeling of hyperpigmentation associated to neurofibromatosis type 1 using melanocytes derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(29), 9034-9039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501032112>
- Andersen, L. B., Ballester, R., Marchuk, D. A., Chang, E., Gutmann, D. H., Saulino, A. M., Camonis, J., Wigler, M., & Collins, F. S. (1993). A Conserved Alternative Splice in the von Recklinghausen Neurofibromatosis (NF1) Gene Produces Two Neurofibromin Isoforms, Both of Which Have GTPase-Activating Protein Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), 487-495. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.487-495.1993>
- Anderson, J. L., & Gutmann, D. H. (2015). Neurofibromatosis type 1. *Handb Clin Neurol*, 132, 75-86. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-62702-5.00004-4>
- Anna, A., & Monika, G. (2018). Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet*, 59(3), 253-268. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7>
- Ars, E., Serra, E., García, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lázaro, C., & Estivill, X. (2000). Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Human molecular genetics*, 9(2), 237-247.
- Ars, E., Serra, E., García, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lázaro, C., & Estivill, X. (2000). Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet*, 9(2), 237-247. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.237>
- Arun, V., Worrell, L., Wiley, J. C., Kaplan, D. R., & Guha, A. (2013). Neurofibromin interacts with the cytoplasmic Dynein Heavy Chain 1 in melanosomes of human melanocytes. *FEBS Lett*, 587(10), 1466-1473. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.035>
- Assunto, A., Ferrara, U., De Luca, A., Pivonello, C., Lombardo, L., Piscitelli, A., Tortora, C., Pinna, V., Daniele, P., Pivonello, R., Russo, M. G., Limongelli, G., Colao, A., Tartaglia, M., Strisciuglio, P., & Melis, D. (2019). Isoform-specific NF1 mRNA levels correlate with disease severity in Neurofibromatosis type 1. *Orphanet J Rare Dis*, 14(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1223-1>

- Baralle, D., & Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*, 42(10), 737-748. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029538>
- Barron, V. A., & Lou, H. (2012). Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre-mRNA. *Biosci Rep*, 32(2), 131-138. <https://doi.org/10.1042/bsr20110060>
- Barroso-Gil, M., Olinger, E., Ramsbottom, S. A., Molinari, E., Miles, C. G., & Sayer, J. A. (2021). Update of genetic variants in CEP120 and CC2D2A-With an emphasis on genotype-phenotype correlations, tissue specific transcripts and exploring mutation specific exon skipping therapies. *Mol Genet Genomic Med*, 9(12), e1603. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1603>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98(6), 236-238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Bergoug, M., Doudeau, M., Godin, F., Mosrin, C., Vallée, B., & Bénédicti, H. (2020). Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. *Cells*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/cells9112365>
- Bianchessi, D., Ibba, M. C., Saletti, V., Blasa, S., Langella, T., Pattera, R., Cagnoli, G. A., Melloni, G., Scuvera, G., Natacci, F., Cesaretti, C., Finocchiaro, G., & Eoli, M. (2020). Simultaneous Detection of NF1, SPRED1, LZTR1, and NF2 Gene Mutations by Targeted NGS in an Italian Cohort of Suspected NF1 Patients. *Genes (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/genes11060671>
- Bollag, G., McCormick, F., & Clark, R. (1993). Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *Embo j*, 12(5), 1923-1927. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05841.x>
- Boucneau, J., De Schepper, S., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Naeyaert, J. M., & Lambert, J. (2005). Gene expression profiling of cultured human NF1 heterozygous (NF1+/-) melanocytes reveals downregulation of a transcriptional cis-regulatory network mediating activation of the melanocyte-specific dopachrome tautomerase (DCT) gene. *Pigment Cell Res*, 18(4), 285-299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00237.x>
- Brandão, R. D., Tserpelis, D., Gómez García, E., & Blok, M. J. (2012). Detection of exon skipping events in BRCA1 RNA using MLPA kit P002. *Mol Biol Rep*, 39(7), 7429-7433. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1575-2>
- Brinckmann, A., Mischung, C., Bässmann, I., Kühnisch, J., Schuelke, M., Tinschert, S., & Nürnberg, P. (2007). Detection of novel NF1 mutations and rapid mutation prescreening with Pyrosequencing. *Electrophoresis*, 28(23), 4295-4301. <https://doi.org/10.1002/elps.200700118>
- Brossier, N. M., Precht, A. M., Longo, J. F., Barnes, S., Wilson, L. S., Byer, S. J., Brosius, S. N., & Carroll, S. L. (2015). Classic Ras Proteins Promote Proliferation and Survival via Distinct Phosphoproteome Alterations in Neurofibromin-Null Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74(6), 568-586. <https://doi.org/10.1097/nen.0000000000000201>
- Campen, C. J., & Gutmann, D. H. (2018). Optic Pathway Gliomas in Neurofibromatosis Type 1. *J Child Neurol*, 33(1), 73-81. <https://doi.org/10.1177/0883073817739509>
- Chabot, B., & Shkreta, L. (2016). Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J Cell Biol*, 212(1), 13-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510032>
- Cimino, P. J., & Gutmann, D. H. (2018). Neurofibromatosis type 1. *Handb Clin Neurol*, 148, 799-811. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64076-5.00051-x>

- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*, 17, 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
- Cummings, B. B., Marshall, J. L., Tukiainen, T., Lek, M., Donkervoort, S., Foley, A. R., Bolduc, V., Waddell, L. B., Sandaradura, S. A., O'Grady, G. L., Estrella, E., Reddy, H. M., Zhao, F., Weisburd, B., Karczewski, K. J., O'Donnell-Luria, A. H., Birnbaum, D., Sarkozy, A., Hu, Y., . . . MacArthur, D. G. (2017). Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med*, 9(386). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal5209>
- Danglot, G., Régnier, V., Fauvet, D., Vassal, G., Kujas, M., & Bernheim, A. (1995). Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. *Hum Mol Genet*, 4(5), 915-920. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.915>
- Dasgupta, B., Yi, Y., Chen, D. Y., Weber, J. D., & Gutmann, D. H. (2005). Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res*, 65(7), 2755-2760. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-4058>
- de Klerk, E., & t Hoen, P. A. (2015). Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet*, 31(3), 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.01.001>
- Doherty, L., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M. F., Clinton, C., Schneider, H. E., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Glader, B., Arceci, R. J., Farrar, J. E., Atsidaftos, E., Lipton, J. M., Gleizes, P. E., & Gazda, H. T. (2010). Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet*, 86(2), 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.12.015>
- Douben, H. C. W., Nellist, M., van Unen, L., Elfferich, P., Kasteleijn, E., Hoogeveen-Westerveld, M., Louwen, J., van Veghel-Plandsoen, M., de Valk, W., Saris, J. J., Hendriks, F., Korpershoek, E., Hoefsloot, L. H., van Vliet, M., van Bever, Y., van de Laar, I., Aten, E., Lachmeijer, A. M. A., Taal, W., . . . van Ham, T. J. (2022). High-yield identification of pathogenic NF1 variants by skin fibroblast transcriptome screening after apparently normal diagnostic DNA testing. *Hum Mutat*, 43(12), 2130-2140. <https://doi.org/10.1002/humu.24487>
- Du, C., Wang, T., Jia, J., Li, J., Xiao, Y., Wang, J., Mao, P., Wang, N., Shi, L., & Wang, M. (2022). Suppression of RPL34 Inhibits Tumor Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Glioblastoma. *Appl Biochem Biotechnol*, 194(8), 3494-3506. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03857-0>
- Ece Solmaz, A., Isik, E., Atik, T., Ozkinay, F., & Onay, H. (2021). Mutation spectrum of the NF1 gene and genotype-phenotype correlations in Turkish patients: Seventeen novel pathogenic variants. *Clin Neurol Neurosurg*, 208, 106884. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2021.106884>
- El Khoury, W., & Nasr, Z. (2021). Deregulation of ribosomal proteins in human cancers. *Biosci Rep*, 41(12). <https://doi.org/10.1042/bsr20211577>
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjöstedt, E., Lundberg, E., Szgyarto, C. A., Skogs, M., Takanen, J. O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., . . . Uhlén, M. (2014). Analysis of the human tissue-

- specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 13(2), 397-406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Farschtschi, S., Mautner, V. F., McLean, A. C. L., Schulz, A., Friedrich, R. E., & Rosahl, S. K. (2020). The Neurofibromatoses. *Dtsch Arztebl Int*, 117(20), 354-360. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0354>
- Floristán, A., Morales, L., Hanniford, D., Martinez, C., Castellano-Sanz, E., Dolgalev, I., Ulloa-Morales, A., Vega-Saenz de Miera, E., Moran, U., Darvishian, F., Osman, I., Kirchhoff, T., & Hernando, E. (2020). Functional analysis of RPS27 mutations and expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 33(3), 466-479. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12841>
- Friedman, J. M. (2002). Neurofibromatosis 1: clinical manifestations and diagnostic criteria. *J Child Neurol*, 17(8), 548-554; discussion 571-542, 646-551. <https://doi.org/10.1177/088307380201700802>
- Gutmann, D. H., Aylsworth, A., Carey, J. C., Korf, B., Marks, J., Pyeritz, R. E., Rubenstein, A., & Viskochil, D. (1997). The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *Jama*, 278(1), 51-57.
- Gutmann, D. H., Ferner, R. E., Listernick, R. H., Korf, B. R., Wolters, P. L., & Johnson, K. J. (2017). Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17004. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.4>
- Gutmann, D. H., Geist, R. T., Rose, K., & Wright, D. E. (1995). Expression of two new protein isoforms of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, in muscle tissues. *Dev Dyn*, 202(3), 302-311. <https://doi.org/10.1002/aja.1002020309>
- Hentze, M. W., & Kulozik, A. E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*, 96(3), 307-310. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80542-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80542-5)
- Hirbe, A. C., & Gutmann, D. H. (2014). Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol*, 13(8), 834-843. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70063-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70063-8)
- Ho, I. S., Hannan, F., Guo, H. F., Hakker, I., & Zhong, Y. (2007). Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J Neurosci*, 27(25), 6852-6857. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0933-07.2007>
- Huson, S. M., Harper, P. S., & Compston, D. A. (1988). Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain*, 111 (Pt 6), 1355-1381. <https://doi.org/10.1093/brain/111.6.1355>
- Jiang, H. Y., & Wek, R. C. (2005). GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem J*, 385(Pt 2), 371-380. <https://doi.org/10.1042/bj20041164>
- Johnston, J. J., Lewis, K. L., Ng, D., Singh, L. N., Wynter, J., Brewer, C., Brooks, B. P., Brownell, I., Candotti, F., Gonsalves, S. G., Hart, S. P., Kong, H. H., Rother, K. I., Sokolic, R., Solomon, B. D., Zein, W. M., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Mullikin, J. C., & Biesecker, L. G. (2015). Individualized iterative phenotyping for genome-wide analysis of loss-of-function mutations. *Am J Hum Genet*, 96(6), 913-925. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.013>

- Johnston, J. J., Rubinstein, W. S., Facio, F. M., Ng, D., Singh, L. N., Teer, J. K., Mullikin, J. C., & Biesecker, L. G. (2012). Secondary variants in individuals undergoing exome sequencing: screening of 572 individuals identifies high-penetrance mutations in cancer-susceptibility genes. *Am J Hum Genet*, 91(1), 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.021>
- Kang, J., Brajanovski, N., Chan, K. T., Xuan, J., Pearson, R. B., & Sanij, E. (2021). Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 323. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00728-8>
- Ko, M. J., Seo, Y. R., Seo, D., Park, S. Y., Seo, J. H., Jeon, E. H., Kim, S. W., Park, K. U., Koo, D. B., Kim, S., Bae, J. H., Song, D. K., Cho, C. H., Kim, K. S., & Lee, Y. H. (2022). RPL17 Promotes Colorectal Cancer Proliferation and Stemness through ERK and NEK2/ β -catenin Signaling Pathways. *J Cancer*, 13(8), 2570-2583. <https://doi.org/10.7150/jca.69428>
- Korf, B. R. (2013). Neurofibromatosis. *Handb Clin Neurol*, 111, 333-340. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52891-9.00039-7>
- Koster, R., Brandão, R. D., Tserpelis, D., van Roozendaal, C. E. P., van Oosterhoud, C. N., Claes, K. B. M., Paulussen, A. D. C., Sinnema, M., Vreeburg, M., van der Schoot, V., Stumpel, C., Broen, M. P. G., Spruijt, L., Jongmans, M. C. J., Lesnik Oberstein, S. A. J., Plomp, A. S., Misra-Isrie, M., Duijkers, F. A., Louwers, M. J., . . . Blok, M. J. (2021). Pathogenic neurofibromatosis type 1 (NF1) RNA splicing resolved by targeted RNAseq. *NPJ Genom Med*, 6(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41525-021-00258-w>
- Kremer, L. S., Bader, D. M., Mertes, C., Kopajtich, R., Pichler, G., Iuso, A., Haack, T. B., Graf, E., Schwarzmayer, T., Terrile, C., Koňářiková, E., Repp, B., Kastenmüller, G., Adamski, J., Lichtner, P., Leonhardt, C., Funalot, B., Donati, A., Tiranti, V., . . . Prokisch, H. (2017). Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun*, 8, 15824. <https://doi.org/10.1038/ncomms15824>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015(11), 951-969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost*, 45(7), 661-673. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446>
- Laczmańska, I., Szczepaniak, M., Jakubiak, A., & Stembalska, A. (2014). Exonic deletions in the NF1 gene in patients with neurofibromatosis type I from the lower Silesian region of Poland. *Adv Clin Exp Med*, 23(4), 517-521. <https://doi.org/10.17219/acem/37216>
- Laurito, S., Di Pierri, J., & Roqué, M. (2015). [Neurofibromatosis type 1. Splicing mutation detected by MLPA and DNA sequencing in Argentina]. *Medicina (B Aires)*, 75(2), 91-94. (Neurofibromatosis tipo I. Mutación de splicing detectada por MLPA y secuenciación en la Argentina.)
- Le, L. Q., & Parada, L. F. (2007). Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene*, 26(32), 4609-4616. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210261>
- Legius, E., Messiaen, L., Wolkenstein, P., Pancza, P., Avery, R. A., Berman, Y., Blakeley, J., Babovic-Vuksanovic, D., Cunha, K. S., Ferner, R., Fisher, M. J., Friedman, J. M., Gutmann, D. H., Kehrer-Sawatzki, H., Korf, B. R., Mautner, V.

- F., Peltonen, S., Rauen, K. A., Riccardi, V., . . . Plotkin, S. R. (2021). Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation. *Genet Med*, 23(8), 1506-1513. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01170-5>
- Leier, A., Bedwell, D. M., Chen, A. T., Dickson, G., Keeling, K. M., Kesterson, R. A., Korf, B. R., Marquez Lago, T. T., Müller, U. F., Popplewell, L., Zhou, J., & Wallis, D. (2020). Mutation-Directed Therapeutics for Neurofibromatosis Type I. *Mol Ther Nucleic Acids*, 20, 739-753. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.04.012>
- Liang, Z., Mou, Q., Pan, Z., Zhang, Q., Gao, G., Cao, Y., Gao, Z., Pan, Z., & Feng, W. (2019). Identification of candidate diagnostic and prognostic biomarkers for human prostate cancer: RPL22L1 and RPS21. *Med Oncol*, 36(6), 56. <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1283-z>
- Lin, Z., Peng, R., Sun, Y., Zhang, L., & Zhang, Z. (2021). Identification of ribosomal protein family in triple-negative breast cancer by bioinformatics analysis. *Biosci Rep*, 41(1). <https://doi.org/10.1042/bsr20200869>
- Linde, L., Boelz, S., Neu-Yilik, G., Kulozik, A. E., & Kerem, B. (2007). The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells. *Eur J Hum Genet*, 15(11), 1156-1162. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201889>
- Liu, H., Liang, S., Yang, X., Ji, Z., Zhao, W., Ye, X., & Rui, J. (2015). RNAi-mediated RPL34 knockdown suppresses the growth of human gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 34(5), 2267-2272. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4219>
- Ly, K. I., & Blakeley, J. O. (2019). The Diagnosis and Management of Neurofibromatosis Type 1. *Med Clin North Am*, 103(6), 1035-1054. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.07.004>
- Maruoka, R., Takenouchi, T., Torii, C., Shimizu, A., Misu, K., Higasa, K., Matsuda, F., Ota, A., Tanito, K., Kuramochi, A., Arima, Y., Otsuka, F., Yoshida, Y., Moriyama, K., Niimura, M., Saya, H., & Kosaki, K. (2014). The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study. *Genet Test Mol Biomarkers*, 18(11), 722-735. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0109>
- McClatchey, A. I. (2007). Neurofibromatosis. *Annu Rev Pathol*, 2, 191-216. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091940>
- Messiaen, L., & Wimmer, K. (2008). NF1 mutational spectrum. In *Neurofibromatoses* (Vol. 16, pp. 63-77). Karger Publishers.
- Miraglia, E., Moliterni, E., Iacovino, C., Roberti, V., Laghi, A., Moramarco, A., & Giustini, S. (2020). Cutaneous manifestations in neurofibromatosis type 1. *Clin Ter*, 171(5), e371-e377. <https://doi.org/10.7417/ct.2020.2242>
- Mo, J., Moye, S. L., McKay, R. M., & Le, L. Q. (2022). Neurofibromin and suppression of tumorigenesis: beyond the GAP. *Oncogene*, 41(9), 1235-1251. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02156-y>
- Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays*, 25(12), 1147-1149. <https://doi.org/10.1002/bies.10394>
- Nishi, T., Lee, P. S., Oka, K., Levin, V. A., Tanase, S., Morino, Y., & Saya, H. (1991). Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene*, 6(9), 1555-1559.

- Perocchi, F., Xu, Z., Clauder-Münster, S., & Steinmetz, L. M. (2007). Antisense artifacts in transcriptome microarray experiments are resolved by actinomycin D. *Nucleic Acids Res*, 35(19), e128. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm683>
- Philpott, C., Tovell, H., Frayling, I. M., Cooper, D. N., & Upadhyaya, M. (2017). The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Hum Genomics*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0109-3>
- Pros, E., Fernández-Rodríguez, J., Canet, B., Benito, L., Sánchez, A., Benavides, A., Ramos, F. J., López-Ariztegui, M. A., Capellá, G., Blanco, I., Serra, E., & Lázaro, C. (2009). Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Hum Mutat*, 30(3), 454-462. <https://doi.org/10.1002/humu.20933>
- Pros, E., Gómez, C., Martín, T., Fábregas, P., Serra, E., & Lázaro, C. (2008). Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum Mutat*, 29(9), E173-193. <https://doi.org/10.1002/humu.20826>
- Pros, E., Larriba, S., López, E., Ravella, A., Gili, M. L., Kruyer, H., Valls, J., Serra, E., & Lázaro, C. (2006). NF1 mutation rather than individual genetic variability is the main determinant of the NF1-transcriptional profile of mutations affecting splicing. *Hum Mutat*, 27(11), 1104-1114. <https://doi.org/10.1002/humu.20396>
- Sabbagh, A., Pasmant, E., Imbard, A., Luscan, A., Soares, M., Blanché, H., Laurendeau, I., Ferkal, S., Vidaud, M., Pinson, S., Bellanné-Chantelot, C., Vidaud, D., Parfait, B., & Wolkenstein, P. (2013). NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience. *Hum Mutat*, 34(11), 1510-1518. <https://doi.org/10.1002/humu.22392>
- Saeidian, A. H., Youssefian, L., Vahidnezhad, H., & Uitto, J. (2020). Research Techniques Made Simple: Whole-Transcriptome Sequencing by RNA-Seq for Diagnosis of Monogenic Disorders. *J Invest Dermatol*, 140(6), 1117-1126.e1111. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.032>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Scheffzek, K., & Welte, S. (2012). Pleckstrin homology (PH) like domains - versatile modules in protein-protein interaction platforms. *FEBS Lett*, 586(17), 2662-2673. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.006>
- Scotti, M. M., & Swanson, M. S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet*, 17(1), 19-32. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.3>
- Shofty, B., Constantini, S., & Ben-Shachar, S. (2015). Advances in Molecular Diagnosis of Neurofibromatosis Type 1. *Semin Pediatr Neurol*, 22(4), 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2015.10.007>
- Skuse, G. R., & Cappione, A. J. (1997). RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). *Hum Mol Genet*, 6(10), 1707-1712. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.10.1707>
- Smolock, E. M., Korshunov, V. A., Glazko, G., Qiu, X., Gerloff, J., & Berk, B. C. (2012). Ribosomal protein L17, Rpl17, is an inhibitor of vascular smooth muscle growth and carotid intima formation. *Circulation*, 126(20), 2418-2427. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.125971>
- Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., & Gatta, V. (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*, 13(3), 3245-3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>

- Tamura, R. (2021). Current Understanding of Neurofibromatosis Type 1, 2, and Schwannomatosis. *Int J Mol Sci*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115850>
- Trovó-Marqui, A. B., & Tajara, E. H. (2006). Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*, 70(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00639.x>
- Tucker, T., Schnabel, C., Hartmann, M., Friedrich, R. E., Frieling, I., Kruse, H. P., Mautner, V. F., & Friedman, J. M. (2009). Bone health and fracture rate in individuals with neurofibromatosis 1 (NF1). *J Med Genet*, 46(4), 259-265. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.061895>
- Venkataramany, A. S., Schieffer, K. M., Lee, K., Cottrell, C. E., Wang, P. Y., Mardis, E. R., Cripe, T. P., & Chandler, D. S. (2022). Alternative RNA splicing defects in pediatric cancers: new insights in tumorigenesis and potential therapeutic vulnerabilities. *Ann Oncol*, 33(6), 578-592. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.03.011>
- Viskochil, D. (2002). Genetics of neurofibromatosis 1 and the NF1 gene. *J Child Neurol*, 17(8), 562-570; discussion 571-562, 646-551. <https://doi.org/10.1177/088307380201700804>
- Wai, H., Douglas, A. G. L., & Baralle, D. (2019). RNA splicing analysis in genomic medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 108, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.009>
- Wai, H. A., Lord, J., Lyon, M., Gunning, A., Kelly, H., Cibir, P., Seaby, E. G., Spiers-Fitzgerald, K., Lye, J., Ellard, S., Thomas, N. S., Bunyan, D. J., Douglas, A. G. L., & Baralle, D. (2020). Blood RNA analysis can increase clinical diagnostic rate and resolve variants of uncertain significance. *Genet Med*, 22(6), 1005-1014. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0766-9>
- Walker, J. A., & Upadhyaya, M. (2018). Emerging therapeutic targets for neurofibromatosis type 1. *Expert Opin Ther Targets*, 22(5), 419-437. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1465931>
- Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Andersen, L. B., Letcher, R., Odeh, H. M., Saulino, A. M., Fountain, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A. L., & et al. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*, 249(4965), 181-186. <https://doi.org/10.1126/science.2134734>
- Wang, T., Wang, Z. Y., Zeng, L. Y., Gao, Y. Z., Yan, Y. X., & Zhang, Q. (2020). Down-Regulation of Ribosomal Protein RPS21 Inhibits Invasive Behavior of Osteosarcoma Cells Through the Inactivation of MAPK Pathway. *Cancer Manag Res*, 12, 4949-4955. <https://doi.org/10.2147/cmar.S246928>
- Williams, V. C., Lucas, J., Babcock, M. A., Gutmann, D. H., Korf, B., & Maria, B. L. (2009). Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics*, 123(1), 124-133. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3204>
- Wilson, B. N., John, A. M., Handler, M. Z., & Schwartz, R. A. (2021). Neurofibromatosis type 1: New developments in genetics and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(6), 1667-1676.
- Wimmer, K., Schamschula, E., Wernstedt, A., Traunfellner, P., Amberger, A., Zschocke, J., Kroisel, P., Chen, Y., Callens, T., & Messiaen, L. (2020). AG-exclusion zone revisited: Lessons to learn from 91 intronic NF1 3' splice site mutations outside the canonical AG-dinucleotides. *Hum Mutat*, 41(6), 1145-1156. <https://doi.org/10.1002/humu.24005>

- Wu, F., Liu, Y., Hu, S., & Lu, C. (2023). Ribosomal protein L31 (RPL31) inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Heliyon*, 9(2), e13076. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13076>
- Wu, L., Kou, F., Ji, Z., Li, B., Zhang, B., Guo, Y., & Yang, L. (2021). SMYD2 promotes tumorigenesis and metastasis of lung adenocarcinoma through RPS7. *Cell Death Dis*, 12(5), 439. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03720-w>
- Wu, T., Yang, H., Xu, L., Huang, Q., He, Q., Wu, R., & Mu, Y. Z. (2022). NF1 Gene Novel Splicing Mutations in a Chinese Family with Neurofibromatosis Type 1: Case Series. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 15, 2345-2351. <https://doi.org/10.2147/ccid.S388045>
- Wu, W., Yu, N., Li, F., Gao, P., Lin, S., & Zhu, Y. (2021). RPL35 promotes neuroblastoma progression via the enhanced aerobic glycolysis. *Am J Cancer Res*, 11(11), 5701-5714.
- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L., & Shi, L. (2013). Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett*, 340(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.025>
- Yang, S., Cui, J., Yang, Y., Liu, Z., Yan, H., Tang, C., Wang, H., Qin, H., Li, X., Li, J., Wang, W., Huang, Y., & Gao, H. (2016). Over-expressed RPL34 promotes malignant proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Gene*, 576(1 Pt 3), 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.053>
- Yépez, V. A., Mertes, C., Müller, M. F., Klaproth-Andrade, D., Wachutka, L., Frésard, L., Gusic, M., Scheller, I. F., Goldberg, P. F., Prokisch, H., & Gagneur, J. (2021). Detection of aberrant gene expression events in RNA sequencing data. *Nat Protoc*, 16(2), 1276-1296. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00462-5>
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*, 141(11), 1544-1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>
- Zetoune, A. B., Fontanière, S., Magnin, D., Anczuków, O., Buisson, M., Zhang, C. X., & Mazoyer, S. (2008). Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. *BMC Genet*, 9, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-83>
- Zhou, S., Zeng, H., Huang, J., Lei, L., Tong, X., Li, S., Zhou, Y., Guo, H., Khan, M., Luo, L., Xiao, R., Chen, J., & Zeng, Q. (2021). Epigenetic regulation of melanogenesis. *Ageing Res Rev*, 69, 101349. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101349>
- Zhou, X., Liu, Z., He, T., Zhang, C., Jiang, M., Jin, Y., Wu, Z., Gu, C., Zhang, W., & Yang, X. (2022). DDX10 promotes the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via splicing RPL35. *Cancer Cell Int*, 22(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02478-1>

EKLER

EK-1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (TÜBİTAK) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Nörofibromatozis Tip 1 Geninde Belirlenen Kırılma Bölgesi Varyasyonlarının RNA Düzeyindeki Etkilerinin Araştırılması
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Nörofibromatozis Tip 1 Genindeki Belli Mutasyonların Gen İfade Düzeylerine Etkisinin Araştırılması
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Dr. Öğr. Üyesi Selma Demir, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
- **Araştırmanın amacı:** Nörofibromatozis Tip-1 hastalığı ciltte yaygın sütlü kahverengi lekeler başta olmak üzere çeşitli cilt problemlerine, görme kusurlarına, bazı hastalarda tekrarlayan kemik kırıklarına neden olabilen çok farklı sistemleri etkileyebilen genetik bir hastalıktır. Nörofibromatozis tanısı alan hastalardan alınan cilt fibroblastları ve kan örnekleri ile NF1 geninde kırılma bölgesi varyasyonlarının RNA sekans analiz yöntemiyle tespit edilmesi amaçlanmaktadır. RNA analizinde kırılma bölgesi varyasyonlarının NF1 dışı etkilerinin de belirlenebilme potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca sağlıklı kontrollere ait transkriptom verisi elde edilecektir.
- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Yüksek Lisans Tez Çalışması
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 15.11.2021- 6ay
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 8

Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü: Nörofibromatozisli hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden, Deri ve Zührevi Hastalıklar poliklinikleri biriminde bulunan tam donanımlı tedavi odasında, Dr. Öğr. Üys. Sezgi Sankaya Solak tarafından deri biyopsisi alınacaktır. Deri biyopsisi, her gönüllüden 2 adet olmak üzere, 4 mm steril punch biyopsi aleti kullanılarak alınacaktır. Punch biyopsi, deriden tam kat silindir şeklinde doku örneği alınması işlemidir. İşlem yaklaşık 10 dakika

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
09 Aralık 2019 v.1.0

Gönüllünün/Vasisinin imzası:

Sayfa 1/4

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

kadar sürebilmektedir. Biyopsi alınacak bölgeye işlem öncesi lidokain enjeksiyonu yapılarak lokal anestezi sağlanacaktır, işlem sonrası hemostazı sağlamak amacıyla bir adet dikiş atılacaktır. Lidokain bir lokal anestetik olup, bazı durumlarda allerjik reaksiyonlara neden olabilir. Bu nedenle, lidokain enjeksiyonu esnasında enjektöre çekili olarak avil ve dekort hazır bulundurulacaktır. Lidokain enjeksiyonu öncesinde gönüllüye daha önce benzer bir allerjik reaksiyon öyküsü olup olmadığı sorulacaktır. Allerjik reaksiyon öyküsü olan gönüllüler çalışmaya alınmayacaktır. İşlem ile ilgili olası risk, biyopsi alınan alanda kanama olmasıdır. Biyopsi öncesi olası kanama/pıhtılaşma bozuklukları dikkate alınarak gönüllülerde trombosit sayısına bakılacaktır. Trombosit sayısı düşük olan gönüllüler çalışmaya alınmayacaktır. Ayrıca olası kanama/pıhtılaşma riskine karşı biyopsi alınan bölgeye bir adet dikiş atılacaktır. Bunun dışında uygulamanın başka bir riski bulunmamaktadır. Çalışmada yapılacak olan diğer işlemler gönüllüler üzerinde değil, kültür hücrelerinde yapılacaktır.

- **Araştırmanın deneysel kısımları:**
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Bulunmamaktadır.
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Katılımcıya veya yasal vasisine BGOF okutularak, onamı alındıktan sonra çalışmaya dahil edileceği bilgisi verilecektir.
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Doğrudan bireysel bir yarar beklenmemektedir.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** BGOF'u okuyarak çalışmaya katılıp katılmayacağına hür iradesi ile karar vermek.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Araştırmaya hamile veya lohusalar dâhil edilmeyeceklerdir. Bu nedenle fetüs veya süt çocuklarının maruz kalabileceği bir risk bulunmamaktadır.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Kişisel verilerin korunması kanunu dikkate alınarak çalışmaya dahil edilen gönüllülerin her türlü bilgisi isim belirtmeksizin özel bir kodlama ile şifrelenecek ve şifre korumalı bilgisayarda muhafaza edilecektir.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Gönüllüye herhangi bir alternatif yöntem uygulanmayacaktır.
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Araştırmamızda gönüllüye herhangi zarar verici bir durumun gelişmesi beklenmemektedir.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Gönüllülere herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllünün veya yasal vasisinin BGOF'u okuduktan sonra çalışmaya katılmak istemediğini beyan etmesi durumunda araştırmaya katılımı sona erdirilecektir.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi? Evet, araştırma sonunda gönüllülere araştırmada elde edilen sonuçlar ile ilgili bilgi verilecektir.**

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
09. Ağustos 2018 v.1.0

Gönüllünün/Vasisinin imzası:

Sayfa 2/4

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

- Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası: Dr. Öğr. Üyesi Selma Demir, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı.
- Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı: Gönüllülerden alınan biyolojik materyaller uygun koşul ve protokollerde RNA izolasyonu için kullanılacaktır. İzole edilen RNA'lerden transkriptom analizi gerçekleştirilecektir.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
09 Ağustos 2018 v.1.0

Gönüllünün/Vasisinin imzası:

Sayfa 3/4

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediyim ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum.

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
09 Ağustos 2018 v.1.0

Gönüllünün/Vasisinin imzası:

Sayfa 4/4

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- *Gönüllünün; (El yazısı ile)*

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- *Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)*

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- *Açıklamaları yapan araştırmacının*

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih:

EK-2

Etik Kurul Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye						
ARASTIRMA BAŞVURUSU/ONAYTIRMA BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUTP-BAAK 2021/409				
	PROTOKOL ADI	Nörofibrinoma Tip 1 Geninde Belirlenen Kırılma Bölgesi Varyasyonlarının RNA Düzeyindeki Etkilerinin Anayrılması				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi				
	ARASTIRMA MERKEZİ					
	DENETLEYİCİ					
	ARASTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez	Ülke	Çok Merkez	Ülke	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:20/11	Tarih:15.05.2021				
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Selma DEMİR'in sorumluluğunda yapılacak olan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Oryant ÜNLÜ'ne bir çalışmaya onaylama hakkına ilişkin ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşımları ve yöntemleri hakkında anlaşılmış, araştırmaya ilişkin bilgilerin gönüllü ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna bildirilmediği koşullarda ve tüm uygulamalar serbestçe kullanılabilir alınmadan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına ilişkin karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helmholtz (Bölgesel), İki Klinik Uygulamalar Kurulum, TUTP-BAAK Yönergesi					
ÜYELER						
Unvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurum	Ünvan	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülşen ONAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.C. T. F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.C. T. F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.C. T. F. Biyoistatistik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.C. T. F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan UMIT Üye	İç Hastalıkları	T.C. T. F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sema UZUNOĞLU Üye	İç Hastalıkları	T.C. T. F. İç Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Sevgi SARIKAYA SOLAK Üye	Deri ve Zührevi Hastalıklar	T.C. T. F. Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.C. T. F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKÜKLÜ Üye	Halk Sağlığı	T.C. T. F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÖTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.C. T. F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.C. T. F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Servat HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.C. T. F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Doğan ALBAYRAK Üye	Genel Cerrahi	T.C. T. F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Burhan Can ÇANAKÇI Üye		T.C. Diş Hekimliği Fakültesi	E	E H	E H	
Doç. Dr. Hilal KEKİLİCEK Üye		T.C. Sağlık Bilimleri Fakültesi	K	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.C. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilgili
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. /
Doç. Dr. /
Öğr. Gör. Dr. /
Öğr. Öğr. /
Emekli Öğretmen /
Serbest Üye

ÖZ GEÇMİŞ

Eğitim:

Derece	Fakülte / Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Uşak Üniversitesi	2015-2019
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Trakya Üniversitesi	2020-Devam Ediyor

Projeler:

Proje No	Proje Adı	Projedeki Görevi
221S438	Prematüre terminasyon kodonu modulatorlerinin gen ekspresyonu ve nörofibromin restorasyonu üzerine etkilerinin NF1 mutant hücre kültürlerinde araştırılması	Tübitak Araştırma Projesi Yüksek Lisans Bursiyeri