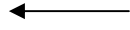
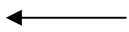


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**(DOKTORA TEZİ )**

**HEREDİTER RETİNOBLASTOMA OLUŞUMUNDA ROL  
OYNAYAN DİĞER GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

**DEMET AKDENİZ ÖDEMİŞ**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. HÜLYA YAZICI**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI  
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2017**

## TEZ ONAYI

### DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Programında Doktora öğrencisi Demet AKDENİZ ÖDEMiŞ tarafından Prof.Dr.Hülya YAZICI'nın danışmanlığında hazırlanan "Hereditör Retinoblastoma Oluşumunda Rol Oynayan Diğer Genlerin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27 /12 /2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
**Jüri Başkanı**

Prof.Dr.Hatice Bilge BECERİR  
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü  
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

  
**Jüri-Danışman**

Prof.Dr.Hülya YAZICI  
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü  
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

  
**Jüri**

Prof.Dr.Rejin KEBUDİ  
İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
Anabilim Dalı

  
**Jüri**

Doç.Dr.Meral YÜKSEL  
Marmara Üniversitesi  
Sağlık Hizmetleri Meslek  
Yüksek Okulu Tıbbi Hiz.ve  
Teknik Bölümü

  
**Jüri**

Doç.Dr.Elif Damla ARISAN  
T.C.Kültür Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Bölümü

**BEYAN**

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

**DEMET AKDENİZ ÖDEMİŞ**

## İTHAF

Kızlarım *Irmak* ve *İpek*'e ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yön veren, yardım ve tavsiyelerde bulunan, tez danışmanım, değerli hocam *Prof.Dr.Hülya Yazıcı*'ya,

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

Tez izleme aşamalarındaki yardımlarından dolayı *Prof.Dr.Rejin Kebudi*'ye,

Hastalara ait klinik bilgilere ulaşımımı sağlayan *Prof.Dr.Samuray Tuncer*'e,

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz *Prof. Dr. Ahmet Kizir*'e

Akademik hayatımda bana destek olan tüm hocalarıma,

Temel Onkoloji Anabilim Dalımızda bulunan, desteklerini esirgemeyen *Betül Çelik, Gözde Kuru Türkcan, Şeref Buğra Tunçer, Arzu Burnuva, Özge Şükrüoğlu Erdoğan, Seda Kılıç Erciyas, Mukaddes Avşar, Orkun Gürbüz, Zübeyde Yalnız Kayım, Büşra Kurt, Yasemin Gider, Arash Adamnezad, Masoumeh Hassani, Türkan Ferhadoğlu* başta olmak üzere tüm meslektaşlarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan sevgili eşim *Mehmet Emin Ödemiş*, kızım *Elif Irmak Ödemiş*, doğumunu sabırsızlıkla beklediğim kızım *İpek Ödemiş*'e ve tüm aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-21460

## İÇİNDEKİLER

|                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------|------------|
| TEZ ONAYI .....                                           | <u>ii</u>  |
| BEYAN.....                                                | <u>iii</u> |
| İTHAF.....                                                | <u>iv</u>  |
| TEŞEKKÜR.....                                             | <u>v</u>   |
| İÇİNDEKİLER .....                                         | <u>vi</u>  |
| TABLolar LİSTESİ.....                                     | <u>ix</u>  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                    | <u>x</u>   |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                     | <u>xi</u>  |
| ÖZET .....                                                | <u>xiv</u> |
| ABSTRACT.....                                             | <u>xv</u>  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                     | <u>1</u>   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                   | <u>4</u>   |
| 2.1. Kanserın Moleküler Genetiği.....                     | <u>4</u>   |
| 2.1.1. Mutasyon Türleri.....                              | <u>6</u>   |
| 2.1.1.1. Küçük Ölçekli Mutasyonlar .....                  | <u>7</u>   |
| 2.1.1.2. Büyük Ölçekli Mutasyonlar .....                  | <u>8</u>   |
| 2.1.2. Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler .....       | <u>8</u>   |
| 2.2. Pediyatrik Kanserler.....                            | <u>9</u>   |
| 2.2.1. Retinoblastoma İnsidansı .....                     | <u>10</u>  |
| 2.2.2. Retinoblastoma Epidemiyolojisi .....               | <u>11</u>  |
| 2.2.3. Retinoblastoma Patolojisi .....                    | <u>12</u>  |
| 2.2.4. Retinoblastoma Genetiği.....                       | <u>13</u>  |
| 2.2.4.1. Kalıtsal (Hereditör) Retinoblastoma .....        | <u>15</u>  |
| 2.2.4.2. Kalıtsal Olmayan (Sporadik) Retinoblastoma ..... | <u>16</u>  |
| 2.2.4.3. Çift Vuruş Hipotezi .....                        | <u>16</u>  |
| 2.2.5. Retinoblastoma Evrelemesi.....                     | <u>17</u>  |
| 2.2.6. Retinoblastomada Klinik Bulgular.....              | <u>20</u>  |
| 2.2.7. Retinoblastomada Tedavi.....                       | <u>22</u>  |
| 2.2.7.1. Kriyoterapi .....                                | <u>22</u>  |
| 2.2.7.2. Termoterapi .....                                | <u>22</u>  |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.7.3. Kemoterapi .....                                            | 23 |
| 2.2.7.4. Radyoterapi .....                                           | 24 |
| 2.2.7.5. Kök hücre kurtarma ile yüksek doz kemoterapi .....          | 24 |
| 2.2.7.6. Cerrahi (Enükleasyon) .....                                 | 25 |
| 2.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS) Sistemi .....                         | 25 |
| 2.3.1. Trusight One Dizileme Paneli .....                            | 26 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                             | 29 |
| 3.1. Materyal .....                                                  | 29 |
| 3.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler .....                           | 29 |
| 3.3. Kullanılan Cihazlar .....                                       | 31 |
| 3.4. Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu .....                            | 32 |
| 3.5. Lenfositten DNA İzolasyonu .....                                | 32 |
| 3.6. DNA Kalite Tayini .....                                         | 33 |
| 3.7. TruSight One Dizileme Panel Protokolü .....                     | 33 |
| 3.7.1. Genomik DNA Tagmentasyonu (İşaretlenip Kesilmesi) .....       | 34 |
| 3.7.2. Tagmente DNA'nın Temizlenmesi .....                           | 34 |
| 3.7.3. Tagmente DNA'nın Çoğaltılması .....                           | 35 |
| 3.7.4. Çoğaltılan DNA'nın Temizlenmesi .....                         | 37 |
| 3.7.5. Probların Hibridizasyonu .....                                | 40 |
| 3.7.6. Hibridize Probların Yakalanması .....                         | 40 |
| 3.7.7. İkinci Hibridizasyon .....                                    | 42 |
| 3.7.8. İkinci Yakalama .....                                         | 43 |
| 3.7.9. Yakalanmış Kütüphanenin Temizlenmesi .....                    | 44 |
| 3.7.10. Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Çoğaltılması .....            | 45 |
| 3.7.11. Çoğaltılan Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Temizlenmesi ..... | 46 |
| 3.7.12. Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Kontrolü .....                | 47 |
| 3.8. Illumina NextSeq 500 Sistemi ve Dizileme Protokolü .....        | 48 |
| 3.8.1. Flow-cell (Akış hücresi) .....                                | 49 |
| 3.8.2. Reaktif Kartuşu .....                                         | 50 |
| 3.8.3. Tampon Kartuşu .....                                          | 50 |
| 3.8.4. Dizileme Protokolü .....                                      | 50 |
| 3.9. VariantStudio Yazılımı ile Veri Analizi .....                   | 51 |
| 3.9.1. Anotasyon .....                                               | 52 |

|                                                                            |                                         |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 3.9.2. Filtreleme .....                                                    | <u>53</u>                               |
| 3.9.3. Sınıflandırma.....                                                  | <u>53</u>                               |
| 3.10. İstatistiksel Analiz.....                                            | <u>53</u>                               |
| 4. BULGULAR.....                                                           | <u>55</u>                               |
| 4.1. DNA Kalite Kontrol Verilerinin Değerlendirilmesi .....                | <u>57</u>                               |
| 4.2. TruSight One Panel Protokolü ve Değerlendirilmesi .....               | <u>58</u>                               |
| 4.3. Hastalara Ait Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....             | <u>59</u>                               |
| 4.4. Genler Arasındaki Fonksiyonel İlişki Analizi .....                    | <u>69</u>                               |
| 4.4.1. Metabolik Yolaklar İle Genlerin İlişkileri .....                    | <u>69</u>                               |
| 4.4.2. Protein-Protein Etkileşim Analizi .....                             | <u>72</u>                               |
| 4.5. Hastalara Ait Klinik ve Genetik Verilerin İstatistiksel Analizi ..... | <u>74</u>                               |
| 5. TARTIŞMA .....                                                          | <u>76</u>                               |
| KAYNAKLAR .....                                                            | <u>93</u>                               |
| HAM VERİLER .....                                                          | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| FORMLAR .....                                                              | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| ETİK KURUL KARARI .....                                                    | <u>102</u>                              |
| PATENT HAKKI İZNİ .....                                                    | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....                                            | <u>105</u>                              |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                             | <u>106</u>                              |

## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tablo 2-1: Uluslararası göz içi Retinoblastoma sınıflaması (ABC Sınıflaması) [43] ....                              | <u>19</u> |
| Tablo 2-2: Retinoblastoma'nın en yaygın klinik özellikleri [4] .....                                                | <u>20</u> |
| Tablo 2-3: TruSight One dizileme panel özellikleri [59] .....                                                       | <u>28</u> |
| Tablo 3-1: Kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlere ait bilgiler .....                                   | <u>29</u> |
| Tablo 3-2: Kullanılan cihazlara ait bilgiler .....                                                                  | <u>31</u> |
| Tablo 3-3: Tam kandan lenfosit izolasyon protokolü .....                                                            | <u>32</u> |
| Tablo 3-4: DNA izolasyon protokolü .....                                                                            | <u>32</u> |
| Tablo 4-1: Hastalara ait klinik özellikler .....                                                                    | <u>55</u> |
| Tablo 4-2: Örneklerle ait spektrofotometrik ölçümler .....                                                          | <u>58</u> |
| Tablo 4-3: Örneklerle ait Qubit ölçümleri .....                                                                     | <u>58</u> |
| Tablo 4-4: Hastalara ait varyant sonuçları .....                                                                    | <u>59</u> |
| Tablo 4-5: R550 hastasına ait analiz sonuçları .....                                                                | <u>59</u> |
| Tablo 4-6: R590 nolu hastaya ait analiz sonuçları .....                                                             | <u>60</u> |
| Tablo 4-7: Aynı aileye mensup R550 ve R590 nolu hastalara ait analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi .....  | <u>61</u> |
| Tablo 4-8: R660 nolu hastaya ait analiz sonuçları .....                                                             | <u>62</u> |
| Tablo 4-9: R663 nolu hastaya ait analiz sonuçları .....                                                             | <u>63</u> |
| Tablo 4-10: Aynı aileye mensup R660 ve R663 nolu hastalara ait analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ..... | <u>64</u> |
| Tablo 4-11: R890 nolu hastaya ait analiz sonuçları .....                                                            | <u>64</u> |
| Tablo 4-12: R893 nolu hastaya ait analiz sonuçları .....                                                            | <u>65</u> |
| Tablo 4-13: Aynı aileye mensup R890 ve R893 nolu hastalara ait analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ..... | <u>66</u> |
| Tablo 4-14: Tüm hastalara ait analiz sonuçları .....                                                                | <u>67</u> |
| Tablo 4-15: Ailelere özgü patojenik varyantlar .....                                                                | <u>68</u> |
| Tablo 4-16: R660 nolu hastaya özgü patojenik varyantlar .....                                                       | <u>68</u> |
| Tablo 4-17: Gen setlerinin ilişkili oldukları metabolik yollar .....                                                | <u>69</u> |
| Tablo 4-18: Fonksiyonel ilişkili genler ve güven skorları .....                                                     | <u>74</u> |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Şekil 2-1: Kanserin çok aşamalı evrimi [19] .....                                                          | <u>6</u>  |
| Şekil 2-2: 20 yaşından küçük hastalarda pediatrik kanser türlerinin sıklığı [26] .....                     | <u>10</u> |
| Şekil 2-3: Gözün yapısı [35] .....                                                                         | <u>13</u> |
| Şekil 2-4: <i>RB1</i> geninin 13. kromozom üzerindeki sitogenetik pozisyonu [36] .....                     | <u>13</u> |
| Şekil 2-5: RB yolağı [38] .....                                                                            | <u>14</u> |
| Şekil 2-6: Kalıtsal retinoblastomada görülen bir soyağacı örneği [39] .....                                | <u>15</u> |
| Şekil 2-7: Sporadik retinoblastoma soyağacı [39] .....                                                     | <u>16</u> |
| Şekil 2-8: Çift vuruş hipotezi [39] .....                                                                  | <u>17</u> |
| Şekil 2-9: Lökokori görünümü [4] .....                                                                     | <u>20</u> |
| Şekil 2-10: Endofitik büyüme [4] .....                                                                     | <u>21</u> |
| Şekil 2-11: Ekzofitik büyüme [4] .....                                                                     | <u>21</u> |
| Şekil 2-12: Yeni nesil dizileme iş akışı [53] .....                                                        | <u>26</u> |
| Şekil 2-13: TruSight One serisi global gen içeriğine katkıda bulunanlar [59] .....                         | <u>27</u> |
| Şekil 2-14: Prob ayak izi [59] .....                                                                       | <u>27</u> |
| Şekil 3-1: TruSight One dizileme panel akış şeması .....                                                   | <u>33</u> |
| Şekil 3-2: TruSeq indeks plaka fiktürü (96 kütüphane) .....                                                | <u>36</u> |
| Şekil 3-3: Örneklerin PCR sonrası, zenginleştirme öncesi kütüphane dağılımlarına ilişkin diyagramlar ..... | <u>39</u> |
| Şekil 3-4: Cihaz kısımları .....                                                                           | <u>49</u> |
| Şekil 3-5: Akış hücresi kartuşu .....                                                                      | <u>49</u> |
| Şekil 3-6: Reaktif kartuşu .....                                                                           | <u>50</u> |
| Şekil 3-7: Tampon kartuşu .....                                                                            | <u>50</u> |
| Şekil 3-8: VariantStudio yazılımı ile kapsamlı veri analizi ve yorumu [63] .....                           | <u>52</u> |
| Şekil 4-1: FN096 ailesine ait soy ağacı .....                                                              | <u>56</u> |
| Şekil 4-2: FN106 ailesine ait soy ağacı .....                                                              | <u>56</u> |
| Şekil 4-3: FN129 ailesine ait soy ağacı .....                                                              | <u>57</u> |
| Şekil 4-4: Kompleman ve koagülasyon kaskadında etkili genler .....                                         | <u>70</u> |
| Şekil 4-5: <i>Staphylococcus aureus</i> enfeksiyonunda etkili genler .....                                 | <u>71</u> |
| Şekil 4-6: Hücresel fagositoz aşamasında etkili genler .....                                               | <u>72</u> |
| Şekil 4-7: Protein-protein etkileşimi .....                                                                | <u>73</u> |

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

ACADS: Acyl-CoA dehydrogenase short chain  
AMD: Age-related macular degeneration  
APOC3: Apolipoprotein C3  
ARAT: Acyl-CoA: retinol acyltransferase  
Ark.: Arkadaşları  
ATP6V0A4: ATPase H<sup>+</sup> transporting V0 subunit a4  
ATRA: All-trans retinoic acid  
BCOR: BCL6 corepressor  
bp: Baz çifti  
C2: Complement C2  
CDH11: cadherin 11  
CFB: Complement factor B  
CLEC7A: C-type lectin domain containing 7A  
CREBBP: CREB Binding Protein  
CX3CR1: C-X3-C motif chemokine receptor 1  
CYP7A1: Cytochrome P450 7A1  
Cyp26b1: Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1  
DAVID: The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery  
dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database  
DEK: DEK Proto-Oncogene  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
DSPP: Dentin sialophosphoprotein  
E2F3: E2F transcription factor 3  
EBRT: External Beam Radiation Therapy  
FGF19: Fibroblast growth factor 19  
FGFR4: Fibroblast growth factor receptor 4  
FUT6: Fucosyltransferase 6  
g: Gram

GBE1: 1,4-alpha-glucan branching enzyme 1  
GHRL: Ghrelin and obestatin prepropeptide  
GNPAT: Glyceronephosphate O-acyltransferase  
HBD: Hemoglobin subunit delta  
HFE: Hemochromatosis  
HGMD: Human Gene Mutation Database  
HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee  
HPV: Human papillomavirus  
ICCG: The International Collaboration for Clinical Genomics  
IMRT: Intensity Modulated Radiotherapy  
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
KIF14: Kinesin Family Member 14  
KRT85: Keratin 85  
LOH: Loss of heterozygosity  
MBL2: Mannose Binding Lectin 2  
MCCC2: Methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2  
MDM4: MDM4, P53 Regulator  
 $\mu$ L: Mikrolitre  
mL: Mililitre  
miRNA: MikroRNA  
MUTYH: MutY DNA Glycosylase  
MYCN: MYCN proto-oncogene  
NHS: The national health service  
Npt2a: Sodium-dependent phosphate transport protein 2A  
NQO1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1  
PCGP: Pediatric Cancer Genome Project  
pRB: Retinoblastoma protein  
RA: Retinoik Asit  
RAR: Retinoik Asit Reseptörü  
RARE: Retinoic Acid Response Elements

RXR: Retinoid X receptor

RB1: RB transcriptional corepressor 1

RHAG: Rh associated glycoprotein

RPE: Retinal pigment epithelium

RPGRIP1: RPGR Interacting Protein 1

RPM: Revolutions per Minute

SCAD: Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase

SCADD: Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency

SERPINA1: Serpin family A member 1

SLC34A1: Solute carrier family 34 member 1

TLR2: Toll-like receptor 2

TYR: Tyrosinase

TPOG: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu

UGT1A1: UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1

## ÖZET

Akdeniz Ödemiş, D. (2017). Herediter Retinoblastoma Oluşumunda Rol Oynayan Diğer Genlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Retinoblastoma retinada ortaya çıkan ve çocuklarda en sık görülen intraoküler malignitedir. Retinoblastoma oluşumunda önemli genetik etkenlerin rol aldığı bilinmektedir. Klinik önemi ve genetik sebebi arasındaki kuvvetli bağlardan dolayı, retinoblastoma kalıtsal kanserlerin prototipi sayılmaktadır. Bugüne kadar ki literatür bilgisine göre hastalığın retinoblastoma geni olan *RBI* genindeki mutasyonlar tarafından başlatıldığı düşünülmektedir. *RBI* genindeki genomik hasarın gerçek nedeni net olarak bilinmemekte ancak retinoblastoma, çevreden bağımsız olarak tüm ırklarda sabit oranda ortaya çıkmaktadır. Bir retinal tümör, gelişmekte olan bir retinal hücrede *RBI* geninin ikinci kopyasının da hasar gördüğü durumda gelişebilmektedir. Ancak *RBI* geninde yapılan mutasyon taramaları sonucunda negatif bulunan hastalarda hastalığın nasıl oluştuğu konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır. Sunulan doktora tez çalışmasında; ailesinde retinoblastoma hastalığı hikayesi olup *RBI* gen mutasyonu saptanmamış yüksek riskli ailelerde retina oluşumunda rol oynayan genlerin de içinde bulunduğu, klinik açıdan karsinogenezde önemi belirlenmiş toplam 4813 gendeki değişikliklerin yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak araştırılması hedeflendi. Analiz sonrasında elde edilen varyantlar hasta bazında değerlendirildiğinde; 5 (%83,3) hastada *FGFR4* geninde; 4 (%66,7) hastada *NQOI* geninde mutasyon varlığı saptanmıştır. Belirlenen genlerdeki mutasyonların hastaların çoğunda gözlenmiş olması, bu genler ile retinoblastoma hastalığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir ( $p<0,05$ ). Varyantlar aile bazında değerlendirildiğinde ise; FN096 ailesinde *CLEC7A* geni; FN106 ailesinde *APOC3* ve *MUTYH* genleri; FN129 ailesinde ise *UGT1A1* geni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *FGFR4* geni başta olmak üzere *ACADS*, *CX3CR1*, *GBE1*, *KRT85*, *NQOI* ve *TYR* genleri retinoblastoma etiyolojisi ve patogenezinde etkili olabilecek aday genler olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, *DSPP* geninin retinoblastomalı hastalarda ikincil tümör belirtici olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: retinoblastoma, *RBI*, kalıtsal, mutasyon, yeni nesil dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-21460

## ABSTRACT

Akdeniz Ödemiş, D. (2017). Investigation Of Other Genes That Contribute To The Development Of Hereditary Retinoblastoma. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Retinoblastoma is the most common malignancy of intraocular retina that occurs in children. It is known that genetic events play an important role in retinoblastoma formation. Retinoblastoma is considered the prototype of hereditary cancers due to the strong link between clinical significance and genetic cause. According to the literature, the disease is thought to be initiated by mutations in the retinoblastoma gene *RBI*. The main alteration cause the genomic damage in the *RBI* gene is not well known but regardless of the environment it emerges at a constant rate in all races. A retinal tumor can develop when the second copy of the gene undergoes a change in a developing retinal cell. However, there is no clear information on how the disease occurs in patients with a negative result after screening in the *RBI* gene. Here in the presented doctoral dissertation, it was aimed to investigate the changes in the total 4813 genes in clinical carcinogenesis was investigated in order to determine the genes that play a role in retinal formation using the next generation technology in high risk families with retinoblastoma disease without any *RBI* gene mutation. After analysis and the basis of patient, 5 (83.3%) patients had *FGFR4* gene mutation and 4 (66.7%) patients had in the *NQO1* gene. The presence of mutations in the determined genes in the majority of patients indicates a statistically significant relationship between these genes and retinoblastoma disease ( $p < 0.05$ ). When the variants are evaluated on a family-based, *CLEC7A* in the FN096 family; *APOC3* and *MUTYH* genes in FN106 family; in the FN129 family, *UGT1A1* gene was found to be statistically significant. *ACADS*, *CX3CR1*, *GBE1*, *KRT85*, *NQO1* and *TYR* genes, especially the *FGFR4* gene, have been evaluated as candidate genes that may be effective in etiology and pathogenesis of retinoblastoma. Furthermore, the *DSPP* gene is thought to be a secondary tumor marker in patients with retinoblastoma.

**Key Words:** retinoblastoma, *RBI*, hereditary, mutation, next generation sequencing

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2016-21460

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücre farklılaşması, çoğalması ve ölümünde rol oynayan birçok genin mutasyonu sonucu gelişen genetik bir hastalıktır. Genel olarak kanser oluşumunda onkogenler ve tümör baskılayıcı genler sorumludur. Tümör baskılayıcı genlerin kanser üzerine etkileri ilk olarak pediyatrik bir kanser olan retinoblastoma hastalığı üzerinde açıklanmıştır [1]. Böylece retinoblastoma, tümör baskılayıcı genlerin daha net bir biçimde anlaşılması için bir model sistem olarak nitelendirilmiştir. Genel olarak, kanser hücreleri normal hücrelere göre daha fazla genetik değişikliğe sahiptir. Ancak kanserdeki genetik değişiklikler her kişiye özel farklı bir kombinasyon içerir. Kanser hücresinin bölünmeye devam ettiği sürece genomunda değişiklikler meydana gelmektedir. Aynı tümör içinde bile, kanser hücreleri farklı genetik değişiklikler gösterebilir. Kanser hücrelerinin bölünmesi süresince meydana gelen somatik mutasyonların yanı sıra doğuştan getirilen germline da bulunan mutasyonların da kanser oluşumuna yardım ettiği ve kansere yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir. Kalıtsal mutasyonlar tüm kanserlerin yaklaşık yüzde 5 ila 20'sinde gibi önemli bir kısmında rol oynamaktadır. Bugüne kadar araştırmacılar, spesifik genlerdeki mutasyonları, 50'den fazla kalıtsal kanser sendromuyla ilişkilendirmişlerdir. Bir kişinin kalıtsal kanser sendromu taşıyıp taşımadığı hastalıklara özgü genetik testlerin yapılması ile belirlenebilir. Ayrıca bu testler, bu tür ailelerde sağlıklı aile üyelerinin, söz konusu kansere yakalanma risklerini ve riskli mutasyonu taşıyıp taşımadığını da göstermektedir. Birçok uzman, kanser riski için yapılan genetik testin, sonuçlar doğru bir şekilde yorumlanabildiği sürece bir kişinin gelecekteki tıbbi bakımına rehberlik etmeye yardımcı olacak bilgileri sağladığı görüşündedir [2]. Bu nedenle retinoblastomalı hastaların özellikle yaşamları boyunca karşılaşılabilecekleri ikincil kanserler açısından takibinde mutasyon analizleri oldukça önemlidir.

Retinoblastoma retinada ortaya çıkan ve çocuklarda en sık görülen intraoküler malignitedir. Olguların üçte ikisi 2 yaşından önce tanı alır [3]. İnsidansı 15.000 ila 18.000 canlı doğumda 1 şeklindedir [4]. Retinoblastoma insidansı gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir ve Orta ve Güney Amerika'daki çocuklarda en sık görülen solid tümör malignitelerden biridir [5]. Bu yüksek insidansın nedeni bilinmemektedir. Altı yaş ve üstü çocuklarda retinoblastoma tanısı oldukça nadirdir. Bilateral

retinoblastomalı çocuklar hastaların yaklaşık %20-%30'unu oluşturmaktadır. Bilateral hastalar (14-16 ay) genellikle unilateral hastalardan (29-30 ay) daha erken yaşta tanı alırlar [6, 7]. Bilateral retinoblastoma tanısı konan çocukların yaklaşık %20'sinde aile hikayesi de mevcuttur [8]. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) ve Türk Pediatrik Hematoloji Derneği'nin pediatrik kanser kayıtları verilerine göre 0-19 yaş arası 2002-2008 yıllarında 65 merkeze kaydı yapılan 11.898 pediatrik kanserli vakaların 371'i (%3,1) retinoblastoma tanısı almıştır. Vakaların %88,8'i 0-4 yaş grubunda yer almaktadır, %69'u unilateral, %27,6'sı bilateralidir. Uzun süreli sağkalım oranı ise %78,4 olarak bulunmuştur [9]. Retinoblastoma oluşumunda önemli genetik etkenlerin rol aldığı bilinmektedir. Günümüzdeki literatür bilgisine göre hastalığın retinoblastoma geni (*RBI*) olarak adlandırılan gendeki mutasyonlar tarafından başlatıldığı bilinmektedir. Ancak *RBI* geninde yapılan mutasyon taramaları sonucunda negatif bulunan hastalarda hastalığın nasıl geliştiği net olarak bilinmemektedir. Retinoblastoma hem kalıtsal (%25-35) hem de kalıtsal olmayan (sporadik) (%65-75) formda oluşabilir. Retinoblastoma hastalarının %40'ında hastalık bilateral (iki taraflı) olarak görülürken %60'ında ise unilateral (tek taraflı) olarak kendini gösterir. Aile öyküsü olanlar, iki taraflı retinoblastoma veya *RBI* mutasyonu olan hastalar kalıtsal retinoblastomaya sahiplerdir. Kalıtsal retinoblastoma, germline mutasyonu olan otozomal dominant bir hastalıktır; yeni tanı alan retinoblastoma hastalarının yaklaşık %6'sını oluşturur. Kalıtsal retinoblastomanın geri kalanında ailesel geçiş olmadığı düşünülmektedir. Kalıtsal tipte tümörlerin %85'i erken dönemde görülür. Ayrıca iki taraflı ve multifokal olup göz başına ortalama beş tümör şeklindedir ve dağılım iki göz arasında rastgele olarak gerçekleşir [10]. Kalıtsal retinoblastomaya sahip hastalar, diğer dokulardaki *RBI* geninin ikinci kopyasında bulunan mutasyona bağlı olarak osteosarkom, yumuşak doku sarkomları ya da melanomlar gibi ikincil malignite geliştirme riski taşımaktadırlar. Eğer böyle bir durum söz konusu ise ikincil kanserlerin yaşam boyu görülme riskini en aza indirmek için röntgen, BT taraması ve eksternal ışın radyoterapisi dahil olmak üzere radyasyon maruziyetinden mümkün olduğu kadar kaçınılması önerilmektedir. Eksternal ışın radyasyon tedavisi gören retinoblastomalı bireylerde ikincil primer tümör insidansının %50'den fazla oranda olduğu bildirilmiştir [11]. Kalıtsal retinoblastomada *RBI* geninde mutasyon görülme oranının yaklaşık %10-15 olduğu bildirilmektedir [12]. Çocukluk çağında gözlenen bu hastalığın oluşumunda diğer genlerin yapısal bozukluklarının etkisinin olduğu düşünülmektedir. Literatür bilgisine bakıldığında,

retinoblastoma hastalığında birçok genin ekspresyon profili [13, 14] ve metilasyon düzeyinin [15, 16] araştırıldığı görülmekle beraber, farklı genlerin yapısal bozukluklarının incelendiği bir literatür bilgisine ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hastalık oluşumundan sorumlu olabilecek diğer genlerdeki mutasyonların retinoblastoma patogeneziindeki rolünün ne olduğu da hala bilinmemektedir. Literatürde *RB1* geni dışında kalıtsal retinoblastoma patogenezi ile ilişkisi araştırılmış diğer genleri içeren dizileme çalışmaları mevcut değildir. Günümüzde, genetik hastalıkların tanısında büyük zorluklarla karşılaşmakta ve günümüzün karmaşık genetik araştırma soruları, geleneksel DNA dizileme teknolojilerinin kapasitesinin ötesinde bir bilgi derinliği gerektirmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojisi, bu boşluğu doldurmak ve bu soruları çözmek için önemli bir araştırma aracıdır. Projede, Trusight One paneli olarak adlandırılan, içinde 4813 adet kansinogenez ile ilişkilendirilmiş gen dizisi bulunan panel kullanılarak yeni nesil dizileme teknolojisi ile 4813 gene ait tüm gen dizisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada ailesinde retinoblastoma hastalığı hikayesi olup *RB1* gen mutasyonu saptanmamış yüksek riskli 3 aileye mensup retinoblastoma tanısı almış toplam 6 kişide retina oluşumunda rol oynayan genlerin de içinde bulunduğu, klinik açıdan karsinogenezde önemi belirlenmiş toplam 4813 gendeki değişiklikler yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak araştırıldı. Literatürlerde özellikle aynı aileden hastaların bulunduğu ve 4813 gene ait mutasyonların bir arada değerlendirildiği bir çalışma mevcut değildir. Bu açıdan düşünüldüğünde bu çalışma ile elde edilecek sonuçların retinoblastomanın patogenezi, etiyolojisi ve genetik kökeni konusunda literatüre katkı sağlayacağı, bundan başka, farklı genlerde bulunan yeni gen mutasyonlarının hastalara ve bir sonraki jenerasyon için de erken tanı ve tedavi seçenekleri açısından yol göstereceği düşünülmektedir. Ayrıca, ailedeki yeni gebeliklerde prenatal ve preimplantasyon evrede genetik tesler yapılarak hastalık tanısının daha bebek doğmadan konabilmesi ya da ailede gen ile taşınan hastalığın in vitro fertilizasyon (ivf) yoluyla oluşturulacak embriyolar ile tamamen ortadan kaldırılması sağlanabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanserin Moleküler Genetiği

Kanser belirteçleri, insan tümörlerinin çok kademeli gelişimi sırasında edinilen altı temel biyolojik özellikten oluşmaktadır. Bu işaretler; proliferatif sinyallerin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılardan kaçış, invazyon ve metastaz aktivasyonu, sonsuz çoğalma yeteneği, anjiyogenezin tetiklenmesi ve hücre ölümüne direnç olarak bilinmektedir [17]. Ancak sonraki süreçlerde kanser hücresinin iki özellik daha kazandığı anlaşılmıştır. Bu yeni özelliklerden ilki yeniden programlanmış enerji metabolizması; ikincisi ise genom instabilitesi ve /veya mutasyonlarla tümörü daha da agresifleştiren inflamasyon yoluyla immün tepkiden kaçıştır [18]. Bu karakterler, rastgele mutasyonlarla Darwin'in bir doğal seçim yasasına bağlı bir süreç ile gelişir. Oldukça gelişmiş ve karmaşık savunma mekanizmaları vücudu bu tür mutant hücrelerin çoğalmasına karşı korur ancak tümör hücreleri bu savunmaları devre dışı bırakan mutasyonlara sahiptir. Kök hücreler, somatik hücrelerin aksine, süresiz çoğaltma yeteneklerinden dolayı kanser hücrelerinin özelliklerinden birine zaten sahiptirler. Bu nedenle kök hücreler tümör hücrelerine dönüşecek muhtemel adaylardır. Hücrel doğum ve ölüm genetik kontrol altındadır ve eğer somatik mutasyon daha hızlı çoğalan bir varyant oluşturursa, mutant klon organizmayı ele geçirme eğiliminde olacaktır. Kanseler, bazı durumlarda, kalıtsal bir yatkınlığa sahip bir dizi somatik mutasyonun sonucudur ve kanser doğal bir evrim süreci olarak görülmelidir.

Tümörler köken aldıkları dokulara göre sınıflandırılırlar. Karsinomlar epitel hücrelerinden, sarkomlar kemik veya bağ dokusundan, lösemiler ve lenfomalar kan hücresi öncüllerinden türemiştir. Solid tümörler ise, çeşitli hücre tiplerinden oluştuğu ve kanser kök hücre popülasyonu tarafından dengelendiği düşünülen organlar olarak bilinmektedir.

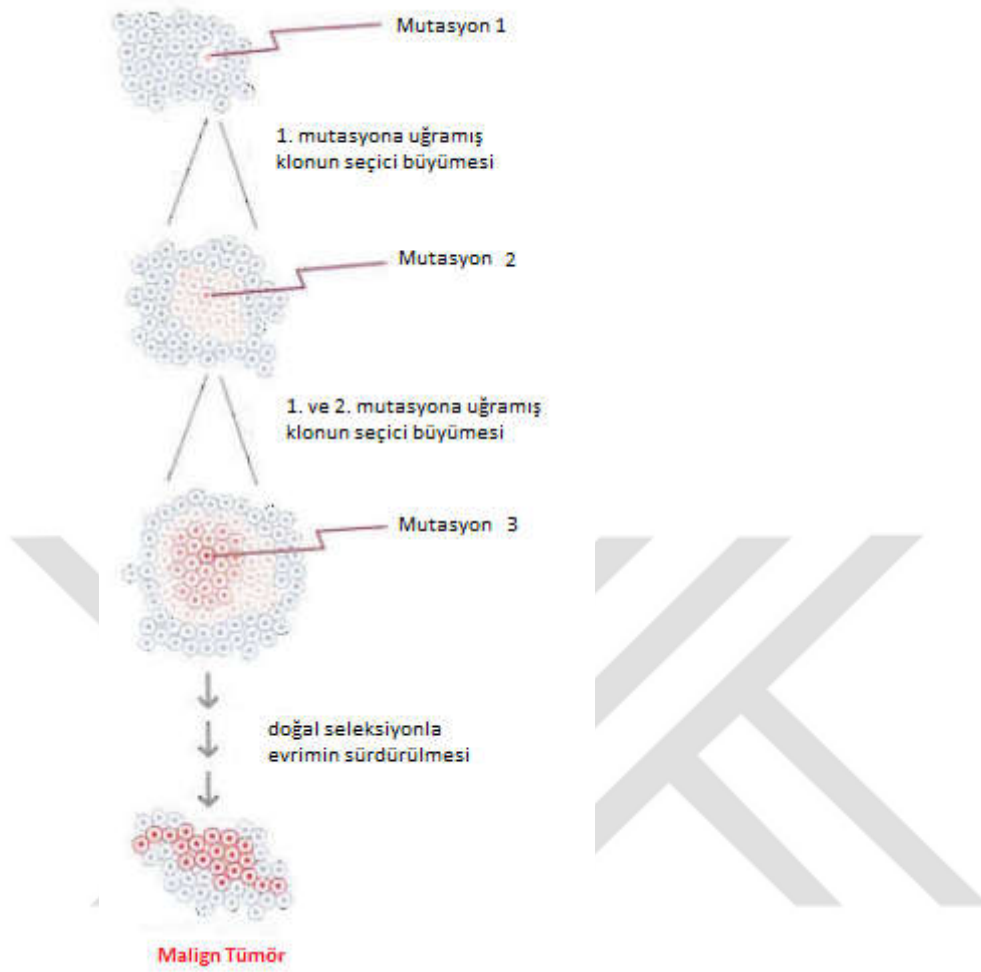
Programsız ve sınırsız çoğalan kanser hücrelerini benign (invaziv olmayan) ve malign (invaziv) tümörler olmak üzere iki grup altında toplayabiliriz. Benign ve malign tümörler arasında önemli farklar bulunmaktadır. Patologlar mikroskop altında görülen histolojiye dayalı olarak bu tümörleri sınıflandırılırlar. Özel kromozomal yeniden düzenlenmeler veya genom düzeyinde ifade profillemesi için uygulanan genetik testler, sınıflamanın daha da ayrıntılı yapılmasına izin vermiştir. Bu sınıflamalar prognozu ve

tedaviyi belirlemek için önemlidir, ancak kanserin nasıl geliştiğini açıklamazlar. Kanser genetiğinin temel amacı, normal bir somatik hücrenin ya da ilgili dokuda belki bir kök hücrenin çoğalan ve invaziv kanser hücrelerinin oluşmasında çok aşamalı mutasyonel ve seçici yolağı tanımlamaktır. Kilit moleküler olaylar ortaya çıktıkça yeni prognostik göstergeler elde edilecek ve yeni terapötik hedefler keşfedilecektir.

Hücreler, tümör hücrelerine dönüşmek için güçlü bir baskı altındadır. Normal bir epitelyal hücrenin invaziv karsinomaya dönüştürülmesi için altı veya yedi ardışık mutasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Başka bir deyişle, yalnızca altı veya yedi bağımsız savunma, mutasyon yoluyla etkisiz kılınırsa normal bir hücre malign bir tümöre dönüşebilir. Tek bir hücrenin altı bağımsız mutasyona uğrama ihtimalinin düşük olması, kanserin az görülmesi gerektiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, sürecin gerçekleşmesine izin verebilecek iki genel mekanizma vardır:

1. Bazı mutasyonlar hücre proliferasyonunu artırır ve bir sonraki mutasyon için genişletilmiş bir hedef hücre popülasyonu oluşturur (Şekil 2.1). Bu, iki veya daha fazla mutasyonun bir kombinasyonunu gerektirebilir.

2. Bazı mutasyonlar DNA veya kromozomal düzeyde tüm genom stabilitesini etkiler ve genel mutasyon oranını artırır [19].



**Şekil 2-1: Kanserin çok aşamalı evrimi [19]**

Her ardışık mutasyon, hücreye bir büyüme avantajı sağlar, böylece genişletilmiş bir klon oluşturarak bir sonraki mutasyon için daha büyük bir hedef sunar .

### 2.1.1. Mutasyon Türleri

İki temel genetik mutasyon tipi vardır. Bunlar kazanılmış mutasyonlar ve germline mutasyonlarıdır. Kazanılmış mutasyonlar kanserin en yaygın nedenidir. Bu mutasyonlar bir kişinin genlerinin hayatı boyunca maruz kaldığı tüm hasarların toplamından oluşmaktadır. Bunlar ebeveynden çocuğa geçmezler. Tütün, ultraviyole (UV) radyasyon, virüsler ve yaş gibi faktörler bu mutasyonlara neden olur. Kazanılmış mutasyonlar nedeniyle oluşan kansere sporadik kanser denir. Daha az rastlanan germline mutasyonları ise doğrudan bir ebeveynden çocuğa aktarılır. Bu tür mutasyon, sperm ve yumurta hücreleri de dahil bir kişinin vücudundaki her hücresinde bulunabilir. Mutasyon üreme hücrelerini etkiler çünkü nesilden nesile geçer. Germline

mutasyonların neden olduğu kansere, kalıtsal kanser denir ve tüm kanserlerin yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturur [20].

Kanser oluşum sürecinde mutasyonların nasıl olduğu sorusunun cevabı hem DNA hem de genomun nasıl organize edildiğinin moleküler ayrıntılarıyla yakından ilişkilidir.

Mutasyonlar, bir genin veya bir kromozomun nükleotid dizisinde görülen değişikliklerdir. Çeşitli yollarla sınıflandırılabilirler. Bu sınıflamalardan bir tanesi, mutasyonun gen yapısına etkisi üzerinedir. Bunlar küçük ölçekli ve büyük ölçekli mutasyonlar olarak sınıflandırılmaktadır [21].

#### 2.1.1.1. Küçük Ölçekli Mutasyonlar

Küçük ölçekli mutasyonlar, bir genin, bir veya birkaç nükleotidinin etkilendiği mutasyon çeşididir. Bunlar nokta mutasyonları, küçük insersiyonlar, delesyonlar ve duplikasyonlar olarak sınıflandırılır.

**Nokta mutasyonları**, tek bir nükleotidin farklı bir nükleotid ile değiştirildiği bir mutasyon çeşididir. Nokta mutasyonları üç farklı şekilde gerçekleştirilirler.

1. Missense Mutasyonlar: Bir amino asitin başka bir amino asit yerine geçtiği oluşan polipeptitte bazen amino asit değişikliğine yol açan bazen ise açmayan mutasyonlardır.
2. Nonsense Mutasyonlar: Bir amino asit kodonunun yerini stop kodonunun aldığı, translasyonun erken sonlanmasına yol açan bir mutasyondur.
3. Frameshift (Çerçeve kayması) Mutasyonları: Okuma çerçevesinde bir değişikliğe neden olan, polipeptit içine ilgisiz amino asitlerin sokulmasına yol açan, ve bir stop kodonu ile sonlanan mutasyonlardır.

**İnsersiyonlar**, bir DNA parçasının eklenerek bir gendeki DNA bazlarının sayısının değiştirildiği mutasyonlardır. Sonuç olarak, gen tarafından üretilen polipeptit orjinalinden farklı bir hal almaktadır ve görevini tam olarak yerine getirmeyebilir.

**Delesyonlar**, bir DNA bölümünün kaybolduğu veya silindiği mutasyonlardır.

**Duplikasyonlar**, bir veya daha fazla kez anormal olarak kopyalanan DNA parçasından oluşur. Bu tür mutasyon, ortaya çıkan polipeptitin işlevini değiştirebilir.

İnsersiyonlar, delesyonlar ve duplikasyonlar aslında çerçeve kayması mutasyonlarıyla benzer etkilere sahiptirler, buna rağmen bunların üçte biri çerçeve içinde gerçekleşir ve az sayıda komşu amino asidin çıkarılmasına neden olur. İnsersiyon, delesyon ve duplikasyon işlemine katılan yalnızca bir nükleotid olduğunda, nokta mutasyonu olarak ifade edilebilirler [21].

#### **2.1.1.2. Büyük Ölçekli Mutasyonlar**

Büyük ölçekli mutasyonlar, büyük bir kromozomal bölge içindeki bir genin bir çok nükleotidinde görülen mutasyon çeşididir. Büyük ölçekli mutasyonlarda, isminin de işaret ettiği gibi, mutasyon genetik materyali daha yüksek bir seviyede etkiler. Özellikle, büyük ölçekli mutasyonlar kromozomda bir değişiklik içerir ve şu şekilde sınıflandırılabilirler: (1) amplifikasyonlar (veya gen duplikasyonları), (2) büyük kromozomal bölge delesyonları ve (3) kromozomal inversiyonlar.

1. Amplifikasyonlar, kromozomal bölgelerin birden fazla kopyasının bulunduğu mutasyonlardır.
2. Büyük kromozomal bölge delesyonları, geniş bir kromozomal bölgedeki genlerin kaybını içeren mutasyonlardır.
3. Kromozom inversiyonları, kromozom içerisinde yeniden düzenlenmelerdir ve perisentrik (sentromeri içeren kromozomal inversiyonlar) ve parasentrik (sentromere içermeyen inversiyonlar) olmak üzere iki tiptir [21].

#### **2.1.2. Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler**

Kanser gelişimine neden olan basamaklar iki temel kategori altında incelenir. Bunlar onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonlarıdır [22].

Onkogenler, hücre proliferasyonunu teşvik eden genlerdir. Tek bir mutant alel, bir hücrenin davranışını etkileyebilir. Mutant olmayan versiyonları proto-onkogenler olarak adlandırılır. Onkogenler normal koşullarda hücre bölünmesini uyarmak için hareket ederler, ancak karmaşık bir düzenleyici ağ bu aktiviteyi sınırlar. Tümör hücrelerinde, onkogenin bir kopyası; nokta mutasyonları, kopya sayısı amplifikasyonu ya da kromozomal yeniden düzenlemeler yoluyla anormal şekilde aktive olur ve böylece regülasyondan kaçır.

Tümörlerde mutasyona uğrayan genlerin ikinci büyük sınıfı tümör baskılayıcı genlerdir. Tümör baskılayıcı genlerin normal rolü hücre bölünmesini sınırlamaktır. Tümör hücrelerinde, bir tümör baskılayıcı genin her iki kopyası da, genellikle, delesyon, nokta mutasyonları veya promotörün metilasyonu ile inaktive edilir. Birçok tümör baskılayıcı gen, ailesel kanser yatkınlık sendromlarının araştırılması yoluyla tanımlanmıştır. Bu sendromlarda, bireyler bir tümör baskılayıcı genin bir allelini inaktive eden bir mutasyona sahiptirler.

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler normal olarak, hücre döngüsünü kontrol eden hücre sinyallemede veya DNA hasarına yanıt olarak işlev görürler. Bu süreçleri anlamak, kanserde yanlış gidenin ne olduğunu anlamak için merkezi bir noktadır [19].

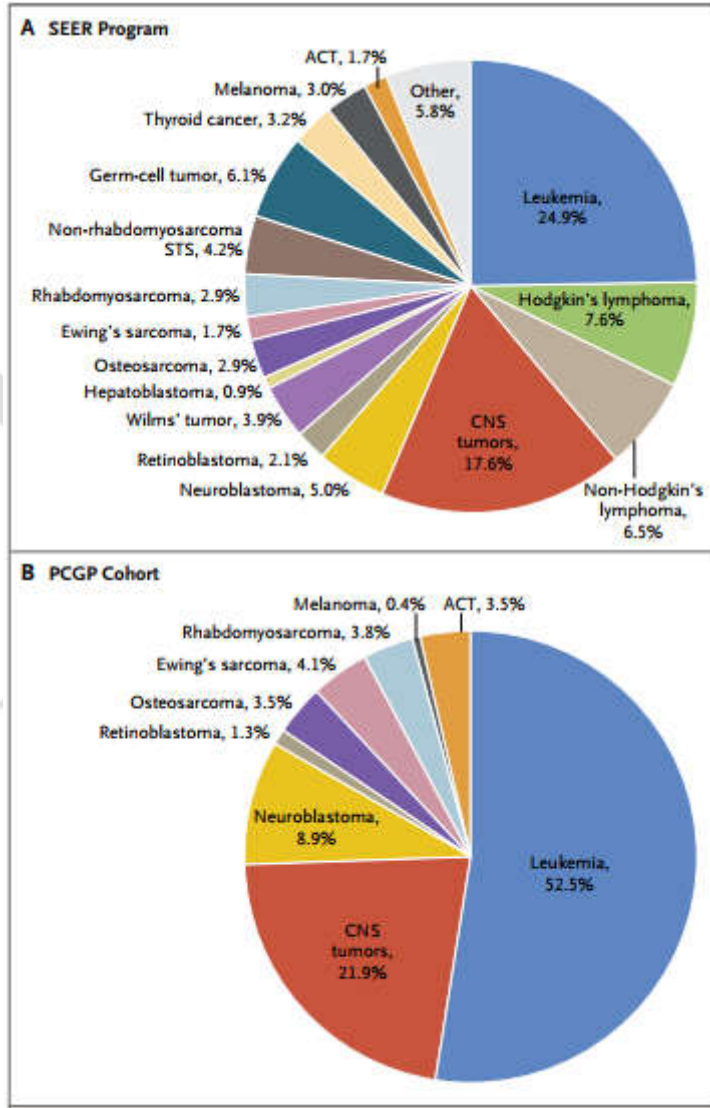
Tümör baskılayıcı genlerin kanser üzerine etkileri ilk olarak pediatrik bir kanser olan retinoblastoma hastalığı üzerinde açıklanmıştır [1]. Böylece retinoblastoma, tümör baskılayıcı genlerin daha net bir biçimde anlaşılması için bir paradigma sağlamıştır.

## 2.2. Pediatrik Kanserler

Erişkinlerde meme, akciğer veya kolon gibi dokularda kanserlere neden olan epitel hücrelerindeki genetik değişiklikler yaklaşık 5-20 yıl gibi bir birikim süreci alır. Bununla birlikte, çocukluk çağı kanserleri genellikle daha kısa sürede gelişir. Çoğunlukla epitelyal karsinom görülen yetişkinlerin aksine çocuklardaki malignite embriyonal veya sarkomatöz kökenlidir. Bazı pediatrik tümörlerde genetik ve moleküler testler erişkin tümörlere kıyasla belirgin farklılıklar göstermiştir. Örneğin, fibriler astrositom hem çocuklarda hem de yetişkinlerde görülen bir beyin tümörüdür. Biyolojik olarak, bu tümör, patolojileri benzer olmasına rağmen, 2 popülasyonda çok farklı davranmaktadır. Hastalık, çocukluk yıllarında nadiren yüksek gradlı bir tümöre dönüşürken, yetişkinlerde sıklıkla görülebilir. Bunun sebebi açık değildir. Belki de yetişkinlerde kansere neden olan belli genlerdeki mutasyonlar, çocuklarda aynı kanser nedeni değildir [7]. Çocukluk çağı kanserleri, bazı kanser hücrelerinin özelliklerine sahip olan hızla bölünen embriyonik hücrelerden köken aldığından, yetişkin dönemi tümörlerinin yaygın karsinomlarından daha az değişiklik gerektirir.

Çocukluk çağı kanserleri 1975 yılında, 100.000 çocukta 11,5, 2004 yılında ise 14,8 oranında görülmüştür [23]. Bu durum dünyadaki her 1 milyon çocuğun yaklaşık 150'sinin 20 yaşından önce kanser geliştireceği anlamına gelmektedir [24]. Çocukluk

çağı kanserleri insidans oranları, 0-4 yaş arasındaki çocuklarda en yüksektir. Oranlar sırasıyla 5-9 ve 10-14 yaş arasındaki çocuklar için biraz daha düşüktür [25]. 20 yaşından küçük hastalarda pediatrik kanser türlerinin sıklığı Şekil 2.2’de gösterilmiştir [26].



**Şekil 2-2: 20 yaşından küçük hastalarda pediatrik kanser türlerinin sıklığı [26]**

Panel A, (SEER) programından elde edilen veriler temelinde pediatrik kanser türlerinin dağılımını göstermektedir. Panel B, Pediatrik Kanser Genom Projesi (PCGP) tarafından analiz edilen kanser türlerinin dağılımını göstermektedir. ACT, adrenokortikal tumor; CNS merkezi sinir sistemi ve STS ise yumuşak doku sarkomu anlamına gelir.

### 2.2.1. Retinoblastoma İnsidansı

Retinoblastoma retinada ortaya çıkan ve çocuklarda en sık görülen intraoküler malignitedir. Olguların üçte ikisi 2 yaşından önce tanı alır [3]. İnsidansı 15.000 ila

18.000 canlı doğumda 1 şeklindedir [4]. Retinoblastoma insidansı gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir ve Orta ve Güney Amerika'da çocuklarda en sık görülen solid tümör malignitelerden biridir [5]. Bu yüksek insidansın nedeni ise net olarak bilinmemektedir. 6 yaş ve üstü çocuklarda retinoblastoma tanısı oldukça nadirdir. Bilateral retinoblastomalı çocuklar hastaların yaklaşık %20-%30'unu oluşturmaktadır. Bilateral hastalar (14-16 ay), genellikle unilateral hastalardan (29-30 ay) daha erken yaşta tanı alırlar [6, 7]. Bilateral retinoblastoma tanısı konan çocukların yaklaşık %20'sinde aile hikayesi de mevcuttur [8]. Türk Pediyatrik Onkoloji Grubu (TPOG) ve Türk Pediyatrik Hematoloji Derneği'nin pediyatrik kanser kayıtları verilerine göre 0-19 yaş arası 2002-2008 yıllarında 65 merkeze kaydı yapılan 11.898 pediyatrik kanserli vakaların 371'i (%3,1) retinoblastoma tanısı almıştır. Vakaların %88,8'i 0-4 yaş grubunda yer almaktadır. %69'u unilateral, %27,6'sı bilateraldir. Bu hastalardan %78,4'ünün yaşama uzun süreli devam ettiği bildirilmiştir [9].

### 2.2.2. Retinoblastoma Epidemiyolojisi

Düşük sosyoekonomik durum ve viral etiyoloji [human papillomavirus (HPV)] hastalık oluşumunu etkileyen olası faktörlerdir [27]. Özellikle gebelik sırasında beslenme koşullarının önemli etkileri olduğu da düşünülmektedir [28]. İn vitro fertilizasyon yoluyla doğan çocuklarda retinoblastoma gibi hastalıklar için daha yüksek bir risk olduğu daha önce açıklanmasına rağmen yakın tarihli büyük bir çalışma bu ilişkiyi desteklememektedir [29]. HPV, sporadik retinoblastoma etiyolojisinde önemli rol oynar; HPV'nin E7 proteini, fosforile edilmemiş RB proteinini (pRb) inaktive eder [30]. Son zamanlarda, HPV 16, 18, 6a, 33, 11, 31, 35 ve 51 gibi bazı HPV türleri, retinoblastoma hastalarının taze tümör dokusunda tanımlanmıştır [31, 32]. Mohan ve arkadaşları tek taraflı retinoblastomalı 18 aydan daha küçük yaştaki Hint hastalar ile HPV DNA varlığı arasında anlamlı şekilde ilişkili bulmuşlardır. Olguların %47'sinde HPV DNA mevcutken en sık HPV16'ya rastlanmıştır [32]. Buna karşılık, Gillison ve arkadaşları, Kuzey Amerika'lı hastalara ait 40 taze dondurulmuş tümör örneğinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodunu kullanarak genomik DNA sekanslarını HPV, adenovirüs (HadV) ve poliomavirüs (BKV, JCV ve SV40) varlığı açısından analiz ettikleri sonuçlar bildirmiştir. Tüm örnekler 37 HPV tipi için ve diğer tüm virüsler için negatif bulunmuştur. Bu çalışmaya göre retinoblastoma genotipine

bakılmaksızın ne HPV'nin ne de herhangi bir başka pRb inaktive edici insan DNA tümör virüsünün retinoblastoma etiyolojisinde rol oynamadığını göstermektedir [33].

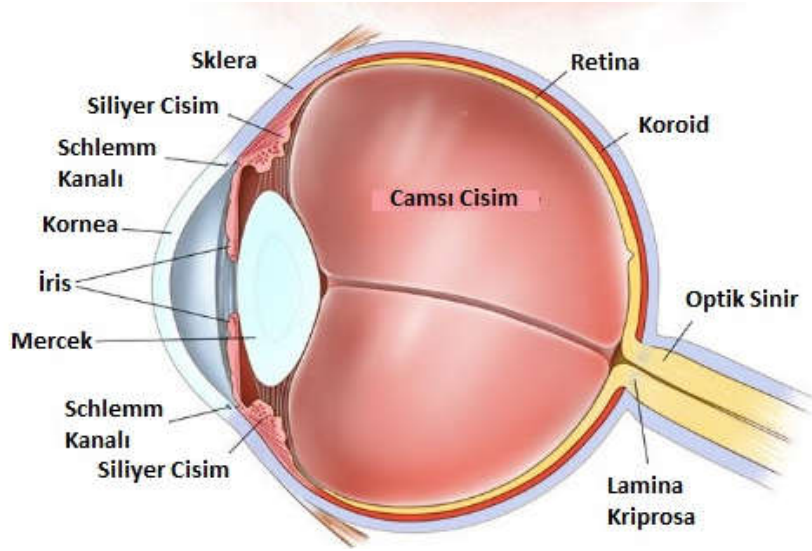
### 2.2.3. Retinoblastoma Patolojisi

Retinoblastomanın nasıl geliştiğini anlamak için göz ve çalışma şekli hakkında bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Göz;

- Küre (göz küresi)
- Yörünge (göz çukuru)
- Adneksiyal yapılar (gözyaşı bezleri ve göz kapağı dahil olmak üzere aksesuar yapılar) olmak üzere 3 ana bölümden oluşur (Şekil 2-3).

Göz küresi, camısı cisim adı verilen jöle benzeri bir madde ile doludur. Önünde bir mercek vardır. Mercek, iris denilen gözün renkli kısmı ile kaplıdır. Mercek ve iris bir kamera üzerindeki deklanşör gibi çalışır. Gelen ışığı retina adı verilen gözün arka kısmına odaklar. Retina kameradaki film gibidir. Işık retinaya çarptığında optik sinir vasıtasıyla beyine bir mesaj gönderir. Bu ise bizim görebilmemizi sağlar [34].

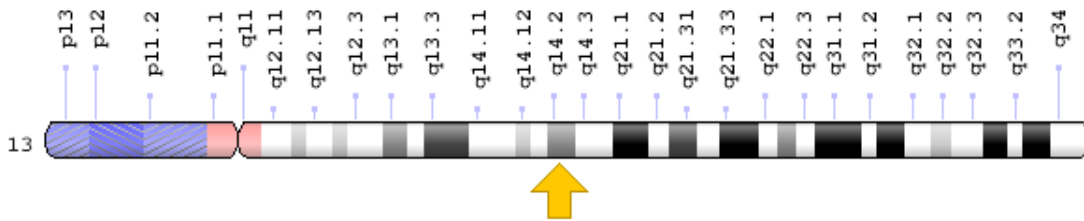
Retinoblastoma büyümesi genellikle retinanın altına ve camısı cisime doğrudur. Oküler katların ve optik sinirin tutulumu, tümör ilerledikçe bir dizi olay olarak ortaya çıkar. Koroid tutulumu yaygındır, ancak kitlesel invazyonun görülmesi genellikle ileri hastalıklarla sınırlıdır. Koroid invazyonundan sonra tümör sistemik dolaşıma girer ve metastaz potansiyeli oluşturur. Oküler katlar boyunca ilerleme, sklera ve göz çukuruna girişe neden olur. Ön kamarayı işgal eden tümör Schlemm kanalından sistemik dolaşıma erişebilir. Optik sinir yoluyla ilerleme ve lamina kribrosayı geçme, sistemik ve merkezi sinir sistemi yayılımı riskini artırır [3].



Şekil 2-3: Gözün yapısı [35]

#### 2.2.4. Retinoblastoma Genetiği

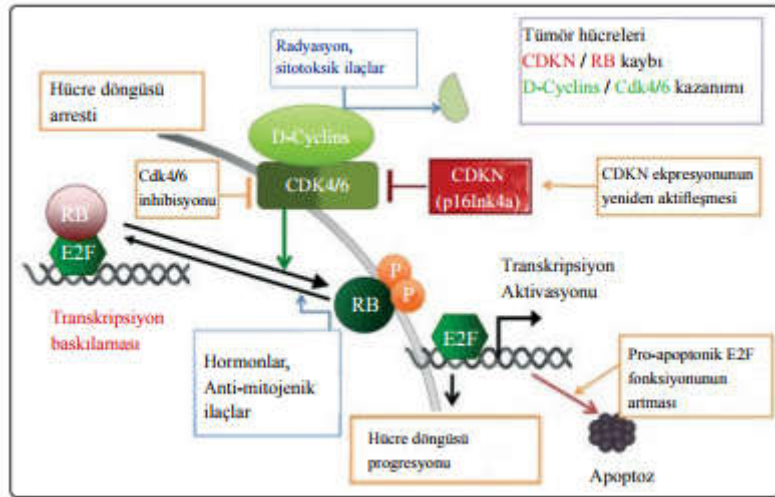
Retinoblastoma oluşumunda önemli genetik etkenlerin rol aldığı bilinmektedir. Hastalık retinoblastoma geni (*RBI*) olarak adlandırılan gendeki mutasyonlar tarafından başlatılır. *RBI* geni 13. Kromozomun uzun kolunun 14.2 pozisyonunda yer alan tümör baskılayıcı bir gendir (Şekil 2-4) [36].



Şekil 2-4: *RBI* geninin 13. kromozom üzerindeki sitogenetik pozisyonu [36]

*RBI* geni, pRB adı verilen 110 kd ağırlığında bir nükleer protein üretir. Bu protein bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür; hücre çoğalmasını düzenler ve hücrelerin çok hızlı veya kontrolsüz bölünmesini önler. Normal şartlar altında pRB, diğer proteinlerin, DNA'nın kendi kopyasını oluşturma işlemi olan DNA replikasyonunu durdurur. DNA replikasyonunun hücre bölünmesinden önce gerçekleşmesi nedeniyle, bu sürecin pRB tarafından düzenlenmesi hücre bölünmesini kontrol eder ve tümörlerin büyümesini önlemeye yardımcı olur. Ayrıca pRB, hücre

sağkalımını, hücrelerin kendini parçalamasını (apoptoz) ve hücrelerin özel işlevleri yerine getirmek için olgunlaştığı süreci (farklılaşma) etkilemek için diğer proteinlerle de etkileşime girer [37]. Bu gendeki bozukluklar çocukluk çağında retinoblastoma, mesane kanseri ve osteojenik sarkomun bir nedeni olarak bilinmektedir. RB yolağı, CDKN (örn., Ink4a), D-tipi siklinler, siklin bağımlı protein kinazlar (cdk4, cdk6), RB ailesi paket proteinleri (RB, p107, p130) ve transkripsiyon faktörlerinin E2F ailesi (E2F1-8'in DP1-2 ile heterodimerleri) olmak üzere 5 protein ailesinden oluşur. Bu yolak, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar; bileşenleri büyüme destekleyici ve büyümeyi baskılayan sinyaller tarafından aktive edilir ve/veya engellenir. Ayrıca bu yolağın birkaç bileşeni, yani p16Ink4a, siklin D1 ve RB, p16Ink4a lokusunun silinmesi ve/veya susturulması, siklin D1 lokusunun amplifikasyonu ve biallelik mutasyonu dahil olmak üzere kanser hücrelerinde sıklıkla değişmektedir. Bu nedenle, RB yolağının bu bileşenleri kanser tedavisinde rasyonel hedeflerdir (Şekil 2-5) [38].

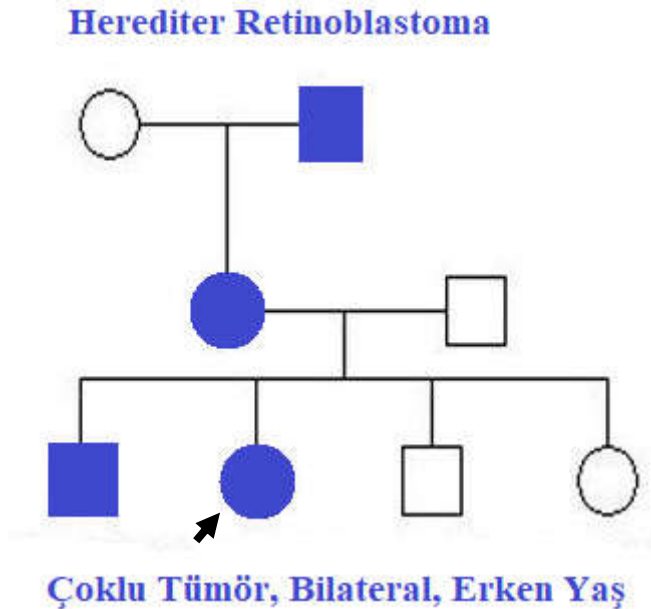


**Şekil 2-5: RB yolağı [38]**

Retinoblastoma, E2F, D-siklinleri, Cdk4/6, p16Ink4a(CDKN2a) gibi RB yolağı bileşenleri ve onların fonksiyonel etkileşimleri diagramda gösterilmiştir. Retinoblastoma yolağındaki genetik ve epigenetik değişimler birçok sporadik kanserlerde tanımlanmıştır ve bu defektler diagramın sağ üst köşesinde yer alan mor kutucukta özetlenmiştir. Retinoblastoma yolağının durumu tümör hücresinin radyasyona ve genotoksik ilaçlara tepkisini etkiler ve siklin D1 degradasyonu ve sonucunda RB defosforilasyonu ile hücre döngüsü arrestine sebep olur. Retinoblastoma yolağının durumu, hormonlar ve mitojenik sinyalleri bloke eden diğer teröpatik stratejilere karşı tümör hücresinin tepkisini etkiler. Retinoblastoma yolağındaki bir defekt E2F aktivitesinin deregülasyonuna sebep olur ve G1-S geçişi ve apoptoz için gen ekspresyonunu uyarır.

#### 2.2.4.1. Kalıtsal (Hereditör) Retinoblastoma

Retinoblastoma hem kalıtsal (%25-35) hem de kalıtsal olmayan (sporadik) (%65-75) formda oluşabilir. Retinoblastoma hastalarının %40'ında hastalık bilateral (iki taraflı) olarak görülürken %60'ında ise unilateral (tek taraflı) olarak kendini gösterir. Aile öyküsü olanlar, iki taraflı retinoblastoma veya *RB1* mutasyonu olan hastalar kalıtsal (hereditör) RB'ye sahiplerdir. Kalıtsal retinoblastoma, germline mutasyonu olan otozomal dominant bir hastalıktır; yeni tanı alan retinoblastoma hastalarının yaklaşık %6'sını oluşturur. Kalıtsal retinoblastomanın geri kalanında ailesel geçiş yoktur. Kalıtsal tipte tümörlerin %85'i erken dönemde görülür. Ayrıca iki taraflı ve multifokal olup göz başına ortalama beş tümör şeklindedir ve dağılım iki göz arasında rastgele bulunur (Şekil 2-6) [10]. Kalıtsal retinoblastomaya sahip hastalar, diğer dokulardaki *RB1* geninin ikinci kopyasında bulunan mutasyona bağlı olarak osteosarkom, yumuşak doku sarkomları ya da melanomlar gibi ikincil malignite geliştirme riski taşımaktadırlar. Eğer böyle bir durum söz konusu ise ikincil kanserlerin yaşam boyu görülme riskini en aza indirmek için röntgen, BT taraması ve eksternal ışın radyoterapisi de dahil olmak üzere radyasyon maruziyetinden mümkün olduğu kadar kaçınılmalıdır. Eksternal ışın radyasyon tedavisi gören retinoblastomalı bireylerde ikincil primer tümör insidansı %50'den fazla oranda arttığı bildirilmiştir [11].

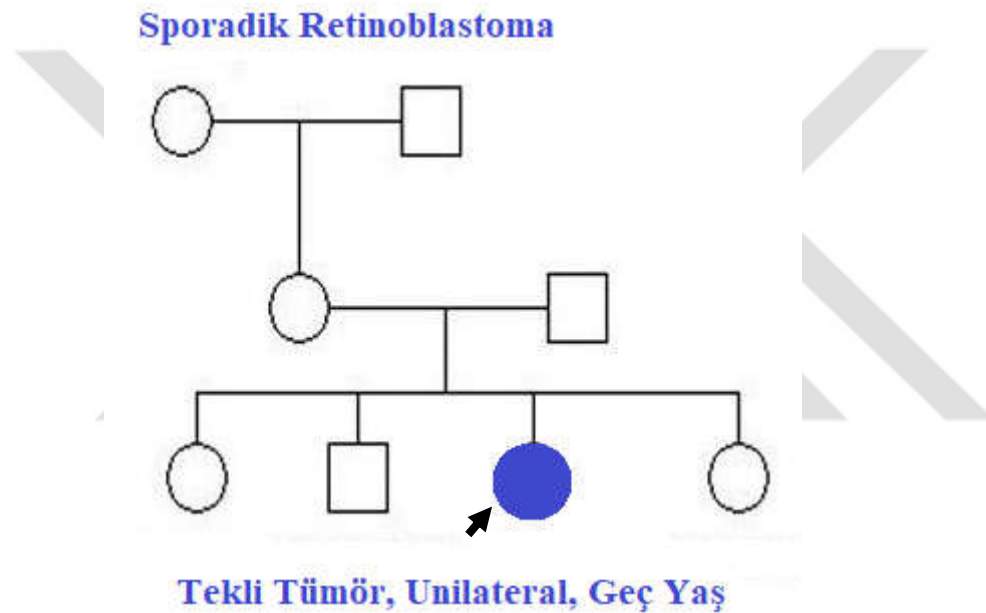


Şekil 2-6: Kalıtsal retinoblastomada görülen bir soyağacı örneği [39]

➤ (Ok): Proband

#### 2.2.4.2. Kalıtsal Olmayan (Sporadik) Retinoblastoma

Tüm retinoblastomalı hastaların yaklaşık %55'i sporadik formda oluşur. Tek taraflı retinoblastoma ve aile öyküsü negatif olan hastalar sporadik olarak sınıflandırılırlar ancak bu durum hastalığın mutlaka genetik olmayan bir form olmadığını da göstermez. Olguların yaklaşık üçte ikisinde sadece bir göz etkilenir diğer üçte birinde ise retinoblastoma her iki gözde gelişir. Her gözdeki tümör sayısı ve boyutu değişebilir [40]. Sporadik retinoblastoma genellikle geç başlangıçlı, tek taraflı ve tek odaklı tümörlerle sonuçlanır (Şekil 2-7). Sporadik retinoblastomada her iki *RB1* alleli retina hücrelerinde somatik olarak etkisiz hale getirilir ve çocuklara aktarılmazlar [10].



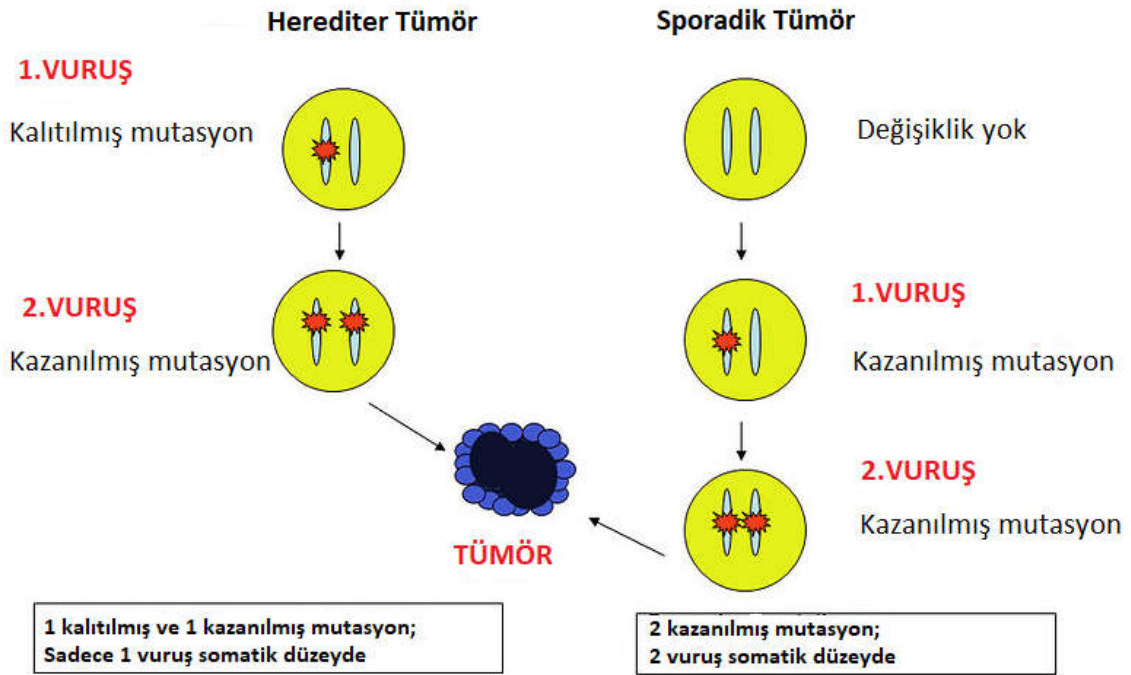
Şekil 2-7: Sporadik retinoblastoma soyağacı [39]

➤ (Ok): Probant

#### 2.2.4.3. Çift Vuruş Hipotezi

Alfred G. Knudson, aynı hücredeki *RB1* geninin her iki kopyasını etkisiz hale getiren iki mutasyonun, bir tümörü başlatmak için yeterli olduğunu vurgulamış, kalıtsal ve kalıtsal olmayan RB patogenezi için "çift vuruş hipotezini" sunmuştur (Şekil 2-8) [1]. Bunlardan ilki germline üzerinden kalıtılabilir veya somatik olarak kazanılabilir iken, ikincisi her iki durumda da somatik olarak ortaya çıkar ve RB lokusunda çift kusurlu olan bir tümöre yol açar. Bu ikinci olay, kalıtsal ve kalıtsal olmayan vakalarda aynı olabilir, ancak kalıtım olaylarında ortaya çıkma olasılığı daha yüksek olmalıdır. İkinci yabani tip kromozom alleli, vahşi tipli kromozomun kaybıyla

mitotik nondisjunksiyon, mutant kromozomun tekrar çoğaltılması ile mitotik nondisjunksiyon, mitotik rekombinasyon, gen dönüşümü, silinme veya nokta mutasyonu da dahil olmak üzere olası birkaç kromozomal mekanizma tarafından kaybolabilir veya etkisiz hale getirilebilir. Bütün bu mekanizmalar retina hücresindeki *RB1* lokusunun homozigosite veya hemizigositesine yol açar. Yapısal hücrelerde iki form mevcut olduğunda, tümörde sadece bir allel varyantının saptanması heterozigotluk kaybının (LOH) göstergesidir. Heterozigotluk kaybı, çeşitli tümörlerde tümör baskılayıcı genlerin varlığını önermek için kullanılmıştır. Sporadik vakalarda, genin homolog kopyaları arasında somatik mutasyona karşı diferansiyel bir yatkınlık yoktur. Bununla birlikte, "de novo" mutasyonların %90'ının paternal kökenli olması ilgi çekmektedir. Genomik baskılama, mutasyon ve paternal allelin tutulmasındaki olağandışı dengesizliği açıklayabilecek bir mekanizma olmasına rağmen, en gerçekçi açıklama, embriyonik gelişim ve erkeklerdeki mayoz bölünme arasında oluşan hücre bölünmesinin dişilerden çok daha fazla ortaya çıkmasıdır [41].



Şekil 2-8: Çift vuruş hipotezi [39]

### 2.2.5. Retinoblastoma Evrelemesi

Retinoblastoma, göz muayeneleri, görüntüleme testleri ve yapılan biyopsilerin sonuçlarına göre evrelenmektedir. Bu evreleme sistemi, kanserin ne kadar yayılmış

olduğunu özetlemek için kullanılan standart bir yöntemdir. Doktorlar, hastanın görüşünü korumanın yanı sıra sağkalımı ve belirli tedavilerin etkili olma ihtimalini öngörmek için evreleme sistemleri kullanmaktadır. 1963'te geliştirilen Reese-Ellsworth Sınıflaması, en çok kullanılan sınıflandırma sistemi olmaya devam etmektedir [42]. Açıkça modası geçmemiş olmasına rağmen, son yıllarda önerilen birçok sistemden hiçbirisi tıp camiasında fikir birliği bulamamıştır. Reese-Ellsworth Sınıflaması, dış ışın radyasyonundan sonra göz içi tümör evrelemesi ve küre kurtarma tahmini üzerine kuruludur ve sağkalım dikkate alınmamaktadır. Dış ışın radyoterapisinin periferik tümörleri etkili bir şekilde tedavi etmemesi ve vitröz tohumlamasını (vitröz seeding) tedavi etme zorluğu, bu faktörlerin hastalığın şiddetinin evrelendirilmesinde belirleyici olmasına yol açar. En son yapılan evreleme önerilerinden Uluslararası Göz İçi Retinoblastoma Sınıflaması (ABC Sınıflaması) en sık kullanılan ve en büyük prognostik değeri olan sınıflamadır (Tablo 2-1) [43]. Bu sınıflama, intraoküler tümörleri birinci basamak kemoterapi ve adjuvan fokal terapiden sonraki prognozlarına göre evrelemektedir. Tümörlerin büyüklüğü, maküla ve optik sinire olan yakınlığı, tohumlama derecesi, retina yırtılmasının önemi ve son olarak geç komplikasyonlar gibi prognostik durumları göz önünde bulundurularak belirlenen beş gruptan (A, B, C, D, E) oluşmaktadır [44].

**Tablo 2-1: Uluslararası göz içi Retinoblastoma sınıflaması (ABC Sınıflaması) [43]**

| Gruplar                                                                                                                                                              | Özellikler                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Grup A- Çok düşük riskli</b>                                                                                                                                      |                                                       |
| Kritik yapılardan uzakta bulunan farklı odaklı tümörlere sahip gözler                                                                                                | Çapı 3 mm veya daha küçük olan tümörler               |
|                                                                                                                                                                      | Retinaya bitişik olanlar                              |
|                                                                                                                                                                      | Foveolaya uzaklığı 3 mm'den büyük olanlar             |
|                                                                                                                                                                      | Optik sinirlere uzaklığı 1,5 mm'den büyük olanlar     |
|                                                                                                                                                                      | Vitröz veya subretinal tohumlanma olmayanlar          |
| <b>Grup B- Düşük riskli</b>                                                                                                                                          |                                                       |
| Vitröz veya subretinal tohumlanma olmayan gözler ve herhangi bir konumda veya büyüklükte olan ayırık retinal tümörler                                                | Grup A'ya dahil olmayan tümörler                      |
|                                                                                                                                                                      | Vitröz veya subretinal tohumlanma olmayan             |
|                                                                                                                                                                      | Tümör tabanından 5 mm'den uzakta olan subretinal sıvı |
| <b>Grup C- Orta riskli</b>                                                                                                                                           |                                                       |
| Yalnızca vitröz veya subretinal tohumlanma olan gözler ve herhangi bir konumda veya büyüklükte olan ayırık retinal tümörler                                          | Sınırlı, lokal ve iyi tohumlananlar                   |
|                                                                                                                                                                      | Radyoaktif plak ile tedavi edilebilenler              |
|                                                                                                                                                                      | Subretinal sıvının bir kadrana kadar olanlar          |
| <b>Grup D- Yüksek riskli</b>                                                                                                                                         |                                                       |
| Diffüz vitröz veya subretinal tohumlanma ve yoğun, nondiskrete endofitik veya ekzofitik hastalığı bulunan gözler. Grup C'den, daha geniş tohumlanma gösteren gözler. | Yoğun ve/veya intraoküler dağılan hastalık            |
|                                                                                                                                                                      | Retinal ayrılmadan bir kadrandan uzakta olanlar       |
|                                                                                                                                                                      | İnce yağlı viterus tohumlanma veya avasküler kitleler |
|                                                                                                                                                                      | Plak benzeri subretinal tohumlanma                    |
| <b>Grup E- Çok yüksek riskli gözler</b>                                                                                                                              |                                                       |
| Anatomik ve fonksiyonel olarak tümör tarafından zarar verilmiş gözler.                                                                                               | Geri dönüşümsüz neovasküler glikom                    |
|                                                                                                                                                                      | Yoğun intraoküler kanama                              |
|                                                                                                                                                                      | Aseptik orbital sellülit                              |
|                                                                                                                                                                      | Anterior viterus tümörden önceki tümör                |
|                                                                                                                                                                      | Lenslere temas eden tümör                             |
|                                                                                                                                                                      | Diffüz infiltrate retinoblastoma                      |
|                                                                                                                                                                      | Tüberküloz veya tüberküloz öncesi                     |

### 2.2.6. Retinoblastomada Klinik Bulgular

Lökokori, retinoblastomanın en sık görülen bulgusu olup şaşılık, kırmızı ağrılı göz ve görme kaybı bunu takip etmektedir (Tablo 2-2). Retinoblastomanın klinik görünümü hastalığın evresine bağlıdır. Oftalmoskopi yapılmadığı sürece, erken lezyonların gözden kaçırılacağı muhtemeldir. Tümör yarı saydam veya beyaz kabarık retina kütlesi olarak görülür. Tümör maküla içeriyorsa veya görme keskinliği azalırsa çocukta şaşılık gösterebilir [45]. Orta düzeyde ilerlemiş lezyonlar, fundustaki beyaz kütlesi tarafından ışığın yansımaları nedeniyle lökokori ile birlikte görülür (Şekil 2-9).

**Tablo 2-2: Retinoblastoma'nın en yaygın klinik özellikleri [4]**

| Retinoblastoma'nın yaygın semptomları    | Yüzdesi |
|------------------------------------------|---------|
| <b>Lökokori</b>                          | %56     |
| <b>Şaşılık</b>                           | %20     |
| <b>Kırmızı ağrılı gözler</b>             | %7      |
| <b>Zayıf görme</b>                       | %5      |
| <b>Asemptomatik</b>                      | %3      |
| <b>Orbital sellülit</b>                  | %3      |
| <b>Tek taraflı gözbebeği genişlemesi</b> | %2      |
| <b>Iris heterokromisi</b>                | %1      |



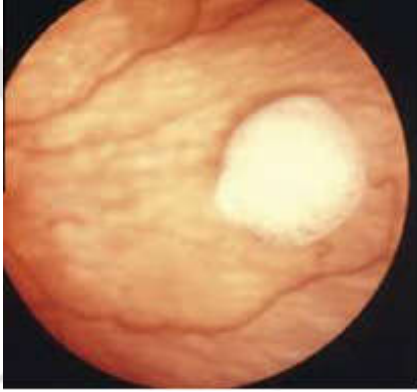
**Şekil 2-9: Lökokori görünümü [4]**

Genellikle üç şekilde görünür:

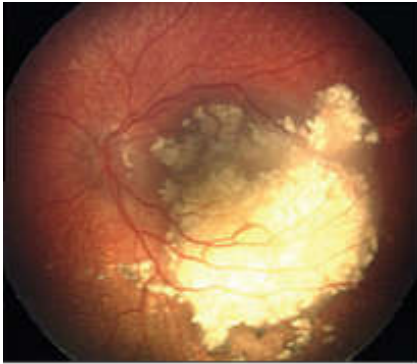
Endofitik, tümörün vitröz boşluğuna girdiği (Şekil 2-10). Sarı beyaz bir kütle, tüm vitröz boşluğunu aşamalı olarak doldurur ve vitröz tohumları oluşur. Retina damarları tümör yüzeyinde görülmez.

Ekzofitik, burada tümör subretinal boşluğa doğru büyür (Şekil 2-11). Retina dekolmanı genellikle oluşur ve retinal damarlar tümörün üzerinde görülür.

Diffuz infiltratif tümörlerde, tümör diffüz bir şekilde retinaya geçtiğinde kitlenin değil sadece retinanın plakoid kalınlaşmasına neden olur. Bu genellikle daha büyük çocuklarda görülür ve genellikle tanıda gecikme mevcuttur.



**Şekil 2-10: Endofitik büyüme [4]**



**Şekil 2-11: Ekzofitik büyüme [4]**

İleri tümörler, optik sinir veya orbita yayılımı ve sistemik metastaza ek sekonder proptozis ile kendini gösterir [45]. Retinoblastoma özellikle lamina kribrosayı geçerek optik sinir boyunca yayılabilir. Orbita yayılımı, proptoz ile ortaya çıkabilir ve

muhtemelen skleral venlerin bulunduğu yerde görülür. Sistemik metastaz beyinde, kafatasında, uzak kemiklerde ve lenf bezlerinde görülür [4].

### **2.2.7. Retinoblastomada Tedavi**

Çocuklarda retinoblastoma tedavisinde iki ana hedef vardır: kanserin geri dönüşünü önlemek ve görme yetisini korumak. Retinoblastoma için çeşitli tedavi protokolleri kullanılır ve çocukların yaklaşık %99'u 5 yıllık sağkalım oranına sahiptir [25]. Retinoblastoma için tedavi stratejileri, yıllar içinde önemli ölçüde gelişmiştir.

Geleneksel olarak, retinoblastoma, gözün çıkarılmasıyla (yani, enükleasyon) tedavi edilir; bu, tümör küre içerisine yerleşmişse kesin bir tedavi yöntemidir. Ekstraoküler tümör yayılımı gelişmiş ileri vakalarda ise, tek başına enükleasyon tedavi edici değildir ve ileri tedavi gereklidir. Günümüzde enükleasyon sadece ileri evre göz içi hastalıkları için veya diğer konservatif yöntemlerin başarısızlıklarından sonra kurtarma tedavisi olarak kullanılmaktadır.

Daha iyi sonuçlara ve daha az morbiditeye sahip bir tedavi modeli aranırken, eksternal beam radyoterapi (EBRT) etkili bir alternatif yöntem olarak bulunmuştur ve 20. yüzyılın ortalarına kadar enükleasyon yerine çoğu retinoblastoma vakası için temel tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır [46, 47]. Ne yazık ki, retinoblastoma için yaklaşık yarım yüzyıl boyunca EBRT'nin yaygın kullanımı sonrasında, radyasyonun kalıtsal retinoblastomalı hastalarda ikincil bir kanser gelişimini önemli ölçüde arttığı kabul edildi [48, 49]. Sonuç olarak, radyoterapinin yaygın kullanımı bırakılmış ve intraoküler retinoblastoma için primer tedavi olarak kemoterapi kullanılmıştır. Bugüne kadar, diğer tüm yöntemler başarısız olduğunda son çare olarak kullanılmaktadır [50].

Retinoblastomalı hastalar için bugün farklı tedavi türleri mevcuttur.

#### **2.2.7.1. Kriyoterapi**

Kriyoterapi, anormal dokuyu dondurma ve yok etme amaçlı kullanan bir tedavidir. Bu tedaviye aynı zamanda kriyocerrahi de denir [51].

#### **2.2.7.2. Termoterapi**

Termoterapi, kanser hücrelerini yok etmek için ısıнын kullanılması ile uygulanan bir tedavi yöntemidir. Dilate pupil üzerinden veya göz küresinin dışına doğru yönlendirilen bir lazer ışını kullanılarak uygulanır. Küçük tümörler için tek başına veya

daha büyük tümörler için kemoterapiyle kombine edilebilir. Bu tedavi lazer terapisinin bir türüdür [51].

### 2.2.7.3. Kemoterapi

Kemoterapi, hücreleri öldürerek veya bölünmelerini durdurarak kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen ilaç kullanımına dayalı bir kanser tedavisidir. Kemoterapinin verilme şekli kanserin evresine ve kanserin vücuttaki yerine bağlıdır. Farklı kemoterapi türleri mevcuttur:

**Sistemik kemoterapi:** Kemoterapi ağızdan alındığında veya bir damara veya kana enjekte edildiğinde, ilaçlar kan dolaşımına girer ve vücuttaki kanser hücrelerine ulaşabilir. Sistemik kemoterapi, tümörü küçültmek (kemoredüksiyon) için verilir ve böylece cerrahiden kaçınmaya olanak sağlar. Kemoredüksiyon sonrası, diğer tedaviler radyasyon tedavisi, kriyoterapi, lazer tedavisi veya bölgesel kemoterapi şeklinde olabilir.

İlk tedaviden sonra kalan kanser hücrelerini öldürmek veya gözün dışına yayılmış kanserlere sahip hastaları tedavi etmek için de sistemik kemoterapi verilebilir. İlk tedaviden sonra kanserin geri gelme riskini azaltmak için verilen tedaviye adjuvan kemoterapi adı verilir.

**Bölgesel kemoterapi:** Kemoterapi direkt olarak beyin omurilik sıvısına (intratekal kemoterapi), göz gibi bir organa veya vücut boşluğuna konduğunda, ilaçlar ağırlıklı olarak bu bölgelerdeki kanser hücrelerini etkiler. Retinoblastoma tedavisinde çeşitli bölgesel kemoterapi türleri kullanılır:

**Oftalmik arter infüzyon kemoterapisi:** Oftalmik arter infüzyon kemoterapisi, antikanser ilaçları doğrudan göze taşır. Göze açılan bir artere kateter konur ve kateterle anti kanser ilacı verilir. İlaç verildikten sonra, bloke etmek için küçük bir balon damar içine sokulabilir ve antikanser ilacın çoğunun tümörün yakınına tutulması mümkün olur. Bu tür kemoterapi, tümör yalnızca göz içinde bulunduğu ilk tedavi olarak veya tümör diğer tedavi tiplerine yanıt vermediğinde uygulanabilir.

**İntravitreal kemoterapi:** İntravitreal kemoterapi, gözün içindeki vitröz cisim içine (jöle benzeri madde) doğrudan antikanser ilaçlarının enjekte edildiği bir tedavi yöntemidir. Vitröz cisme yayılmış ve tedaviye cevap vermeyen veya tedaviden sonra nüks eden tümörü tedavi etmek için kullanılır [51].

#### 2.2.7.4. Radyoterapi

Radyoterapi, yüksek enerjili x-ışınları veya diğer radyasyon türlerini kullanarak kanser hücrelerini öldüren veya onları büyümekten alıkoyan bir kanser tedavisidir. İki çeşit radyasyon terapisi vardır:

- a. **Dış ışınlı radyasyon terapisi:** Bu yöntemde kanser hücresine karşı radyasyon göndermek için harici bir makine kullanılır. Radyasyonun yakındaki sağlıklı dokulara zarar vermesini önlemek için bazı dış ışınlı radyasyon terapileri uygulanır:

**Yoğunluk ayarlı radyasyon terapisi (IMRT):** IMRT, tümörün boyut ve şeklini gösteren resimler yapmak için bir bilgisayar kullanan 3 boyutlu (3-B) bir dış ışınlı radyoterapi türüdür.

**Proton-ışınlı radyasyon terapisi:** Tümör hücrelerini öldürmek için proton akımları (pozitif yüklü küçük parçacıklar) kullanan bir dış ışınlı radyasyon terapisi çeşitidir. Bu tür tedavi, tümör yakınındaki sağlıklı dokulara radyasyon hasarı miktarını azaltabilir. Baş ve boyun, beyin, göz, akciğer, omurga ve prostat gibi organları tedavi etmek için kullanılır. Proton ışınlı radyasyon, x-ışını radyasyonundan farklıdır[51].

- b. **İç radyasyon tedavisi:** İç radyasyon tedavisi, direkt olarak tümöre veya tümöre yakın bölgeye yerleştirilen iğneler, tohumlar (seed), teller veya kateterlere tutturulmuş radyoaktif bir madde kullanılarak uygulanır. Radyasyonun yakındaki sağlıklı dokulara zarar vermesini önlemek için plak radyoterapisi uygulanmaktadır.

**Plak radyoterapisi:** Radyoaktif tohumlar plak denilen bir diskin bir yanına bağlanır ve direkt olarak tümörün yakınında gözün dış duvarına yerleştirilir. Plak, diğer yakın dokuları radyasyondan korumaya yardımcı olur [51].

#### 2.2.7.5. Kök hücre kurtarma ile yüksek doz kemoterapi

Yüksek doz kemoterapi verilerek tahrip olan kan üreten hücreleri yenilemek için uygulanan bir yöntemdir. Kök hücreler (olgunlaşmamış kan hücreleri) hastanın kanından veya kemik iliğinden izole edilir, dondurulur ve depolanır. Kemoterapi tamamlandıktan sonra, saklanmış kök hücreler çözülür ve infüzyon yoluyla hastaya geri verilir. Yeniden çoğalan bu kök hücreler, vücudun kan hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşır [51].

### 2.2.7.6. Cerrahi (Enükleasyon)

Enükleasyon göz ve optik sinirin bir bölümünün çıkarılması şeklinde uygulanan cerrahi bir yöntemdir. Enükleasyon, görme yetisinin kaydedilebileceği veya bulunmadığı, tümörün büyük olduğu, tedaviye yanıt vermediği veya tedaviden sonra nüks ihtimalinin yüksek olduğu durumlarda uygulanır. Enükleasyon sonrası hastaya protez göz takılmaktadır [51].

### 2.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS) Sistemi

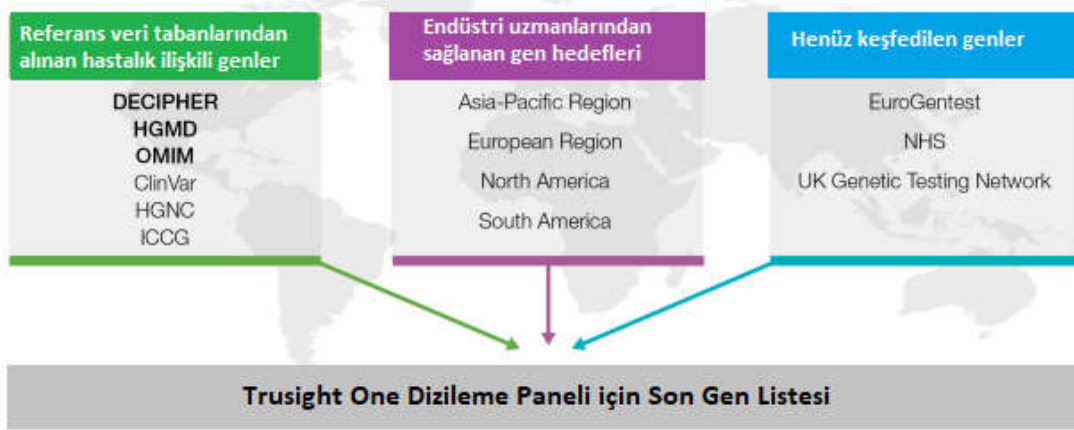
Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından DNA dizilimi için çığır açan yöntemin geliştirilmesinden bu yana 35 yıldan fazla bir süre geçti. Bu devrimci çalışma, düşük maliyetli ve hızlı DNA dizilimi için büyük fırsatlar sağlayan yeni yöntemlerin geliştirilmesini de tetikledi. İnsan Genom Projesi'nden sonra çarpıcı bir şekilde, her dizileme teknolojisi arasındaki zaman aralığı azalmaya başladı, bilimsel bilgi miktarı katlanarak artmaya devam etti. Sanger dizilişini ilk nesil olarak düşünürsek, daha sonraki dönemde yeni nesil DNA dizilemesi ortaya çıkmıştır. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi, bu eğilime, maliyetleri azaltarak ve büyük seri veri üreterek büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Şimdiye kadar, dört dizileme nesli tanımlanmıştır. Günümüzde en çok kullanılan NGS teknolojisi olan ikinci nesil dizileme, kütüphane hazırlığı, çağaltma ve dizileme adımlarından oluşurken; üçüncü nesil dizilemede bireysel nükleik asitler, yanlışlıklardan kaçınmak ve daha yüksek çıktıya sahip olmak için doğrudan dizilenir. Yakın zamanda tanımlanan dördüncü nesil sıralama ise direkt olarak hücrede genomik analizi gerçekleştirmeyi amaçlıyor. Farklı kuşaklara göre sınıflandırılan NGS, klasik DNA dizileme yöntemlerinin sınırlamalarını kaldırmaya ve moleküler biyoloji uygulamalarının geniş bir yelpazede kullanımına olanak tanımıştır [52]. NGS, genomik araştırmalarda devrim yaratan bir DNA dizileme teknolojisidir. NGS kullanılarak, bütün bir insan genomu birkaç gün içerisinde dizilenebilir (Şekil 2-12) [53]. Genom araştırmasında NGS çoğunlukla konvansiyonel Sanger diziliminin yerini almasına rağmen, rutin klinik uygulamaya henüz tek başına yer almamaktadır [54].



Şekil 2-12: Yeni nesil dizileme iş akışı [53]

### 2.3.1. TruSight One Dizileme Paneli

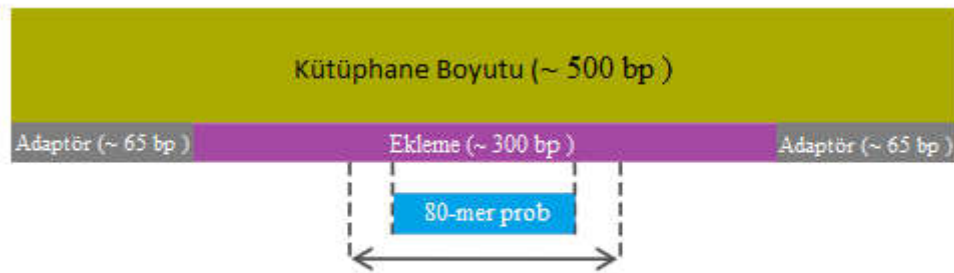
*TruSight One* dizileme paneli, yeni nesil sekanslama tekniklerinin yardımı ile klinik fenotip ile ilişkilendirilmiş 4813 farklı gen bölgesinin aynı anda, hızlı bir şekilde ve uygun maliyetlerle incelenebilmesine olanak veren bir gen panelidir. Hastalık ile ilişkilendirilmiş bu genomik hedefler, İnsan Genomu Mutasyon Veri Tabanı (HGMD) [55], Online İnsan Mendel Kalıtım (OMIM) kataloğu [56], GeneTests [57], önceden geliştirilmiş Illumina TruSight dizileme paneli [53] ve endüstri uzmanlarının doğrudan girdilerinden yararlanılarak tespit edilmiştir (Şekil 2-13). Birden fazla kamusal kaynaktan elde edilen verileri birleştirmek, panellerin, klinik araştırma ortamında şu an gözden geçirilmiş tüm genleri kapsamasını sağlamıştır. Araştırmacılar tüm bu genleri aynı panelde analiz edebilir veya özel bir alt gruba odaklanabilirler. Bu sistem, ekzom içinde kalıtsal hastalıkla ilişkili olduğu bilinen genlerin alt kümesine odaklanmak, tüm genom veya tüm ekzom dizileme ile karşılaştırıldığında daha etkili varyant tespit etmeyi mümkün kılar [58]. Bu yolla, tek bir panel tüm diğer dizileme panelleri ile etkili bir şekilde yer değiştirebilir.



**Şekil 2-13: TruSight One serisi global gen içeriğine katkıda bulunanlar [59]**

HGNC (HUGO (İnsan Genom Organizasyonu) Gen İsimlendirme Komitesi), ICCG (Uluslararası Klinik Genomik İşbirliği) ve NHS (Ulusal Sağlık Servisi).

TruSight One dizileme paneli, çoklu varyantların eşzamanlı analizini mümkün kılan yüksek düzeyde optimize edilmiş prob tasarımı içerir. Bu panel insan NCBI37 / hg19 referans genomuna karşı oluşturulmuş 125.000'den fazla prob içermektedir [60]. 80-mer boyutundaki proplar, ~ 500 bp ortalama fragman boyutları ve ~ 300 bp ekleme boyutları olan kütüphaneleri hedef alırlar ve probun orta noktasının etrafında merkeze simetrik bir şekilde 350-650 bp genişlikte zenginleştirilirler (Şekil 2-14) [61]. Dolayısıyla, paneller, ana ekzon bölgelerinin yanı sıra, splice bölgesi, düzenleyici bölgeler gibi önemli biyolojik bilgi sağlayabilen ekzon kenar bölgelerini de kapsar.



*Toplam okumaların % 60'ı hedef bölgeye eşlenir.*

**Şekil 2-14: Prob ayak izi [59]**

TruSight One problemleri, en iyi performansı ve kapsama derinliğini sağlamak için fonksiyonel testlerle tekrar eden bir tasarım süreci kullanılarak inşa edilmiştir.

Paneldeki hedef bölgelerin %95'i  $\geq 20x$  kapsam (coverage) yani okuma sayısı ile sonuçlanır (Tablo 2-3).

**Tablo 2-3: TruSight One dizileme panel özellikleri [59]**

| Parametreler                 | TruSight One |
|------------------------------|--------------|
| Kümülatif Hedef Bölge Boyutu | 12 Mb        |
| Hedef Gen Sayısı             | 4,813        |
| Hedef Ekzon Sayısı           | ~62,000      |
| Prob Boyutu                  | 80-mer       |
| Prob Sayısı                  | 125,395      |
| Hedef Minimum Kapsam         | 20x          |

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez çalışmamızda, 2011-2016 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Onkoloji Enstitüsü, Pediatrik Hematoloji Ve Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran retinoblastoma tanısı almış ve *RBI* gen mutasyonu açısından negatif bulunmuş yüksek riskli 3 aileye mensup, 6 hastanın periferik kan örnekleri incelenmiştir.

Çalışma, 25.03.2016 tarihli ve 06 sayılı Etik Kurul toplantısında etik yönden uygun görülmüş ve İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı ve DNA Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlelere ait bilgiler Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-1: Kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlelere ait bilgiler**

| Kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitleler                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biocoll Separating Solution (Fikol) [BIOCHROM]                                                                     |
| Fosfat Buffer Saline(PBS) Tablets. 100ML of 1X buffer [BIOMATİK]                                                   |
| QIAamp DNA Mini Kit [QIAGEN]                                                                                       |
| Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA), $\beta$ -Merkaptoetanol, Tris (hidroksimetil aminometan), Borik Asit [MERCK] |
| Agarose D1-LE, molecular biology grade [MULTICELL]                                                                 |
| Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavisi (BFB) [SIGMA]                                                              |
| TruSight One Dizileme Panel Protokolünde kullanılan kimyasallar ve malzemeler [ILLUMINA]:                          |
| ➤ Enrichment Elution Buffer 1(EE1)                                                                                 |
| ➤ Enrichment Hybridization Buffer (EHB)                                                                            |
| ➤ Elute Target Buffer 2 (ET2)                                                                                      |

|                                             |
|---------------------------------------------|
| ➤ EWS Enrichment Wash Solution (EWS)        |
| ➤ 2 N NaOH (HP3)                            |
| ➤ Nextera Enriched Clean Up Plate 1 (NEC1)  |
| ➤ Nextera Enriched Clean Up Plate 2 (NEC2)  |
| ➤ Nextera Enrichment Hyb Plate 1 (NEH1)     |
| ➤ Nextera Enrichment Hyb Plate 2 (NEH2)     |
| ➤ Nextera Enrichment Library Plate (NEL)    |
| ➤ Enrichment Amp Mix (NEM)                  |
| ➤ Nextera Enrichment Wash Plate 1 (NEW1)    |
| ➤ Nextera Enrichment Wash Plate 2 (NEW2)    |
| ➤ Nextera Index Library Plate (NIL)         |
| ➤ Nextera Library Amplification Plate (NLA) |
| ➤ Nextera Library Clean Up Plate (NLC)      |
| ➤ Library Amp Mix (NLM)                     |
| ➤ Nextera Library Tagment Plate (NLT)       |
| ➤ PCR Primer Cocktail (PPC)                 |
| ➤ Resuspension Buffer (RSB)                 |
| ➤ Streptavidin Magnetic Beads (SMB)         |
| ➤ Sample Purification Beads (SPB)           |
| ➤ Stop Tagment Buffer (ST)                  |
| ➤ Tagment DNA Buffer (TD)                   |
| ➤ Tagment DNA Enzyme TDE (TDE1)             |
| ➤ TruSight One Oligos (TOO)                 |

### 3.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlara ait bilgiler Tablo 3-2’de verilmiştir.

**Tablo 3-2: Kullanılan cihazlara ait bilgiler**

| Cihazlar                                                      |
|---------------------------------------------------------------|
| -80 Derin Dondurucu [SANYO]                                   |
| Azot Tankları [MVY]                                           |
| Yüksek Hızlı Soğutmalı Santrifüj [HERAEUS]                    |
| Soğutmalı Eppendorf Santrifüj [HERAEUS]                       |
| Santrifüjler Soğutmasız [HETTICH, JOUAN]                      |
| Mikropipetler [GILSON]                                        |
| Yatay Gel Elektroforez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri [BRL] |
| Vorteks [FINEPZR]                                             |
| Distile Su Cihazı [MILLIPORE]                                 |
| Spektrofotometre NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC]            |
| Gel Dökümantasyon Sitemi [BRL]                                |
| Etüvler (37 °C ve 56 °C) [NÜVE]                               |
| Manyetik Karıştırıcı [NÜVE]                                   |
| Vortex Mixer IKA-Model MS3 [AGILENT TECHNOLOGIES]             |
| Qubit 3.0 Florometre [INVITROGEN]                             |
| Agilent 2100 Biyoanaliz Sistemi [AGILENT TECHNOLOGIES]        |
| Flow cell (Akış Hücresi) [ILLUMINA]                           |
| NextSeq 500 Dizileme Sistemi [ILLUMINA]                       |

### 3.4. Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu

Tam kandan lenfosit izolasyon protokolü Tablo 3-3’de verilmiştir.

**Tablo 3-3: Tam kandan lenfosit izolasyon protokolü**

| Protokol                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ➤ EDTA’lı tüpe alınan yaklaşık 10 mL kan 1/1 oranında %0,9’luk NaCl ile dilue edilir.                                                                                                                                   |
| ➤ 2 mL Fikol üzerine yavaş bir şekilde eklenir.                                                                                                                                                                         |
| ➤ 1970 RPM’de 30 dk. santrifüj yapılır.                                                                                                                                                                                 |
| ➤ Santrifüj sonunda orta pelette eritrosit ve diğer hücreler, süpernatantta (üst faz) ise serum kısmı kalacaktır. İkisinin arasında kalan beyazımsı kısımdan lenfositler pastör pipet ile toplanarak temiz tüpe alınır. |
| ➤ 1970 RPM’de 10 dk. santrifüj yapılır.                                                                                                                                                                                 |
| ➤ Süpernatant dökülür ve kalan pelet üzerine 4 mL PBS eklenerek pipetlenir.                                                                                                                                             |
| ➤ Kriyo tüplere 1’er mL dağıtılır.                                                                                                                                                                                      |
| ➤ 1970 RPM’de 5 dk. santrifüj yapılır.                                                                                                                                                                                  |
| ➤ Süpernatant dökülür.                                                                                                                                                                                                  |
| ➤ Elde edilen hücreler -80 °C’de saklanır.                                                                                                                                                                              |

### 3.5. Lenfosit DNA İzolasyonu

Lenfosit DNA izolasyon protokolü Tablo 3-4’de verilmiştir.

**Tablo 3-4: DNA izolasyon protokolü**

| Protokol                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA izolasyonuna başlamadan önce;                                                                                                                                      |
| ➤ 10 µL β-Mercaptoethanol (β-ME), 1 mL RLT tamponuna eklenir.                                                                                                          |
| ➤ 8 mg Dithiothreitol (DTT), 1 mL ALO tamponuna eklenir.                                                                                                               |
| ➤ RPE AW1, AW2 tamponlarına kullanılmadan önce şişe üzerinde belirtilen noktaya kadar saf etanol eklenir.                                                              |
| Lenfosit hücrelerinin üzerine parçalamak için 350 µL RLT tamponu eklenir ve sıvı iyice çözüldükten sonra DNA kolonuna aktarılır. 10.000 RPM’de 1 dk. santrifüj edilir. |
| Filtre çıkartılıp yeni toplama tüpüne yerleştirilir. 500 µL AW1 eklenir ve 10.000 RPM’de 1 dk. santrifüj edilir.                                                       |

Alt sıvı dökülür ve filtrenin üzerine 500 µL AW2 eklenir ve 10.000 RPM’de 1 dk. santrifüj yapılır.

Yeni DNA tüpüne filtre yerleştirir ve 100 µL EB eklenir. 10.000 RPM’de 1 dk. santrifüj yapılır. Altta kalan sıvı DNA materyalini içermektedir.

### 3.6. DNA Kalite Tayini

Öncelikle genomik DNA Qubit cihazı ile ölçülür. Sonra, genomik DNA 10 mM pH 8,5 Tris-HCl kullanılarak 10 ng/µL olacak şekilde konsantrasyonu ayarlanır. Tekrar fluorometrik ölçüm yapılarak ve aynı tampon çözelti ile konsantrasyonu 5 ng/µL olacak şekilde ayarlanır ve 50 ng’ı kullanılmak üzere hazır hale getirilir.

### 3.7. TruSight One Dizileme Panel Protokolü

Çalışmada TruSight One dizileme panel kiti kullanılmıştır. Kit protokolüne göre akış şeması Şekil 3-1’de gösterilmiştir.



Şekil 3-1: TruSight One dizileme panel akış şeması

### 3.7.1. Genomik DNA Tagmentasyonu (İşaretlenip Kesilmesi)

Uygun konsantrasyon ve hacimde hazırlanan genomik DNA (gDNA), Tagmentasyon tampon çözeltileri ve enzimleri ile işaretlenip kesilir. Bu şekilde dizileme için gerekli özel DNA bölgeleri işaretlenmiş olur.

Kit protokolüne göre aşağıdaki maddeler;

- Normalize edilmiş gDNA (10  $\mu$ L)
- TD (25  $\mu$ L)
- TDE1 (5  $\mu$ L)
- PCR dereceli su (10  $\mu$ L) yeni bir plağın her kuyusuna eklenir.
- 1 dk. boyunca 1.800 RPM'de santrifüjlenir.
- 1 dk. boyunca 280  $\times$ g'de santrifüjlenir.
- 58°C'lik mikro ısıtıcıda kapak kapalı halde 10 dk. bekletilir.
- Her kuyuya 15  $\mu$ L ST eklenir.
- 1.800 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 1 dk. 280  $\times$ g'de santrifüjlenir.
- Oda sıcaklığında 4 dk. inkübe edilir.

### 3.7.2. Tagmente DNA'nın Temizlenmesi

İşaretlenip kesilen DNA, etanol ve yıkama tampon çözeltileri ile yıkanarak işaretlenmeyen DNA parçalarından uzaklaştırılır. Manyetik bead'ler, manyetik stand üzerinde işaretli DNA parçalarının tutulmasında rol oynar. İşaretlenmeyen DNA'lar ise yıkama çözeltileri ile uzaklaştırıldıktan sonra kalan spesifik DNA, beadlerden ayrılır.

Kit protokolüne göre;

- 65  $\mu$ L SPB her bir kuyuya eklenir.
- 1.800 RPM'de 1 dk. çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 8 dk. inkübe edilir.
- 280  $\times$ g'de 1 dk. santrifüjlenir.

- Manyetik standa yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar bekletilir (~2 dk.).
- Tüm kuyulardaki süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Aşağıdaki sıraya göre 2 kez yıkama yapılır:
 

Her kuyuya 200  $\mu$ L taze % 80 EtOH eklenir.

Manyetik standda 30 saniye inkübe edilir.

Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Her kuyudan atık EtOH'ü çıkarmak için 20  $\mu$ L'lik bir pipet kullanılır.
- Manyetik standda 10 dk. hava ile kurutulur.
- Manyetik standdan çıkartılır ve her kuyuya 22,5  $\mu$ L RSB eklenir .
- 1 dk. süreyle 1.800 RPM'de çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edilir.
- 1 dk. 280  $\times$ g'de santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar bekletilir (~ 2 dk.).
- Yeni bir Hard-Shell PCR plakasının ilgili kuyusuna 20  $\mu$ L süpernatant aktarılır.

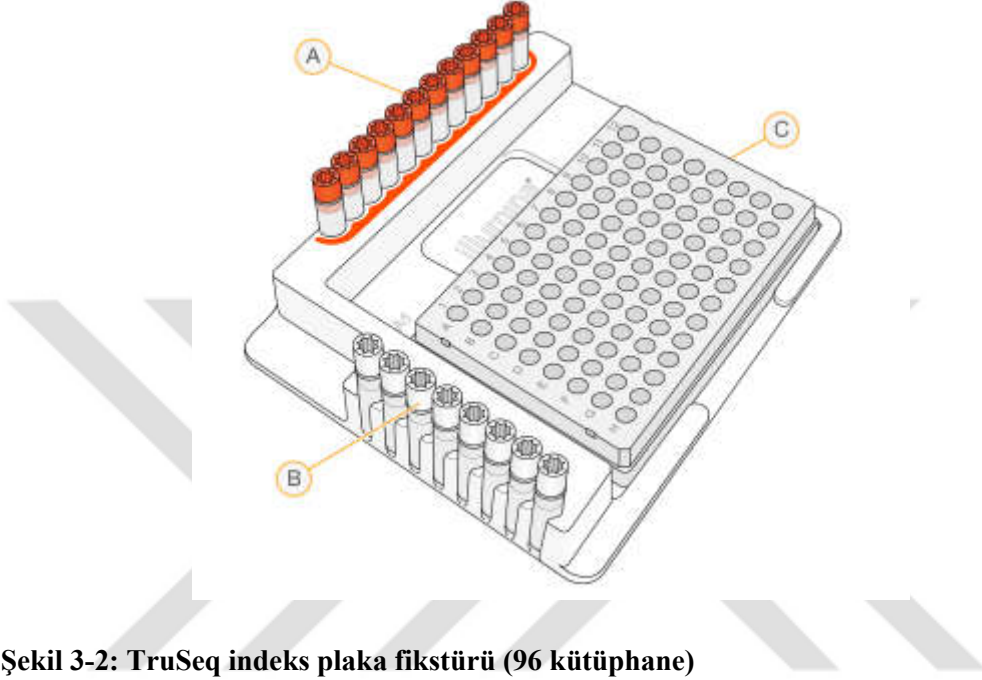
### 3.7.3. Tagmente DNA'nın Çoğaltılması

İndex primerler ve amplifikasyon miksları yardımıyla, işaretli DNA tüpleri ayrı ayrı PCR cihazında çoğaltılır. 10 döngülük PCR sürecinde aynı zamanda iki farklı indeks ve adaptörler DNA'ya tutturularak kümeleme ve dizileme için uygun hale getirilir.

Kit protokolüne göre;

- İndeks 1 (i7) bağdaştırıcıları TruSeq İndeks Plaka Fikstürünün 1-12 sütunlarına yerleştirilir.
- TruSeq İndeks Plaka Fikstürünün A-H satırlarına İndeks 2 (i5) adaptörleri yerleştirilir.

- Plaka TruSeq İndeks Plaka Fikstürünün üzerine yerleştirilir. Şekil 3-2’de TruSeq İndeks Plaka Fikstürü (96 kütüphane) gösterilmiştir.



**Şekil 3-2: TruSeq indeks plaka fikstürü (96 kütüphane)**

- A-1-12 Sütunları: İndeks 1 (i7) adaptörleri (turuncu kapaklar)  
 B- A-H Satırları: İndeks 2 (i5) adaptörleri (beyaz kapaklar)  
 C- 96 kuyulu plaka

- Çok kanallı bir pipet kullanılarak, her bir İndeks 1 (i7) adaptörünün 5  $\mu$ L'si her bir sütuna eklenir.
- Her bir i7 adaptör tüpünün kapağı yeni turuncu bir kapakla değiştirilir.
- Çok kanallı bir pipet kullanarak, her bir İndeks 2 (i5) adaptörünün 5  $\mu$ L'si her bir satıra eklenir.
- Her i5 adaptör tüpünün kapağı yeni bir beyaz kapakla değiştirilir.
- Her göze 20  $\mu$ L NLM eklenir.
- 1200 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 280  $\times$ g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.

- Önceden programlanmış termal döngü cihazına yerleştirilir ve NLM AMP programı çalıştırılır.
- Termal döngü cihazında ön kapak ısıtma seçeneği seçilir ve 100 °C'ye ayarlanır.
- 72 °C'de 3 dk. ve
- 98 °C'de 30 saniye
- 10 döngü
  - 98 °C'de 10 saniye
  - 60 °C'de 30 saniye
  - 72 °C'de 30 saniye
- 72°C'de 5 dk.
- 10°C tutma sıcaklığı olacak şekilde program ayarlanır.

### **GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Eğer bu aşamada çalışma durdurulmak istenirse, plakayı kapatıp 2 güne kadar 2°C ila 8 °C'de saklanabilir. Alternatif olarak, bir gece termal döngü cihazında tutulabilir.

#### **3.7.4. Çoğaltılan DNA'nın Temizlenmesi**

Manyetik Bead'ler yardımıyla spesifik PCR ürünleri temizlenerek hibridizasyona hazır hale getirilir. Diğer bileşenler ise yıkama solüsyonları ile uzaklaştırılır. Uzaklaştırma sonrasında özel PCR ürünü elüe edilir ve beadlerden ayrılır. Bu aşamadan sonra her örnekten 1'er µL alınarak Agilent Bioanalyzer cihazında test edilebilir. Ortalama 300-1000 baz çifti uzunluğunda ürün beklenir.

Kit protokoloüne göre;

- Plate 280 xg'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- 50 µL süpernatant yeni bir midi plakada karşılık gelen kuyuya aktarılır.
- Her kuyuya 90 µL SPB eklenir.
- 1.800 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edilir.

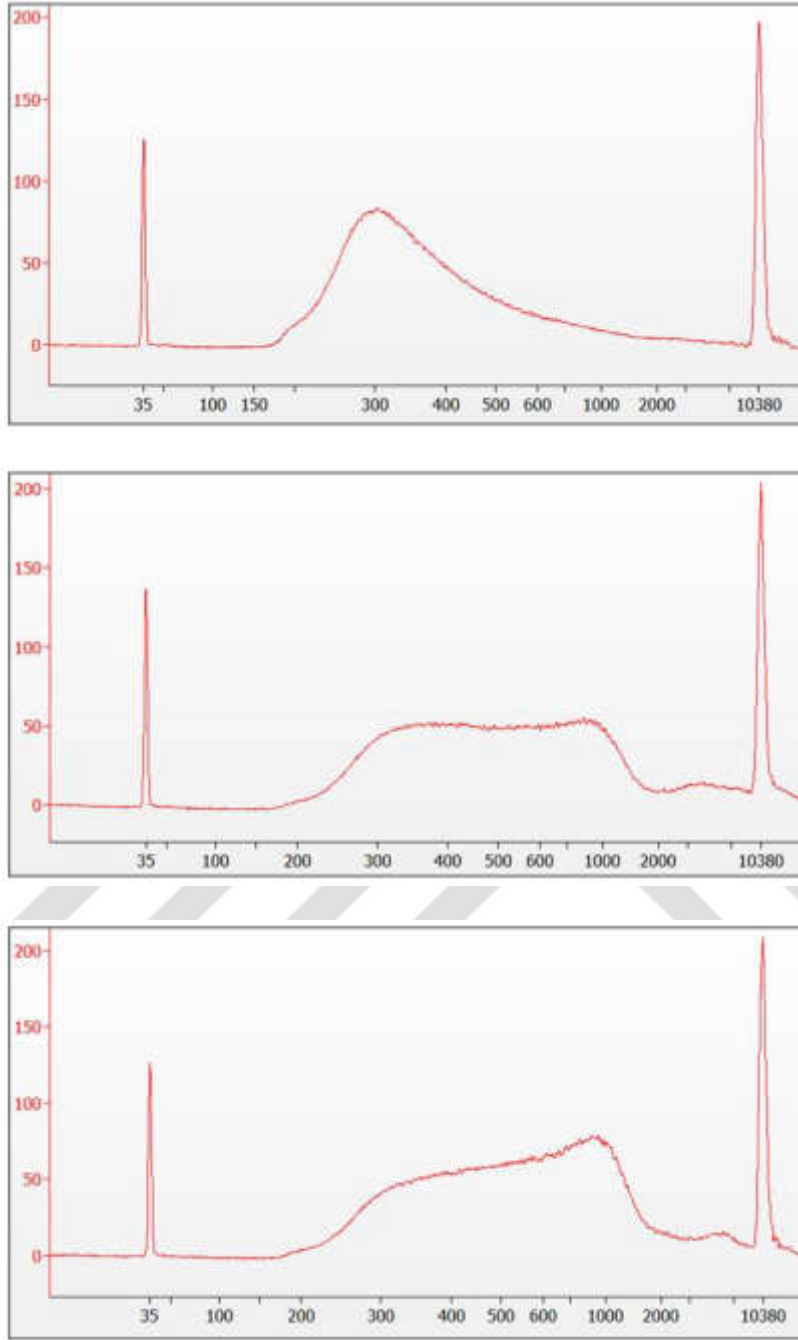
- 280 ×g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Aşağıdaki sıraya göre 2 kez yıkama yapılır:

Her kuyuya 200 µL taze % 80 EtOH eklenir.

Manyetik standda 30 saniye inkübe edilir.

Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.

- Her kuyudan atık EtOH çıkarmak için 20 µL'lik bir pipet kullanılır.
- Manyetik standda 10 dk. havayla kurumaya bırakılır.
- Her kuyuya 27,5 µL RSB eklenir.
- 1.800 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edilir.
- 280 ×g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- Yeni bir Hard-Shell PCR plakasının karşılık gelen kuyusuna 25 µL süpernatant aktarılır.
- QuantiFluor veya Qubit gibi bir florometrik yöntem kullanarak kütüphane ölçülür.
- [Opsiyonel] 1 µL kütüphane Agilent Technologies 2100 Biyoanaliz cihazı üzerinde bir DNA 1000 çipi kullanılarak yürütülür. ~ 300 bp ila ~ 1 kbp arasında bir boyut aralığında DNA fragmanlarının dağılımı beklenir. Keskin bir pik noktasına gerek yoktur, ancak fragmanların çoğunun istenen aralık içinde olması gerekir. İzler kütüphaneden kütüphaneye değişiklik gösterebilir. Aşağıdaki izler, olası dağılımları göstermektedir (Şekil 3-3).



**Şekil 3-3: Örneklerin PCR sonrası, zenginleştirme öncesi kütüphane dağılımlarına ilişkin diyagramlar**

### **GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Eğer bu aşamada çalışma durdurulmak isteniyorsa, plaka kapatılıp 14 güne kadar -25 °C ila -15 °C'de saklanabilir.

### 3.7.5. Probların Hibridizasyonu

Yakalama problemleri, DNA kütüphanesindeki ilgili bölgelere hibridize edilir. Burada Trusight One Oligoları kullanılır. Hibridizasyon için termal döngü cihazı kullanılır. Hibridizasyonun hemen ardından örneklerin her birinden 500 ng alınarak tek bir kuyuda toplanır.

Kit protokolüne göre;

- DNA kütüphane örneği (40  $\mu$ L)
- EHB (50  $\mu$ L)
- TOO (10  $\mu$ L) yeni bir Hard-Shell PCR plakasının her kuyucuğuna eklenir.
- 1.200 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 1 dk. boyunca 280  $\times$ g'de santrifüjlenir.
- Önceden programlanmış termal döngü cihazına yerleştirilir ve NRC HYB programı çalıştırılır.
- Termal döngü cihazında ön kapak ısıtma seçeneği seçilir ve 100 °C'ye ayarlanır.
- 95 °C'de 10 dk. ve
- 94 °C'de başlayıp her döngü için 2 °C düşen, her biri 1 dakikalık toplam 18 döngü seçilir.
- 58 °C tutma sıcaklığında en az 90 dk. en fazla 24 saate kadar tutulur.

### 3.7.6. Hibridize Probların Yakalanması

Streptavidin beadler hibridize bölgelere bağlanır. Böylece non-spesifik DNA uzaklaştırılarak sadece hibridize bölge tutulur. Mikroheater ile ısıtma ve sonrasındaki yıkama aşamalarından sonra manyetik beadlerin de yardımıyla non-spesifik bağlanan fragmentler uzaklaştırılır. Uzaklaştırma sonrasında spesifik PCR ürünü elüe edilir ve beadlerden ayrılır.

İlk Bağlanma

- Plaka 280  $\times$ g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.

- Tüm hacim yeni bir midi plakanın karşılık gelen kuyusuna transfer edilir.
- Her kuyuya 250  $\mu$ L SMB eklenir.
- 1.200 RPM'de 5 dk. boyunca çalkalanır.
- 25 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 280  $\times$ g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Plaka manyetik standdan çıkartılır.

#### İlk Yıkama

- 2 kez aşağıda belirtilen şekilde yıkanır.
- A- Her kuyuya 200  $\mu$ L EWS eklenir.
- B- 1.800 RPM'de 4 dk. boyunca çalkalanır.
- C- Boncuk taneciklerini süspansiyon haline getirmek için pipetlenir.
- D- 30 dk. boyunca kapağı kapalıyken 50 °C'lik mikro ısıtma sistemine yerleştirilir.
- E- Manyetik bir tezgah üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- F- Tüm üst fazlar çıkarılır ve her kuyudan atılır.
- G- Plaka manyetik standdan çıkartılır.

#### İlk Elüsyon

- Numune başına aşağıdaki hacimler 1,7 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde birleştirilerek elüsyon ön karışımı oluşturulur ve sonra vortekslenir.
  - EE1 (28,5  $\mu$ L)
  - HP3 (1,5  $\mu$ L)
- Her kuyuya 23,5  $\mu$ L elüsyon ön karışımı eklenir.

- 1.800 RPM'de 2 dk. boyunca çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edilir.
- 280 × g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- 21 µL süpernatant yeni bir Hard-Shell PCR plakasının karşılık gelen kuyusuna aktarılır.
- Her kuyuya 4 µL ET2 eklenir.
- 1.200 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 280 × g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.

### **GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Eğer bu aşamada çalışma durdurulmak isteniyorsa, plaka kapatılıp 7 güne kadar -25 °C ila -15 °C'de saklanabilir.

#### **3.7.7. İkinci Hibridizasyon**

Birinci hibridizasyondaki gibi problemler DNA bölgelerine tutturulur. PCR ile amplifikasyon yapıldıktan sonra kütüphane 58 °C'de gece boyu bırakılır.

Kit protokolüne göre;

- RSB (15 µL)
- EHB (50 µL)
- TOO (10 µL) her kuyucuğa eklenir.
- 1.200 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 1 dk. boyunca 280 × g'de santrifüjlenir.
- Önceden programlanmış termal döngü cihazına yerleştirilir ve NRC HYB programı çalıştırılır.
- Termal döngü cihazında ön kapak ısıtma seçeneği seçilir ve 100 °C'ye ayarlanır.
- 95 °C'de 10 dk. ve

- 94 °C'de başlayıp her döngü için 2 °C düşen, her biri 1 dk.lık toplam 18 döngü seçilir.
- 58 °C tutma sıcaklığında en az 14,5 saat en fazla 24 saate kadar tutulur.

### 3.7.8. İkinci Yakalama

Streptavidin beadler hibridize bölgelere bağlanır. Böylece non-spesifik DNA uzaklaştırılarak sadece hibridize bölge tutulur. Mikroheater ile ısıtma ve sonrasındaki yıkama aşamalarından sonra manyetik beadlerin de yardımıyla non-spesifik bağlanan fragmentler uzaklaştırılır. Uzaklaştırma sonrasında özel PCR ürünü elüe edilir ve beadlerden ayrılır.

#### İkinci Bağlanma

- Plaka 280 xg'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Süpernatant yeni bir midi plakanın karşılık gelen kuyusuna transfer edilir.
- Her kuyuya 250 µL SMB eklenir.
- 1.200 RPM'de 5 dk. boyunca çalkalanır.
- 25 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 280 ×g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Plaka manyetik standdan çıkartılır.

#### İkinci Yıkama

- 2 kez aşağıda belirtilen şekilde yıkanır.

A- Her kuyuya 200 µL EWS eklenir.

B- 1.800 RPM'de 4 dk. boyunca çalkalanır.

C- Boncuk tanecikleri süspansiyon haline getirmek için pipetlenir.

D- 30 dk. boyunca kapağı kapalıyken 50°C'lik mikro ısıtma sistemine yerleştirilir.

E- Manyetik bir tezgah üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).

F- Tüm üst fazlar çıkarılır ve her kuyudan atılır.

G- Plaka manyetik standdan çıkartılır.

#### İkinci Elüsyon

- Numune başına aşağıdaki hacimler 1,7 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde birleştirilerek elüsyon ön karışımı oluşturulur ve sonra vortekslenir.
- EE1 (28,5 µL)
- HP3 (1,5 µL)
- Her kuyuya 23,5 µL elüsyon ön karışımı eklenir.
- 1.800 RPM'de 2 dk. boyunca çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edilir.
- 280 ×g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar beklenir (~ 2 dk.).
- 21 µL süpernatant yeni bir Hard-Shell PCR plakasının karşılık gelen kuyusuna aktarılır.
- Her kuyuya 4 µL ET2 eklenir.
- 1.200 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 280 ×g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.

#### 3.7.9. Yakalanmış Kütüphanenin Temizlenmesi

Elde edilen işaretli DNA kütüphanesi, PCR öncesi diğer bileşenlerden temizlenir. Bu aşamada da manyetik beادلere bağlanan özel DNA, diğer bileşenlerden ayrıldıktan sonra Resuspension buffer içerisinde elüe edilir.

Kit protokolüne göre;

- 45 µL SPB her bir kuyuya eklenir.
- 1.800 RPM'de 1 dk. çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edilir.
- 280 ×g'de 1 dk. santrifüjlenir.
- Manyetik standda yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar bekletilir (~ 2 dk.).
- Tüm kuyulardaki süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Aşağıdaki sıraya göre 2 kez yıkama yapılır:

Her kuyuya 200 µL taze %80 EtOH eklenir.

Manyetik standda 30 saniye inkübe edilir.

Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.

- Her kuyudan atık EtOH'ü çıkarmak için 20 µL'lik bir pipet kullanılır.
- Manyetik standda 10 dk. hava ile kurutulur.
- Manyetik standdan çıkartılır ve her kuyuya 27,5 µl RSB eklenir .
- 1 dk. süreyle 1.800 RPM'de çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edilir.
- 1 dk. 280 ×g'de santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar bekletilir (~ 2 dk.).
- Yeni bir Hard-Shell PCR plakasının ilgili kuyusuna 25 µL süpernatant aktarılır.

### **GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Eğer bu aşamada çalışma durdurulmak isteniyorsa, plaka kapatılıp 7 güne kadar -25 °C ila -15 °C'de saklanabilir.

#### **3.7.10. Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Çoğaltılması**

10 döngülük bir program ile işaretli kütüphane çoğaltılır. PCR için primer kokteyli ve amplifikasyon miksları kullanılır.

- Her kuyuya 5  $\mu$ L PPC eklenir.
- Her kuyuya 20  $\mu$ L NEM eklenir.
- 1.200 RPM'de 1 dk. boyunca çalkalanır.
- 280  $\times$ g'de 1 dk. boyunca santrifüjlenir.
- Önceden programlanmış termal döngü cihazına yerleştirilir ve NEM AMP10 programı çalıştırılır.
- Termal döngü cihazında ön kapak ısıtma seçeneği seçilir ve 100 °C'ye ayarlanır.
- 98 °C'de 30 saniye
- 10 döngü
  - 98 °C'de 10 saniye
  - 60 °C'de 30 saniye
  - 72 °C'de 30 saniye
- 72 °C'de 5 dk.
- 10 °C tutma sıcaklığı olacak şekilde program ayarlanır.

### **GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Eğer bu aşamada çalışma durdurulmak istenirse, plaka kapatılıp 2 güne kadar 2 °C ila 8 °C'de saklanabilir.

### **3.7.11. Çoğaltılan Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Temizlenmesi**

Zenginleştirilmiş kütüphane temizlenerek dizilemeye hazır hale getirilir. Manyetik beadlere bağlanan özel DNA, diğer bileşenlerden ayrıldıktan sonra Resuspension buffer içerisinde elüe edilir.

Kit protokolüne göre;

- Plaka 280  $\times$ g'de 1 dk. santrifüjlenir.
- 50  $\mu$ L yeni bir midi plakanın karşılık gelen kuyusuna transfer edilir.
- 90  $\mu$ L SPB her bir kuyuya eklenir.
- 1.800 RPM'de 1 dk. çalkalanır.

- Oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edilir.
- 280 ×g'de 1 dk. santrifüjlenir.
- Manyetik standa yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar bekletilir (~ 2 dk.).
- Tüm kuyulardaki süpernatant çıkarılır ve atılır.
- Aşağıdaki sıraya göre 2 kez yıkama yapılır:

Her kuyuya 200 µL taze %80 EtOH eklenir.

Manyetik standda 30 saniye inkübe edilir.

Her bir kuyudan tüm süpernatant çıkarılır ve atılır.

- Her kuyudan atık EtOH'ü çıkarmak için 20 µL'lik bir pipet kullanılır.
- Manyetik standda 10 dk. hava ile kurutulur.
- Manyetik standdan çıkartılır ve her kuyuya 32,5 µL RSB eklenir .
- 1 dk. süreyle 1.800 RPM'de çalkalanır.
- Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edilir.
- 1 dk. 280 ×g'de santrifüjlenir.
- Manyetik bir stand üzerine yerleştirilir ve sıvı berrak oluncaya kadar bekletilir (~ 2 dk.).
- Yeni bir Hard-Shell PCR plakasının ilgili kuyusuna 30 µL süpernatant aktarılır.

### **GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Eğer bu aşamada çalışma durdurulmak istenirse, plaka kapatılıp 7 güne kadar -25 °C ila -15 °C'de saklanabilir.

### **3.7.12. Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Kontrolü**

Zenginleştirilmiş kütüphanenin kontrolü birkaç aşamadan oluşmaktadır.

#### **Kütüphanenin ölçümü:**

Akış hücresi üzerinde optimum küme yoğunluklarını sağlamak için DNA kütüphanelerinin kesin olarak ölçülmesi gerekmektedir.

Çift sarmal (dsDNA) kütüphanelerini ölçmek için bir florometrik dsDNA analizi kullanılır. Diğer teknikler RNA ve proteinler gibi kontaminasyonlara neden olabilir. DNA'ya özgü miktar tespiti için bir spektrofotometre kullanılır. Spektrofotometre, ayrıca RNA'yı ve çok yüksek değer yüzdelelerini de ölçebilir.

1. Zenginleştirilmiş kütüphane, ölçüm işleminden önce aşağıdaki gibi seyreltilir:

- 3-pleks ve 12-pleks arası zenginleştirmek için, yeni bir tüp ya da kuyu içerisinde 28 µL RSB'ye 2 µL kütüphane eklenir. Ölçüm ve kalite değerlendirmesi için bu seyrelti kullanılır.
- 1-plex veya 2-plex zenginleştirme için seyreltme gerekli değildir.

2. Florometrik bir yöntem kullanarak ölçüm yapılır.

ng/µL'den nM'a dönüştürmek için aşağıdaki formül kullanılır (3-1).

650 bp'lik bir kütüphane boyutu varsayalım veya zenginleştirilmiş kütüphanenin ortalama boyutuna göre hesaplayalım:

(3-1)

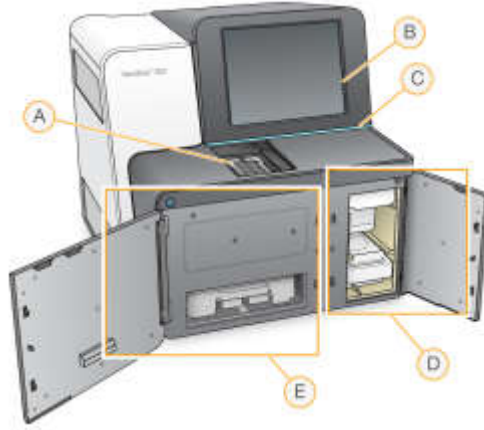
$$\frac{(\text{ng}/\mu\text{L konsantrasyonu}) \times 10^6}{(660 \text{ g/mol} \times \text{ortalama kütüphane boyutu (bp)})} = \text{nM konsantrasyonu}$$

Örneğin;

$$\frac{(15 \text{ ng}/\mu\text{L}) \times 10^6}{(660 \text{ g/mol} \times 650)} = 34.9 \text{ nM}$$

### 3.8. Illumina NextSeq 500 Sistemi ve Dizileme Protokolü

Çalışmada Illumina NextSeq 500 sistemi kullanılmıştır. Bu sistem masaüstü dizileme cihazlarının basitliği ile yüksek verimli dizileme gücünün birleşimidir. NextSeq 500 sistemi bir dokunmatik ekran monitörü, bir durum çubuğu ve 3 bölmeden (Akış hücresi, Reaktif Kartuşu, Tampon Kartuşu) oluşmaktadır (Şekil 3-4).



**Şekil 3-4: Cihaz kısımları**

**A Görüntüleme bölmesi** - Bir dizileme işlemi sırasında Akış hücrelerini tutar.

**B Dokunmatik ekran monitörü**- Kontrol yazılım arayüzünü kullanarak cihaz üzerinde yapılandırmayı ve kurulumu etkinleştirir.

**C Durum çubuğu**- Cihazın durumunu işlem aşamasında (mavi), dikkat gerektiren durumlarda (turuncu), dizilemeye hazır (yeşil) veya önümüzdeki 24 saat içinde yıkanması gerektiğinde (sarı) olarak gösterir.

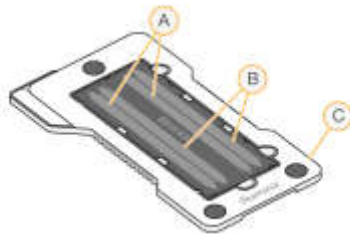
**D Tampon bölmesi**-Tampon kartuşunu ve harcanmış reaktifleri tutar.

**E Reaktif bölmesi** - Reaktif kartuşunu tutar.

### 3.8.1. Flow-cell (Akış hücresi)

Akış hücresi, üzerinde kümelerin üretildiği ve dizileme reaksiyonu gerçekleştirilen, cam esaslı bir alt tabakadır.

Akış hücresi çift olarak görüntülenen 4 şerit içerir (Şekil 3-5). Akış hücresi 4 şeride sahip olmasına rağmen, sadece bir kütüphane akış hücresi üzerinde dizilenir. Kütüphaneler reaktif kartuşuna tek bir rezervuardan yüklenir ve otomatik olarak akış hücresi'ne 4 şeritten aktarılır.



**Şekil 3-5: Akış hücresi kartuşu**

**A** A şerit çifti- Şerit 1 ve 3

**B** B şerit çifti- Şerit 2 ve 4

**C** Akış hücresi kartuş çerçevesi

### 3.8.2. Reaktif Kartuşu

Reaktif kartuşu, RFID izleme ve sızdırmaz folyo rezervuarları olan ve kümeleme ve dizileme reaktifleri ile önceden doldurulmuş tek kullanımlık bir sarf malzemesidir. Reaktif kartuşu, hazırlanmış kütüphaneleri yüklemek için belirlenmiş bir rezervuarı içerir. Koşu başladıktan sonra, kütüphaneler otomatik olarak hazneden akış hücresine aktarılır (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Reaktif kartuşu

### 3.8.3. Tampon Kartuşu

Tampon kartuşu, tamponlar ve yıkama çözeltisi ile önceden doldurulmuş 3 rezervuarı içeren tek kullanımlık bir sarf malzemesidir. Tampon kartuşunun içeriği, 1 akış hücresinin dizilenmesi için yeterlidir (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Tampon kartuşu

### 3.8.4. Dizileme Protokolü

NextSeq 500'de dizilemeyi gerçekleştirmek için öncelikle reaktif kartuşu ve akış hücresi hazırlandı ve çalıştırmayı kurmak ve başlatmak için yazılım komutları takip edildi. Küme oluşturma ve dizileme cihaz üzerinde yapıldı. Küme oluşturma sırasında, DNA molekülleri akış hücresinin yüzeyine bağlandı ve daha sonra kümeler oluşturmak

üzere çoğaltıldı. Kümeler, floresan işaretli zincir sonlandırıcıların her birine özgü filtre kombinasyonları ve 2 kanallı sıralama kimyası kullanılarak görüntülendi. Akış hücresi üzerindeki bir karo görüntüsü tamamlandıktan sonra, bir sonraki karo görüntülendi. Süreç, dizilemenin her döngüsü için tekrarlandı.

Görüntü analizi sonrasında, yazılım baz çağrı (BCL), filtreleme ve kalite skorlaması yapıldı. İşlemler ilerledikçe, kontrol yazılımı, baz çağrı dosyalarını( BCL), ikincil analiz için BaseSpace'e veya belirtilen çıkış konumuna otomatik olarak aktardı. Daha sonra bu dosyalar VariantStudio yazılımına yüklenerek dizileme verilerinin analizi sağlandı.

### **3.9. VariantStudio Yazılımı ile Veri Analizi**

Genomik varyant verilerinden fenotip ile ilişkili bilginin çıkartılması genetik analiz açısından oldukça zordur. Verileri biyolojik değişiklikler ile ilişkilendirmek için varyant anotasyonu ve filtreleme işlemleri oldukça önemlidir. Bu süreçler, ilgili varyantları tanımlamak, biyolojik etkilerini belirlemek ve genotip ile fenotip arasındaki potansiyel korelasyonları belirlemek için gerekli işlevsel bilgileri sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılan VariantStudio yazılımı sezgisel bir kullanıcı arayüzüne sahiptir ve araştırmacıların, dizileme verilerini kolayca analiz etmelerini sağlar. Ölçeklenebilir analiz için tasarlanan bu araç, hedeflenen diziden tüm genom verilerine kadar, boyut ve karmaşıklık bakımından değişen veri setleri için optimize edilmiştir. Bu yazılım hızlı anotasyon özellikleri, sezgisel filtreleme işlemleri, veri analizi ve yorumlamayı basitleştirmek için esnek sınıflandırma ve raporlama işlevleri sunmaktadır. Ayrıca araştırmacıların değişken veriyi keşfetmesine, hastalıkla ilgili varyantları tanımlamasına ve sınıflandırmasına, biyolojik açıdan önemli bulguları bildirmesine de olanak tanımaktadır (Şekil 3-8) [62].



**Şekil 3-8: VariantStudio yazılımı ile kapsamlı veri analizi ve yorumu [63]**

Çalışmada verilerin analizi için Illumina VariantStudio yazılımı kullanılmıştır [63]. Yapılan dizileme sonrası Illumina NextSeq 500 cihazından elde edilen BCL formatındaki veri öncelikle VCF dosya formatına dönüştürülmüş ve Illumina VariantStudio masaüstü alıcısı kullanılarak bu dosyalar yazılım programına yüklenmiştir.

### 3.9.1. Anotasyon

Illumina VariantStudio yazılımı kullanılarak analiz edilmesi planlanan verilerin öncelikle anotasyonu gerekmektedir. Bu yazılımın kapsamlı veritabanı; varyant, gen ve transkript düzeylerindeki açıklamaları yakalar. Varyant Etki Prediktörü (VEP), transkript sonuçlarının anotasyonu için merkezi bir kaynaktır [64]. VEP, NCBI Referans Dizisi Veritabanı (RefSeq) [65] gibi veritabanlarını ve Polimorfizm Fenotipleme (PolyPhen) [66] ve SIFT [67] gibi algoritmaları da kullanmaktadır. Bilinen hastalık ilişkisi ile ilgili bilgi, Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu'ndan (COSMIC) [68], ClinVar veri tabanından [69] ve Online İnsan Mendel Kalıtım (OMIM) [56] kataloğundan elde edilmektedir. dbSNP [70], Ensembl 1000 Genom Projesi [71] ve Ekzom Varyant Sunucusu [72] gibi kaynaklar bir popülasyon içindeki varyantların oluşumu ve frekansları hakkında bilgi sağlamaktadır.

Illumina VariantStudio programına yüklenen dosyalar anotasyon seçeneği kullanılarak anote edilmiştir. Bunun sonucunda varyantların ilgili tüm veri tabanlarında ve algoritmalarda belirtilen açıklamaları elde edilmiştir.

### 3.9.2. Filtreleme

Dizileme sonrası örnek başına çok sayıda varyant görülmektedir. Fakat belirli bir fenotip ile ilişkisi olabilecek birkaç varyantı tanımlamak için filtreleme işlemi yapılması gerekmektedir. Ardışık filtreleme seçenekleri kullanılarak hızlı bir şekilde ilgilenilen fenotip ile ilişkili anahtar varyantlar izole edilebilir. Bu filtreleme seçenekleri arasında varyant kalitesi, frekansı, fonksiyonel etkisi, bilinen hastalık ilişkisi gibi yaygın olarak uygulanan filtreler sunulmaktadır [62].

Anotasyon işlemine tabi tutulan varyantların fenotip ile ilişkilerini belirleyebilmek için çeşitli filtreleme seçenekleri kullanılmıştır. Özellikle ClinVar patojenik kaydı bulunan varyantlar detaylı incelemeye alınmıştır.

### 3.9.3. Sınıflandırma

Genetik bilgiyi anlamlı biyolojik bilgiye çeviren temel kritik bileşen, gözlemlenen fenotiplerde tanımlanan varyantların etkisini belirlemektir. VariantStudio yazılımındaki sınıflandırma özelliği bu işlemi kolaylaştırarak, klinik araştırmacıların, varyantları sınıflandırmak için uzmanlıklarını verilen açıklamalarla birleştirmelerini sağlar. Sınıflandırılmış varyantlar ve kullanıcı tarafından girilen ilgili bilgiler yerel bir veritabanına kaydedilir. Böylece yapılan sınıflandırmalar, daha sonra diğer örneklerde gözlemlendiği zaman aynı varyantlara kolayca uygulanabilir. Araştırmacılar, bu veritabanını dış kaynaklardan sınıflandırılmış değişkenler ekleyerek zenginleştirebilirler. VariantStudio yazılımı, sınıflandırılmış varyantların otomatik kaydı, izlenmesi ve yönetimini etkinleştirerek, verilerin yorumlanmasını basitleştirir ve hızlandırır [62].

Tez çalışmasında kullanılan örneklerden elde edilen tüm varyantlar sınıflandırıldı ve böylece diğer örneklerde aynı varyant ile karşılaşıldığında veriler daha kolay bir şekilde değerlendirildi.

### 3.10. İstatistiksel Analiz

Hastalara ait tüm klinik ve genetik bilgiler IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Tüm bu klinik ve genetik

bilgiler VariantStudio analiz sonuçları ile hem hasta bazında hem de hastalar arasında Ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Ayrıca bulunan varyasyonlar açısından aile bireyleri arasında bağlantı analizleri de yapıldı.  $p<0,05$  olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.



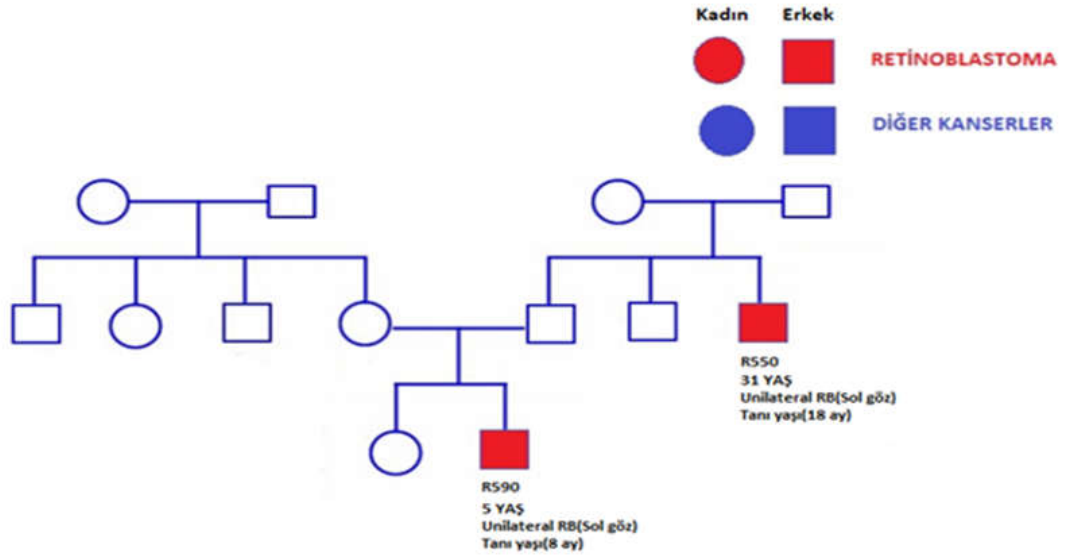
#### 4. BULGULAR

Tez çalışmamıza, 2011-2016 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Onkoloji Enstitüsü, Pediatrik Hematoloji Ve Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran retinoblastoma tanısı almış hastalar dahil edildi. Bu hastalara öncelikle *RBI* gen mutasyon analizi yapıldı. Yapılan Sanger dizileme ve MLPA analizleri sonrasında *RBI* gen mutasyonu açısından negatif bulunan yüksek riskli 3 aileye mensup, 6 hasta seçildi. Bu aile gruplarından ilki hasta amca ve yeğen; ikincisi hasta iki kuzen ve üçüncüsü ise iki hasta kardeşten oluşmaktaydı. Hastalardan üçü unilateral retinoblastomalıyken diğer üçü bilateral retinoblastoma tanısı almıştı. Hastalara ait klinik özellikler Tablo 4-1'de verilmiştir.

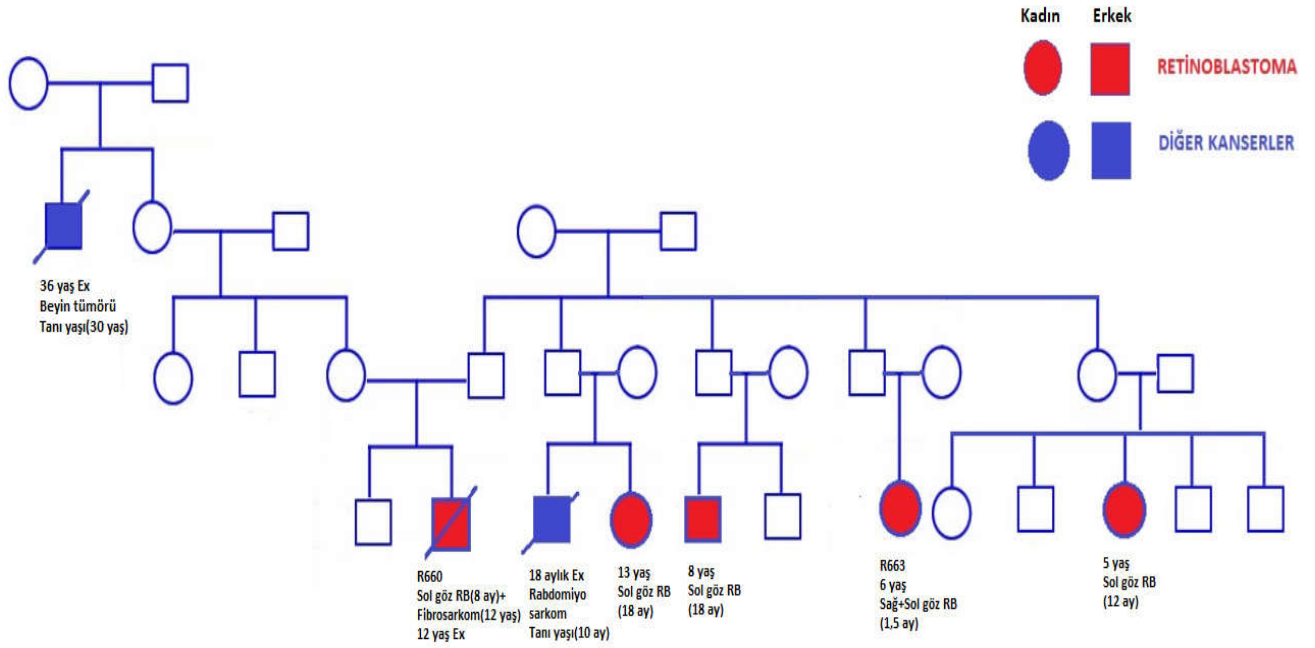
**Tablo 4-1: Hastalara ait klinik özellikler**

| Aile No | Hasta No | Tanı                       | Tanı yaşı | Lökokori | Şaşılık    | Tedavi                            | İkincil Tümör | Son durum | Akrabalık derecesi |
|---------|----------|----------------------------|-----------|----------|------------|-----------------------------------|---------------|-----------|--------------------|
| FN096   | R550     | Unilateral RB (Sol göz)    | 18 aylık  | Yok      | İçe Kayma  | Yok                               | Yok           | Sağ       | AMCA               |
|         | R590     | Unilateral RB (Sol göz)    | 8 aylık   | Var      | İçe Kayma  | RT;İAC                            | Yok           | Sağ       | YEĞEN              |
| FN106   | R660     | Unilateral RB (Sol göz)    | 8 aylık   | Var      | İçe Kayma  | RT;KT; Enükleasyon                | Fibrosarkom   | Ex        | KUZEN              |
|         | R663     | Bilateral RB (Sağ+Sol göz) | 1,5 aylık | Var      | İçe Kayma  | KT;Lazer                          | Yok           | Sağ       | KUZEN              |
| FN129   | R890     | Bilateral RB (Sağ+Sol göz) | 7 aylık   | Var      | Dışa Kayma | KT; İAC                           | Yok           | Sağ       | KARDEŞ             |
|         | R893     | Bilateral RB (Sağ+Sol göz) | 7 aylık   | Yok      | Yok        | KT; İAC; Kriyoterapi; Enükleasyon | Yok           | Sağ       | KARDEŞ             |

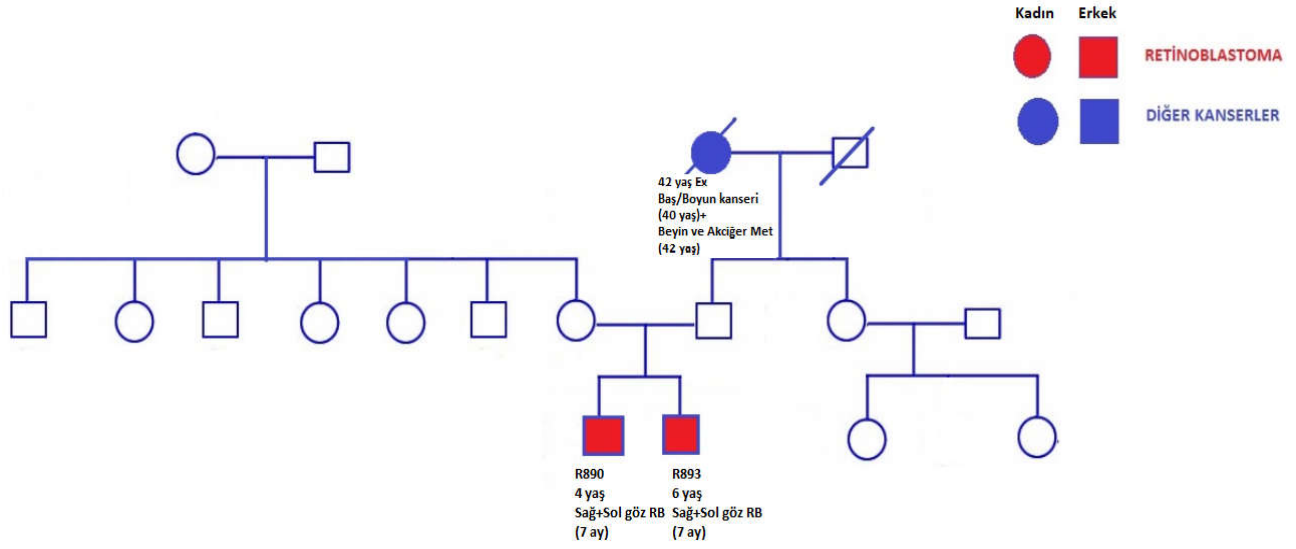
Ailelere göre kanser hikayeleri incelendiğinde; FN096 ailesinde çalışmaya dahil edilen 2 hasta dışında başka bir kanser hikayesi bulunmamaktaydı. FN106 ailesinde 5 kuzende retinoblastoma; 1 kuzende rabdomiyosarkom ve 3. derece bir akrabada beyin tümörü bulunmaktaydı. Bu aileden retinoblastoma tanılı 5 kuzenden 2'si çalışmaya dahil edildi. FN129 ailesinde çalışmaya dahil edilen iki retinoblastoma tanılı kardeş dışında 2. derece 1 akrabada, beyin ve akciğer metastazlı baş-boyun tümörü mevcuttu. Çalışmaya dahil edilen ailelere ait soy ağaçları Şekil 4-1, Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'de verilmiştir.



Şekil 4-1: FN096 ailesine ait soy ağacı



Şekil 4-2: FN106 ailesine ait soy ağacı



**Şekil 4-3: FN129 ailesine ait soy ağacı**

Çalışmada *RBI* gen mutasyonu açısından negatif bulunan yüksek riskli 3 aileye mensup, 6 retinoblastomalı vakada retina oluşumunda rol oynayan genlerin de içinde bulunduğu, klinik açıdan karsinogenezde önemi belirlenmiş toplam 4813 genin analizinin yapılmasını sağlayan TruSight One paneli kullanıldı. Hastalarda *RBI* geni dışında diğer genlerin mutasyon durumları değerlendirildi. Bulunan her bir varyant hem hasta bazında hem aile içerisinde hem de aileler arasında karşılaştırılmış ve bulunan değişiklikler retinoblastoma patogenezi, etiyolojisi ve genetik kökeni konusunda değerlendirildi. Ayrıca bu hasta gruplarında mutasyon saptanan genler arasındaki ilişkiler de araştırıldı. Tüm bulgular biyoinformatik analiz sonucu çıkan değerlendirmelerden elde edildi. Tez çalışması süresince yapılan veri analizi değerlendirme sonuçları sırasıyla aşağıda verildi.

#### 4.1. DNA Kalite Kontrol Verilerinin Değerlendirilmesi

Hastalara ait periferik kan örnekleri kullanılarak DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan DNA materyalinin kalite kontrol analizi ‘‘Nanodrop 2000’’ ve ‘‘Qubit’’ cihaz ölçümleri ile yapıldı. Nanodrop cihazı ile yapılan örneklere ait spektrofotometrik ölçümler Tablo 4-2’de, Qubit cihazı ile yapılan ölçümler ise Tablo 4-3’de görülmektedir.

**Tablo 4-2: Örneklerle ait spektrofotometrik ölçümler**

| Aile No | Hasta No | Nükleik Asit Konsantrasyonu | Birim | A260  | A280  | 260/280 | 260/230 | Örnek Türü | Faktör |
|---------|----------|-----------------------------|-------|-------|-------|---------|---------|------------|--------|
| FN096   | R550     | 64,1                        | ng/μL | 1,281 | 0,663 | 1,93    | 1,78    | DNA        | 50     |
|         | R590     | 85,5                        | ng/μL | 1,71  | 0,879 | 1,94    | 1,74    | DNA        | 50     |
| FN106   | R660     | 145,6                       | ng/μL | 2,912 | 2,15  | 1,35    | 0,37    | DNA        | 50     |
|         | R663     | 74,1                        | ng/μL | 1,481 | 0,751 | 1,97    | 1,81    | DNA        | 50     |
| FN129   | R890     | 285,1                       | ng/μL | 5,703 | 2,995 | 1,9     | 2,04    | DNA        | 50     |
|         | R893     | 194,5                       | ng/μL | 3,89  | 2,314 | 1,68    | 1,11    | DNA        | 50     |

**Tablo 4-3: Örneklerle ait Qubit ölçümleri**

| Örnek no    | Dilüsyon | Konsantrasyon | Dilüsyon  | Konsantrasyon | 50 ng için V | Konsantrasyon | 500 ng için V |
|-------------|----------|---------------|-----------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| <b>R550</b> | 10+40    | 11,6          | 25,9+24,1 | 5,61          | 8,9+1,1      | 47,3          | 11,3 ng       |
| <b>R590</b> | 10+40    | 14,9          | 20,1+29,9 | 5,91          | 8,5+1,5      | 40            | 11,3 ng       |
| <b>R660</b> | 10+40    | 8,94          | 33,6+16,4 | 6,03          | 8,3+1,7      | 48            | 8,5 ng        |
| <b>R663</b> | 10+40    | 11,6          | 25,9+24,1 | 5,7           | 8,8+1,2      | 59            | 9,1 ng        |
| <b>R890</b> | 10+40    | 48,7          | 6,2+43,8  | 5,73          | 8,7+1,3      | 48            | 12,3 ng       |
| <b>R893</b> | 10+40    | 16,1          | 18,6+31,4 | 5,5           | 9,1+0,9      | 46,6          | 10,8 ng       |

#### 4.2. TruSight One Panel Protokolü ve Değerlendirilmesi

Kalite kontrol değerlendirilmesi yapılan örnekler, NextSeq 500 Dizileme platformunda [ILLUMINA] ve TruSight One dizileme panel protokolü kullanılarak tarandı. Yapılan dizileme sonrası Illumina NextSeq 500 cihazından elde edilen BCL formatındaki her hastaya ait veriler öncelikle VCF dosya formatına dönüştürüldü ve Illumina VariantStudio 3.0 masaüstü alıcısı kullanılarak bu dosyalar yazılım programına yüklendi. Her hastaya ait varyant sayıları Tablo 4-4’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-4: Hastalara ait varyant sonuçları**

| Hasta       | Anotasyon Sonrası Varyant Sayısı | Filtreleme Sonrası Varyant Sayısı | Zararlı Varyant Sayısı | Zararlı varyant bulunan gen sayısı |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| <b>R550</b> | 121.757                          | 17                                | 15                     | 15                                 |
| <b>R590</b> | 107.327                          | 9                                 | 7                      | 7                                  |
| <b>R660</b> | 60.491                           | 8                                 | 8                      | 8                                  |
| <b>R663</b> | 99.490                           | 13                                | 10                     | 10                                 |
| <b>R890</b> | 108.627                          | 9                                 | 5                      | 5                                  |
| <b>R893</b> | 110.976                          | 7                                 | 4                      | 4                                  |

### 4.3. Hastalara Ait Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

**R550** nolu hastaya ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde 11.938 bölgede toplam 121.757 varyant saptandı.. Fakat ClinVar patojenik kaydı bulunan, missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 17’e düşürüldü. Daha sonra ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında zararlı olduğu bilinen 15 ayrı gene ait 15 adet varyant saptandı. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-5’de verilmiştir.

**Tablo 4-5: R550 hastasına ait analiz sonuçları**

| Hasta       | Gen             | Mutasyon                | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi               | COSMIC Histolojisi                                           |
|-------------|-----------------|-------------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>R550</b> | <i>ACADS</i>    | c.625G>A (p.Gly209Ser)  | Missense_varyant | Karaciğer; Yumuşak doku; Meme       | Karsinom; Rabdomiyosarkom; Karsinom                          |
| <b>R550</b> | <i>ATP6V0A4</i> | c.1739T>C (p.Met580Thr) | Missense_varyant | Deri; Yumuşak doku                  | Malign melanom; Rabdomiyosarkom                              |
| <b>R550</b> | <i>C2</i>       | c.954G>C (p.Glu318Asp)  | Missense_varyant | Merkezi sinir sistemi; Yumuşak doku | Primitif nöroektodermal tümör-Medüloblastom; Rabdomiyosarkom |
| <b>R550</b> | <i>CFB</i>      | c.26T>A (p.Leu9His)     | Missense_varyant | Yumuşak doku                        | Rabdomiyosarkom                                              |
| <b>R550</b> | <i>CLEC7A</i>   | c.714T>G (p.TYR238Ter)  | Nonsense_varyant | Yumuşak doku                        | Rabdomiyosarkom                                              |
| <b>R550</b> | <i>CX3CR1</i>   | c.935C>T (p.Thr312Met)  | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak doku              | Karsinom; Rabdomiyosarkom                                    |
| <b>R550</b> | <i>FGFR4</i>    | c.1162G>A (p.Gly388Arg) | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku; Yumuşak doku  | Diğer; Rabdomiyosarkom; Hemanjioblastom                      |
| <b>R550</b> | <i>GNPAT</i>    | c.1556A>G (p.Asp519Gly) | Missense_varyant | Hematopoetik ve lenfatik doku       | Hematolojik tümörler                                         |
| <b>R550</b> | <i>HFE</i>      | c.187C>G (p.His63Asp)   | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak doku              | Karsinom; Rabdomiyosarkom                                    |

|      |         |                                          |                  |                                                               |                                                               |
|------|---------|------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| R550 | KRT85   | c.233G>A<br>(p.Arg78His)                 | Missense_varyant | Tiroid                                                        | Diğer                                                         |
| R550 | NQO1    | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser)                | Missense_varyant | Kalın bağırsak; Safra yolu;<br>Prostat; Mide; Yumuşak<br>doku | Karsinom; Karsinom;<br>Karsinom; Karsinom;<br>Hemanjioblastom |
| R550 | RHAG    | c.808G>A<br>(p.Val270Ile)                | Missense_varyant |                                                               |                                                               |
| R550 | RPGRIP1 | c.1639G>T<br>(p.Ala547Ser)               | Missense_varyant |                                                               |                                                               |
| R550 | SLC34A1 | c.272_292del21<br>(p.Val91_Ala97del<br>) | inframe_delesyon |                                                               |                                                               |
| R550 | TYR     | c.1205G>A<br>(p.Arg402Gln)               | Missense_varyant | Deri; Özofagus; Rahim<br>ağız                                 | Malign melanom;<br>Karsinom; Karsinom                         |

**R590** nolu hastaya ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde 11.417 bölgede toplam 107.327 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısının 9’a düştüğü tespit edildi. Daha sonra ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında zararlı olduğu bilinen 7 ayrı gene ait 7 varyant bulundu. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-6’de verilmiştir.

**Tablo 4-6: R590 nolu hastaya ait analiz sonuçları**

| Hasta | Gen      | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC<br>Primer Bölgesi                                      | COSMIC<br>Histolojisi                                         |
|-------|----------|----------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| R590  | ACADS    | c.625G>A<br>(p.Gly209Ser)  | Missense_varyant | Karaciğer; Yumuşak doku;<br>Meme                              | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Karsinom                     |
| R590  | CLEC7A   | c.714T>G<br>(p.TYR238Ter)  | Nonsense_varyant | Yumuşak doku                                                  | Rabdomiyosarkom                                               |
| R590  | CX3CR1   | c.935C>T<br>(p.Thr312Met)  | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak doku                                        | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom                                  |
| R590  | KRT85    | c.233G>A<br>(p.Arg78His)   | Missense_varyant | Tiroid                                                        | Diğer                                                         |
| R590  | MBL2     | c.154C>T<br>(p.Arg52Cys)   | Missense_varyant |                                                               |                                                               |
| R590  | NQO1     | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser)  | Missense_varyant | Kalın bağırsak; Safra yolu;<br>Prostat; Mide; Yumuşak<br>doku | Karsinom; Karsinom;<br>Karsinom; Karsinom;<br>Hemanjioblastom |
| R590  | SERPINA1 | c.1177C>T<br>(p.Pro393Ser) | Missense_varyant |                                                               |                                                               |

Aynı aileye mensup olan **R550** ve **R590** hastalarına ait analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde toplam 229.084 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar Patojenik

kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 17’e düşmüştür. Daha sonra ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında zararlı olduğu bilinen ve her iki hastada da ortak olan 5 varyant bulunmuştur. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-7’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-7: Aynı aileye mensup R550 ve R590 nolu hastalara ait analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi**

| Hasta     | Gen    | Mutasyon                  | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                                      | COSMIC Histolojisi                                            |
|-----------|--------|---------------------------|------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| R550;R590 | ACADS  | c.625G>A<br>(p.Gly209Ser) | Missense_varyant | Karaciğer; Yumuşak doku; Meme                              | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Karsinom                     |
| R550;R590 | CLEC7A | c.714T>G<br>(p.TYR238Ter) | Nonsense_varyant | Yumuşak doku                                               | Rabdomiyosarkom                                               |
| R550;R590 | CX3CR1 | c.935C>T<br>(p.Thr312Met) | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak doku                                     | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom                                  |
| R550;R590 | KRT85  | c.233G>A<br>(p.Arg78His)  | Missense_varyant | Tiroid                                                     | Diğer                                                         |
| R550;R590 | NQO1   | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser) | Missense_varyant | Kalın bağırsak; Safra yolu; Prostat;<br>Mide; Yumuşak doku | Karsinom; Karsinom;<br>Karsinom; Karsinom;<br>Hemanjioblastom |

**R660** numaralı hastaya ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde 8917 bölgede toplam 60.491 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar Patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 8’e düşmüştür. ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında bu 8 genin de zararlı olduğu görülmüştür. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-8’de gösterilmiştir.

Tablo 4-8: R660 nolu hastaya ait analiz sonuçları

| Hasta | Gen     | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                                         | COSMIC Histolojisi                                            |
|-------|---------|----------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| R660  | APOC3   | c.55C>T<br>(p.Arg19Ter)    | Nonsense_varyant |                                                               |                                                               |
| R660  | DSPP    | c.202A>T<br>(p.Arg68Trp)   | Missense_varyant | Yumuşak doku                                                  | Rabdomiyosarkom                                               |
| R660  | FGFR4   | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg) | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku                         | Diğer; Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom                    |
| R660  | MBL2    | c.161G>A<br>(p.Gly54Asp)   | Missense_varyant | Deri; Yumuşak doku                                            | Malign melanom;<br>Rabdomiyosarkom                            |
| R660  | MUTYH   | c.1171C>T<br>(p.Gln391Ter) | Missense_varyant | Kalın bağırsak                                                | Karsinom                                                      |
| R660  | NQO1    | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser)  | Missense_varyant | Kalın bağırsak; Safra yolu;<br>Prostat; Mide; Yumuşak<br>doku | Karsinom; Karsinom;<br>Karsinom; Karsinom;<br>Hemanjioblastom |
| R660  | RPGRIP1 | c.1639G>T<br>(p.Ala547Ser) | Missense_varyant |                                                               |                                                               |
| R660  | TYR     | c.1205G>A<br>(p.Arg402Gln) | Missense_varyant | Deri; Özofagus; Rahim<br>ağız                                 | Malign melanom; Karsinom;<br>Karsinom                         |

**R663** numaralı hastaya ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde 11.023 bölgede toplam 99.490 varyant bulunmuştur. Ancak söz konusu varyantlar ClinVar patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 13’e düşmüştür. ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında bu genlerden 10’unun zararlı olduğu görülmüştür. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-9’de sıralanmıştır.

Tablo 4-9: R663 nolu hastaya ait analiz sonuçları

| Hasta | Gen    | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                                      | COSMIC Histolojisi                                            |
|-------|--------|----------------------------|------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| R663  | APOC3  | c.55C>T<br>(p.Arg19Ter)    | Nonsense_varyant |                                                            |                                                               |
| R663  | CX3CR1 | c.935C>T<br>(p.Thr312Met)  | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak doku                                     | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom                                  |
| R663  | FGFR4  | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg) | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku                      | Diğer; Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom                    |
| R663  | FUT6   | c.739G>A<br>(p.Glu247Lys)  | Missense_varyant | Yumuşak doku; Hematopoetik<br>ve lenfatik doku             | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler                      |
| R663  | GBE1   | c.986A>G<br>(p.TYR329Cys)  | Missense_varyant |                                                            |                                                               |
| R663  | GHRL   | c.178C>A<br>(p.Leu60Met)   | Missense_varyant | Yumuşak doku                                               | Rabdomiyosarkom                                               |
| R663  | KRT85  | c.233G>A<br>(p.Arg78His)   | Missense_varyant | Tiroid                                                     | Diğer                                                         |
| R663  | MUTYH  | c.1171C>T<br>(p.Gln391Ter) | Missense_varyant | Kalın bağırsak                                             | Karsinom                                                      |
| R663  | NQO1   | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser)  | Missense_varyant | Kalın bağırsak; Safra yolu;<br>Prostat; Mide; Yumuşak doku | Karsinom; Karsinom;<br>Karsinom; Karsinom;<br>Hemanjioblastom |
| R663  | TYR    | c.1205G>A<br>(p.Arg402Gln) | Missense_varyant | Deri; Özofagus; Rahim ağzı                                 | Malign melanom; Karsinom;<br>Karsinom                         |

Aynı aileye mensup **R660 ve R663** numaralı hastaların ait analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde toplam 159.981 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar Patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 21’e düşmüştür. Daha sonra ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında zararlı olduğu bilinen ve her iki hastada da ortak olan 5 varyant saptanmıştır. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-10’da gösterilmiştir.

**Tablo 4-10: Aynı aileye mensup R660 ve R663 nolu hastalara ait analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi**

| Hasta     | Gen   | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                                      | COSMIC Histolojisi                                            |
|-----------|-------|----------------------------|------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| R660;R663 | APOC3 | c.55C>T<br>(p.Arg19Ter)    | Nonsense_varyant |                                                            |                                                               |
| R660;R663 | FGFR4 | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg) | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku                      | Diğer;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom                 |
| R660;R663 | MUTYH | c.1171C>T<br>(p.Gln391Ter) | Missense_varyant | Kalın bağırsak                                             | Karsinom                                                      |
| R660;R663 | NQO1  | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser)  | Missense_varyant | Kalın bağırsak; Safra yolu;<br>Prostat; Mide; Yumuşak doku | Karsinom; Karsinom;<br>Karsinom; Karsinom;<br>Hemanjioblastom |
| R660;R663 | TYR   | c.1205G>A<br>(p.Arg402Gln) | Missense_varyant | Deri; Özofagus; Rahim ağzı                                 | Malign melanom;<br>Karsinom; Karsinom                         |

**R890** numaralı hastaya ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde 11.456 bölgede toplam 108.627 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar Patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 9’a düşmüştür. ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında bu genlerden 4’ünün zararlı olduğu görülmüştür. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-11’de belirtilmiştir.

**Tablo 4-11: R890 nolu hastaya ait analiz sonuçları**

| Hasta | Gen    | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                          | COSMIC Histolojisi                         |
|-------|--------|----------------------------|------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| R890  | FGFR4  | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg) | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku          | Diğer; Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom |
| R890  | GBE1   | c.986A>G<br>(p.TYR329Cys)  | Missense_varyant |                                                |                                            |
| R890  | HBD    | c.82G>T<br>(p.Ala28Ser)    | Missense_varyant |                                                |                                            |
| R890  | MCCC2  | c.1015G>A<br>(p.Val339Met) | Missense_varyant |                                                |                                            |
| R890  | UGT1A1 | c.211G>A<br>(p.Gly71Arg)   | Missense_varyant | Yumuşak doku; Hematopoetik<br>ve lenfatik doku | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler   |

**R893** numaralı hastaya ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde 11.530 bölgede toplam 110.976 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar Patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 7’e düşmüştür. ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında bu genlerden 4’ünün zararlı olduğu görülmüştür. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-12’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-12: R893 nolu hastaya ait analiz sonuçları**

| Hasta       | Gen           | Mutasyon                   | Mutasyon Türü     | COSMIC Primer Bölgesi                             | COSMIC Histolojisi                            |
|-------------|---------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>R893</b> | <i>ACADS</i>  | c.625G>A<br>(p.Gly209Ser)  | Missense_variyant | Karaciğer; Yumuşak doku;<br>Meme                  | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Karsinom     |
| <b>R893</b> | <i>FGFR4</i>  | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg) | Missense_variyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku             | Diğer;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom |
| <b>R893</b> | <i>GBE1</i>   | c.986A>G<br>(p.TYR329Cys)  | Missense_variyant |                                                   |                                               |
| <b>R893</b> | <i>UGT1A1</i> | c.211G>A<br>(p.Gly71Arg)   | Missense_variyant | Yumuşak doku;<br>Hematopoetik ve lenfatik<br>doku | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler      |

Aynı aileye mensup **R890** ve **R893** numaralı hastalara ait analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde toplam 219.603 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”), frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 16’ya düşmüştür. Daha sonra ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında zararlı olduğu bilinen ve her iki hastada da ortak olan 3 varyant saptanmıştır. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-13’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-13: Aynı aileye mensup R890 ve R893 nolu hastalara ait analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi**

| Hasta            | Gen           | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                          | COSMIC Histolojisi                            |
|------------------|---------------|----------------------------|------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>R890;R893</b> | <i>FGFR4</i>  | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg) | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku          | Diğer;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom |
| <b>R890;R893</b> | <i>GBE1</i>   | c.986A>G<br>(p.TYR329Cys)  | Missense_varyant |                                                |                                               |
| <b>R890;R893</b> | <i>UGT1A1</i> | c.211G>A<br>(p.Gly71Arg)   | Missense_varyant | Yumuşak doku;<br>Hematopoetik ve lenfatik doku | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler      |

Tüm hastalara (**R550, R590, R660, R663, R890 ve R893**) ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde toplam 608.668 varyant bulunmuştur. Fakat ClinVar Patojenik kaydı bulunan missense (Polyphen “damaging” ve SIFT “deleterious”) , frameshift, stop gained, stop lost, başlatıcı kodon, inframe insersiyon, inframe delesyon ve splice bölge mutasyonlarına göre filtreleme yapıldığında bu varyantların sayısı 63’e düşmüştür. Daha sonra ALAMUT, HGMD, dbSNP veri tabanları üzerinden yapılan taramalar sonrasında zararlı olduğu bilinen 27 varyant saptanmıştır. Çalışma kapsamında çalışılan 6 hastanın 5’inde ortak olarak görülen FGFR genindeki c.1162G>A (p.Gly388Arg) varyantı dikkat çekmektedir. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-14’da gösterilmiştir.

Tablo 4-14: Tüm hastalara ait analiz sonuçları

| Hasta                            | Gen          | Mutasyon                             | Mutasyon Türü    | COSMIC<br>Primer Bölgesi                          | COSMIC<br>Histolojisi                                              |
|----------------------------------|--------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| R550;R590;<br>R893               | ACADS        | c.625G>A<br>(p.Gly209Ser)            | Missense_varyant | Karaciğer; Yumuşak<br>doku; Meme                  | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Karsinom                          |
| R660;R663                        | APOC3        | c.55C>T<br>(p.Arg19Ter)              | Nonsense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R550                             | ATP6V0A<br>4 | c.1739T>C<br>(p.Met580Thr)           | Missense_varyant | Deri; Yumuşak doku                                | Malign melanom;<br>Rabdomiyosarkom                                 |
| R550                             | C2           | c.954G>C<br>(p.Glu318Asp)            | Missense_varyant | Merkezi sinir sistemi;<br>Yumuşak doku            | Primitif nöroektodermal<br>tümör-Medüloblastom;<br>Rabdomiyosarkom |
| R550                             | CFB          | c.26T>A (p.Leu9His)                  | Missense_varyant | Yumuşak doku                                      | Rabdomiyosarkom                                                    |
| R550;R590                        | CLEC7A       | c.714T>G<br>(p.TYR238Ter)            | Nonsense_varyant | Yumuşak doku                                      | Rabdomiyosarkom                                                    |
| R550;R590;<br>R663               | CX3CR1       | c.935C>T<br>(p.Thr312Met)            | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak<br>doku                         | Karsinom;<br>Rabdomiyosarkom                                       |
| R660                             | DSPP         | c.202A>T<br>(p.Arg68Trp)             | Missense_varyant | Yumuşak doku                                      | Rabdomiyosarkom                                                    |
| R550;R660;<br>R663;R890;<br>R893 | FGFR4        | c.1162G>A<br>(p.Gly388Arg)           | Missense_varyant | Tiroid; Yumuşak doku;<br>Yumuşak doku             | Diğer;<br>Rabdomiyosarkom;<br>Hemanjioblastom                      |
| R663                             | FUT6         | c.739G>A<br>(p.Glu247Lys)            | Missense_varyant | Yumuşak doku;<br>Hematopoetik ve<br>lenfatik doku | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler                           |
| R663;R890;<br>R893               | GBE1         | c.986A>G<br>(p.TYR329Cys)            | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R663                             | GHRL         | c.178C>A<br>(p.Leu60Met)             | Missense_varyant | Yumuşak doku                                      | Rabdomiyosarkom                                                    |
| R550                             | GNPAT        | c.1556A>G<br>(p.Asp519Gly)           | Missense_varyant | Hematopoetik ve<br>lenfatik doku                  | Hematolojik tümörler                                               |
| R890                             | HBD          | c.82G>T<br>(p.Ala28Ser)              | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R550                             | HFE          | c.187C>G<br>(p.His63Asp)             | Missense_varyant | Pankreas; Yumuşak<br>doku                         | Karsinom;Rabdomiyosar<br>kom                                       |
| R550;R590;<br>R663               | KRT85        | c.233G>A<br>(p.Arg78His)             | Missense_varyant | thyroid                                           | other                                                              |
| R660                             | MBL2         | c.161G>A<br>(p.Gly54Asp)             | Missense_varyant | Deri; Yumuşak doku                                | Malign melanom;<br>Rabdomiyosarkom                                 |
| R590                             | MBL2         | c.154C>T<br>(p.Arg52Cys)             | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R890                             | MCCC2        | c.1015G>A<br>(p.Val339Met)           | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R660;R663                        | MUTYH        | c.1171C>T<br>(p.Gln391Ter)           | Missense_varyant | Kalın bağırsak                                    | Karsinom                                                           |
| R550;R590;<br>R660;R663          | NQO1         | c.559C>T<br>(p.Pro187Ser)            | Missense_varyant | Missense_varyant                                  | Kalın bağırsak; Safra<br>yolu; Prostat; Mide;<br>Yumuşak doku      |
| R550                             | RHAG         | c.808G>A<br>(p.Val270Ile)            | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R550;R660                        | RPGRIP1      | c.1639G>T<br>(p.Ala547Ser)           | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R590                             | SERPINA<br>1 | c.1177C>T<br>(p.Pro393Ser)           | Missense_varyant |                                                   |                                                                    |
| R550                             | SLC34A1      | c.272_292del21<br>(p.Val91_Ala97del) | inframe_delesyon |                                                   |                                                                    |
| R550;R660;<br>R663               | TYR          | c.1205G>A<br>(p.Arg402Gln)           | Missense_varyant | Deri; Özofagus; Rahim<br>ağız                     | Malign melanom;<br>Karsinom; Karsinom                              |
| R890;R893                        | UGT1A1       | c.211G>A<br>(p.Gly71Arg)             | Missense_varyant | Yumuşak doku;<br>Hematopoetik ve<br>lenfatik doku | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler                           |

Tüm analiz sonuçları aile tabanlı değerlendirildiğinde FN096 ailesinde *CLEC7A* genindeki c.714T>G (p.TYR238Ter) varyantı; FN106 ailesinde *APOC3* genindeki c.55C>T (p.Arg19Ter) ve *MUTYH* genindeki c.1171C>T (p.Gln391Ter) varyantları; FN129 ailesinde ise *UGT1A1* genindeki c.211G>A (p.Gly71Arg) varyantı dikkat çekmektedir. Tüm bu varyantlara ait özellikler Tablo 4-15’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-15: Ailelere özgü patojenik varyantlar**

| Aile No | Hasta     | Gen           | Mutasyon                   | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi                             | COSMIC Histolojisi                       |
|---------|-----------|---------------|----------------------------|------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------|
| FN096   | R550;R590 | <i>CLEC7A</i> | c.714T>G<br>(p.TYR238Ter)  | Nonsense_varyant | Yumuşak doku                                      | Rabdomiyosarkom                          |
|         | R660;R663 | <i>APOC3</i>  | c.55C>T<br>(p.Arg19Ter)    | Nonsense_varyant |                                                   |                                          |
| FN106   | R660;R663 | <i>MUTYH</i>  | c.1171C>T<br>(p.Gln391Ter) | Missense_varyant | Kalın bağırsak                                    | Karsinom;                                |
| FN129   | R890;R893 | <i>UGT1A1</i> | c.211G>A<br>(p.Gly71Arg)   | Missense_varyant | Yumuşak doku;<br>Hematopoetik ve<br>lenfatik doku | Rabdomiyosarkom;<br>Hematolojik tümörler |

Hastalar prognoz ve sağkalım açısından değerlendirildiğinde; ikincil tümör sebebi ile hayatını kaybeden R660 hastası dikkat çekmektedir. R660 diğer hastalar ile karşılaştırıldığında onlardan farklı olarak *DSPP* geninde c.202A>T (p.Arg68Trp); *MBL2* geninde ise c.161G>A (p.Gly54Asp) patojenik varyantlarına sahip olduğu görülmüştür. Bu varyantlara ait özellikler Tablo 4-16’da gösterilmiştir.

**Tablo 4-16: R660 nolu hastaya özgü patojenik varyantlar**

| Hasta | Gen         | Mutasyon                 | Mutasyon Türü    | COSMIC Primer Bölgesi | COSMIC Histolojisi                 |
|-------|-------------|--------------------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|
| R660  | <i>DSPP</i> | c.202A>T<br>(p.Arg68Trp) | Missense_varyant | Yumuşak doku          | Rabdomiyosarkom                    |
| R660  | <i>MBL2</i> | c.161G>A<br>(p.Gly54Asp) | Missense_varyant | Deri; Yumuşak doku    | Malign melanom;<br>Rabdomiyosarkom |

#### 4.4. Genler Arasındaki Fonksiyonel İlişki Analizi

Yapılan analizler sonrasında patojenik varyantlara sahip olduğu bilinen genler ve *RBI* geni arasındaki fonksiyonel ilişkiyi yorumlayabilmek için DAVID Fonksiyonel Anotasyon veritabanı v.6.8 [Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics(LIB)] ve STRING Fonksiyonel Protein İlişki ağı v.10.5 kullanılmıştır. Bu veritabanları yeni nesil dizileme, mikroyarray gibi genomik çalışmalardan elde edilen büyük gen gruplarının fonksiyonel anotasyonu için geliştirilmiş programlardır [73-75].

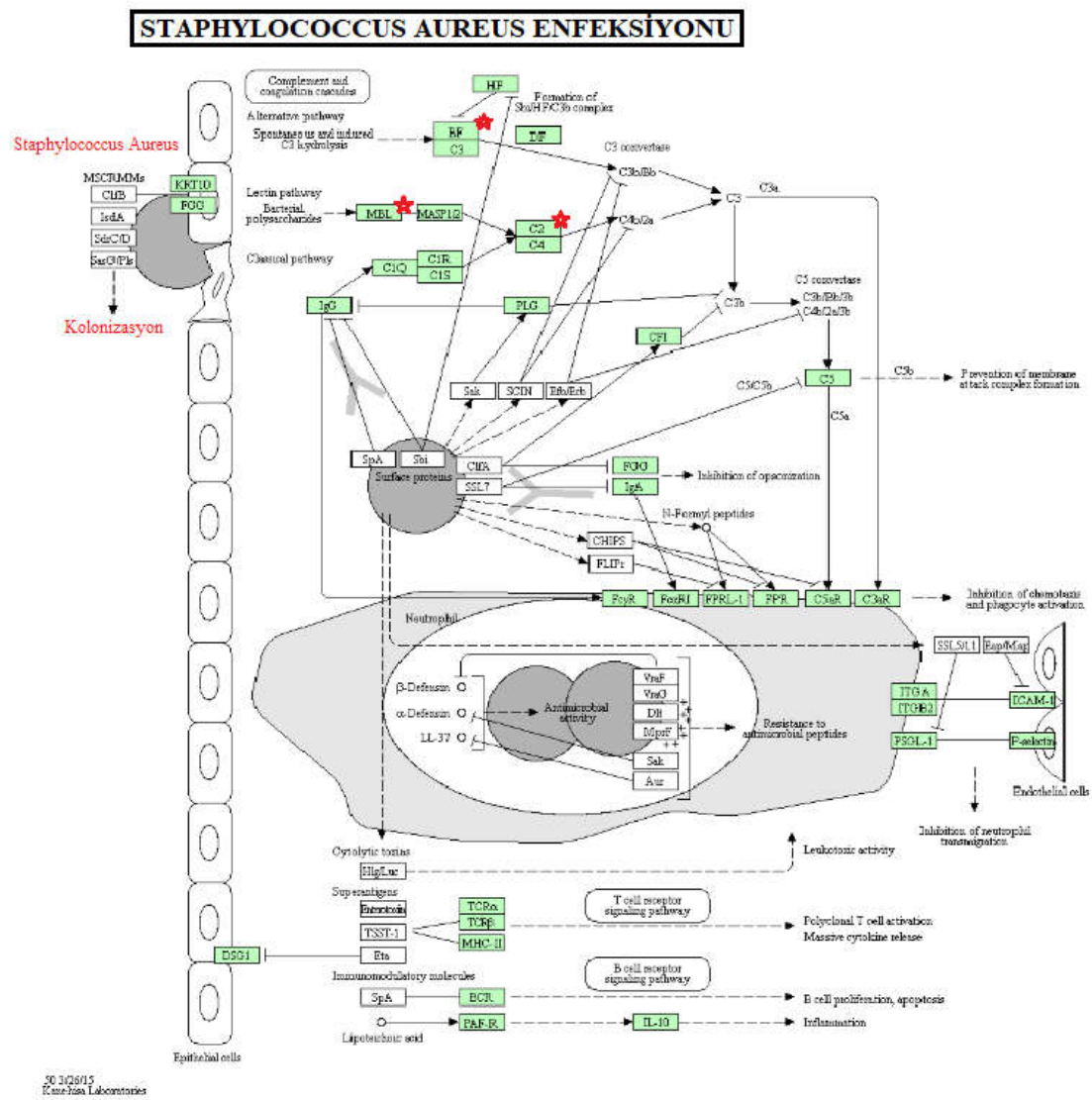
##### 4.4.1. Metabolik Yolaklar İle Genlerin İlişkileri

DAVID ve STRING veritabanlarına yüklenen toplam 27 genden oluşan deney grubumuza ait veriler anotasyon sonrası KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ve REACTOME yolakları ile ilişkili bulunmuştur (Tablo 4-17).

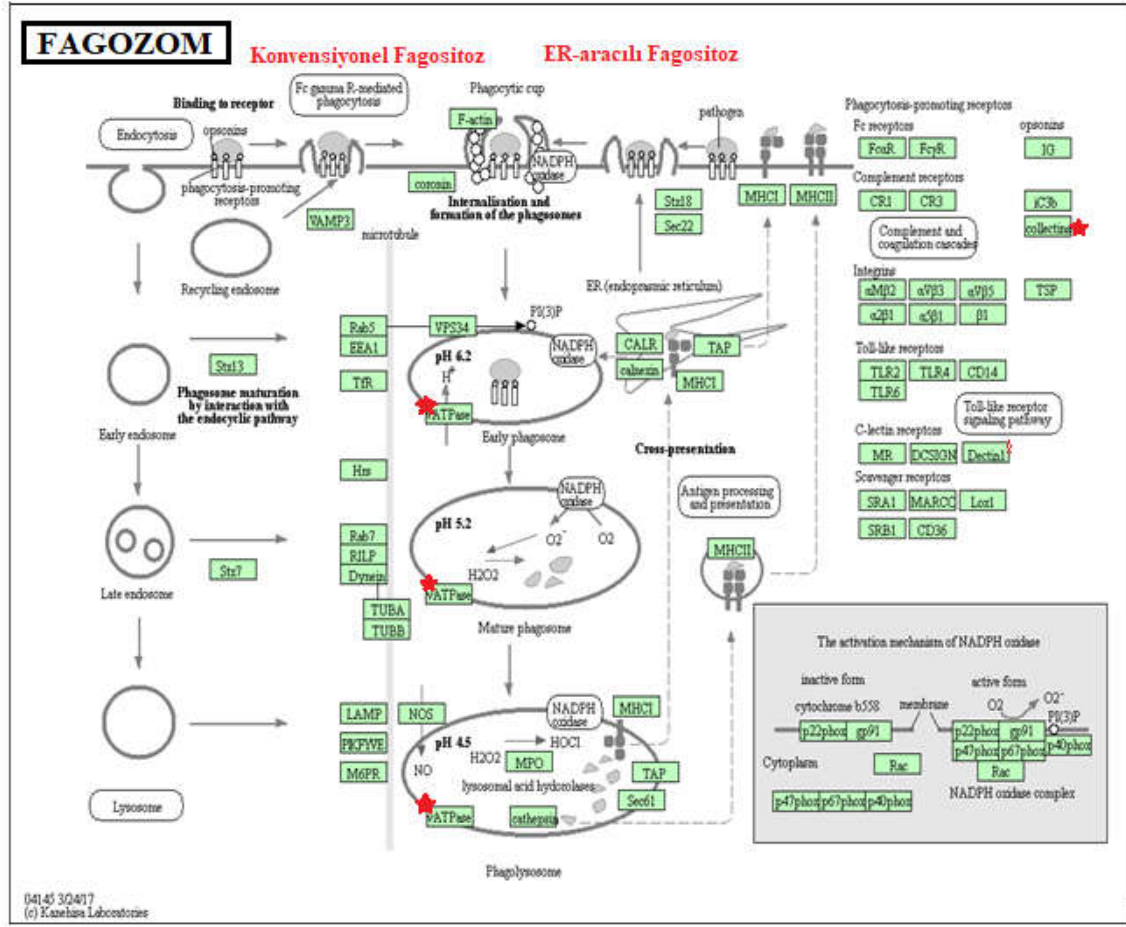
**Tablo 4-17: Gen setlerinin ilişkili oldukları metabolik yolaklar**

| YOLAK                                                    | İlişkili Genler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KEGG Yolağı<br>Kompleman ve Koagülasyon Kaskadı          |  C2  SERPINA1  MBL2  CFB |
| KEGG Yolağı<br>Fagozom                                   |  ATP6V0A4  CLEC7A  MBL2                                                                                      |
| KEGG Yolağı<br>Staphylococcus Aureus Enfeksiyonu         |  C2  MBL2  CFB                                                                                              |
| REACTOME Yolağı<br>Kataliz                               |  C2  MBL2                                                                                                                                                                                       |
| KEGG Yolağı<br>Tüberküloz                                |  ATP6V0A4  CLEC7A                                                                                                                                                                                 |
| REACTOME Yolağı<br>Kompleman Kaskadının Düzenlenmesi     |  C2  CFB                                                                                                                                                                                        |
| KEGG Yolağı<br>Valin, Lösin ve İzolösin Yıkımı           |  ACADS  MCCC2                                                                                                                                                                                    |
| REACTOME Yolağı<br>C3 Dönüştürücülerinin Spontane Ayrımı |  C2  CFB                                                                                                                                                                                        |
| REACTOME Yolağı<br>Kataliz                               |  C2  CFB                                                                                                                                                                                        |
| KEGG Yolağı<br>Nişasta ve Sukroz Metabolizması           |  UGT1A1  GBE1                                                                                                                                                                                    |





**Şekil 4-5: Staphylococcus aureus enfeksiyonunda etkili genler**

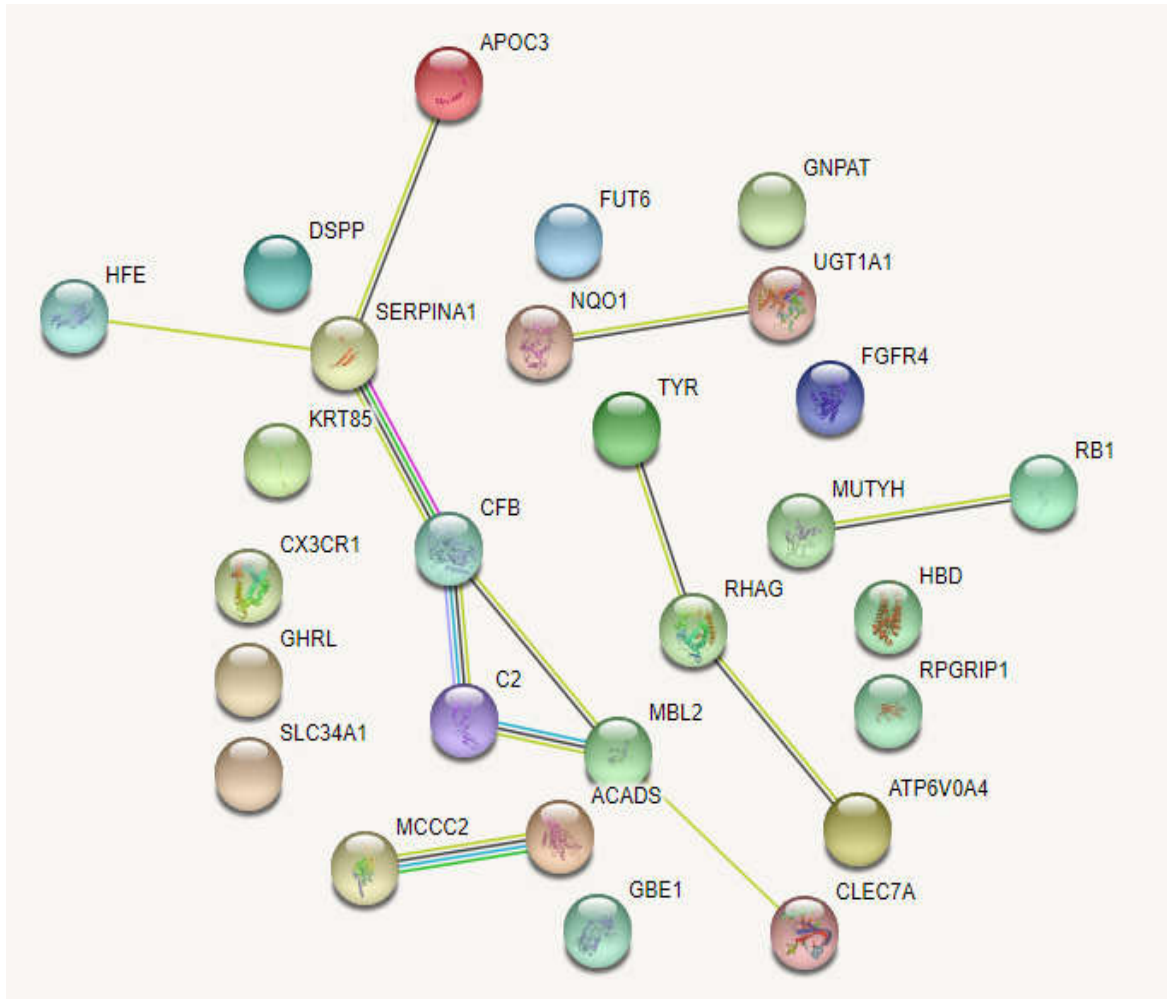


Şekil 4-6: Hücresel fagositoz aşamasında etkili genler

#### 4.4.2. Protein-Protein Etkileşim Analizi

STRING veritabanında yapılan analizler sonrasında proteinler arası etkileşim incelenmiş ve Şekil 4-7’de gösterilmiştir. Buna göre; toplam 27 nod (daire) ve 12 uç belirlenmiştir. Her nod, tek bir protein kodlayan gen lokusu tarafından üretilen tüm proteinleri temsil etmektedir. Uçlar yani birbiri ile ilişkisi olduğu belirlenen proteinler arasındaki bağlantı ise protein-protein etkileşimini göstermektedir. Bu veritabanındaki değerlendirmede ilişkilerin spesifik ve anlamlı olması amaçlanmaktadır, diğer bir deyişle proteinler ortak bir fonksiyona ortak katkıda bulunur ama bu mutlaka birbirlerine fiziksel olarak bağlı oldukları anlamına gelmez. Analizler sonrasında elde edilen bu protein ağı tahmin edilenden daha anlamlı düzeyde protein etkileşimi göstermiştir (p: 0,0000097). Bu, çalışmada elde edilen protein setinin, genomdan çekilen benzer boyuttaki proteinlerin rastgele bir setinden beklenenden daha fazla

etkileşime girdiği anlamına gelmektedir. Bu durum da protein grubunun en azından kısmen biyolojik olarak birbiri ile ilişkiye girdiği ya da bağlandığını gösterir.



#### Nod (Daire) Rengi



Renkli nodlar:  
Sorgu proteinleri ve etkileşenlerin ilk kabuğu



Beyaz nodlar:  
Etkileşenlerin ikinci kabuğu

#### Nod (Daire) İçeriği



Boş nodlar:  
3D yapısı bilinmeyen proteinler



Dolu nodlar:  
3D yapısı bilinen ya da tahmin edilen proteinler

#### Bilinen Etkileşimler



Düzenlenmiş veritabanlarından



Deneyisel olarak belirlenmiş

#### Tahmin Edilen Etkileşimler



Gen komşuluğu



Gen füzyonları



Gen birlikte oluşumu

#### Diğerleri



Metin madenciliği



Birlikte ekspresyon



Protein homolojisi

Şekil 4-7: Protein-protein etkileşimi

STRING analizi sonrası ilişkili bulunan gen grupları ve güven skorları Tablo 4-18’de verilmiştir. Güven skoru 0-1 değerleri arasındadır. Güven skoru cut-off değeri 0,4 olarak kabul edilmiştir. Bunun altında skora sahip proteinler diğer proteinlerle ilişkisiz olarak kabul edilmiş ve ilişki dışı bırakılmıştır.

**Tablo 4-18: Fonksiyonel ilişkili genler ve güven skorları**

| Nod 1           | Nod 2           | Skor  | Güven durumu |
|-----------------|-----------------|-------|--------------|
| <i>ACADS</i>    | <i>MCCC2</i>    | 0,697 | Anlamlı      |
| <i>APOC3</i>    | <i>SERPINA1</i> | 0,414 | Anlamlı      |
| <i>ATP6V0A4</i> | <i>RHAG</i>     | 0,496 | Anlamlı      |
| <i>C2</i>       | <i>CFB</i>      | 0,906 | Anlamlı      |
| <i>C2</i>       | <i>MBL2</i>     | 0,923 | Anlamlı      |
| <i>CFB</i>      | <i>MBL2</i>     | 0,415 | Anlamlı      |
| <i>CFB</i>      | <i>SERPINA1</i> | 0,547 | Anlamlı      |
| <i>CLEC7A</i>   | <i>MBL2</i>     | 0,400 | Anlamlı      |
| <i>HFE</i>      | <i>SERPINA1</i> | 0,491 | Anlamlı      |
| <i>MUTYH</i>    | <i>RB1</i>      | 0,489 | Anlamlı      |
| <i>NQO1</i>     | <i>UGT1A1</i>   | 0,476 | Anlamlı      |
| <i>RHAG</i>     | <i>TYR</i>      | 0,768 | Anlamlı      |

#### 4.5. Hastalara Ait Klinik ve Genetik Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmaya dahil edilen hastalar klinik ve genetik verilerine göre değerlendirildiğinde hastaların 3’ü (%50) unilateral diğer 3’ü (%50) ise bilateral retinoblastoma tanılıydı. Bunlardan 4’ü (%66,7) erkek 2’si (%33,3) kızdı. Tanı yaş ortalamaları yaklaşık 8 aydı (1,5-18 ay). Hastaların sağkalım durumları değerlendirildiğinde sadece 1 hastanın (%16,7) ikincil tümör sebebi ile hayatını kaybettiği görülmüştür. 4 hastada (%66,7) tanı lökokeri ile konulurken 2 hastada (%33,3) lökokeriye rastlanılmamıştır. Hastaların 4’ünde (%66,6) gözde içe doğru kayma; 1’inde (%16,7) dışa kayma görülürken 1’inde (%16,7) ise hiç şaşılık görülmemiştir.

Hastaların tedavi durumları değerlendirildiğinde; 4 (%66,7) hastanın kemoterapi, 3 (%50) hastanın intraarteriyal kemoterapi, 1 (%16,7) hastanın kriyoterapi, 1 (%16,7) hastanın lazerterapi, 2 (%33,3) hastanın radyoterapi aldığı ve 2 (%33,3) hastanın ise enükleasyon işlemine tabii tutulduğu görülmüştür. Radyoterapi alan hastalardan birinin sonraki dönemlerde ikincil tümöre yakalanması ve ikinci tümör sebebi ile hayatını kaybetmesi dikkat çekmektedir.

Literatürler incelendiğinde; annelerin hamilelik dönemindeki sabah kusmaları ve ailede makinistlik kaynakçılık, metal endüstrisi, askeriye gibi çeşitli riskli meslek gruplarının bulunması retinoblastoma hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum dikkate alınarak aile grupları değerlendirildiğinde; 3 (%50) hastanın annesinde hamilelik döneminde sabah kusmaları görülmüştür. Bu oran literatürün aksine istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Ailede riskli meslek grupları bulunma durumu değerlendirildiğinde ise; tüm ailelerde yukarıda bahsi geçen meslek gruplarının varlığı dikkat çekicidir (%100). FN096 ailesinde metal endüstrisi ve inşaat sektörleri; FN106 ailesinde çelik konstriksiyon, ambalajlama işi ve proplilen glikol maruziyeti; FN129 ailesinde uzun yıllar çiftçilik mesleği sebebiyle tarım ilacı maruziyeti dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar retinoblastoma hastalığında özellikle üst jenerasyondan gelen mesleki maruziyetlerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ).

Analiz sonrasında elde edilen varyantlar hasta bazında değerlendirildiğinde; 5 (%83,3) hastada *FGFR4* geninde; 4 (%66,7) hastada *NQO1* geninde mutasyon olduğu görülmüştür. Bu oran bu genler ile retinoblastoma hastalığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir ( $p<0,05$ ). Varyantlar aile bazında değerlendirildiğinde ise; FN096 ailesinde *CLEC7A* geni; FN106 ailesinde *APOC3* ve *MUTYH* genleri; FN129 ailesinde ise *UGT1A1* geni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Retinoblastoma retinada ortaya çıkan ve çocuklarda en sık görülen intraoküler malignitedir [76]. Retinoblastoma oluşumunda önemli genetik etkenlerin rol aldığı bilinmektedir. Klinik önemi ve genetik sebebi arasındaki kuvvetli bağlardan dolayı, retinoblastoma kalıtsal kanserlerin prototipi sayılmaktadır. Bugüne kadar ki literatür bilgisine göre hastalığın retinoblastoma geni olan *RBI* genindeki mutasyonlar tarafından başlatıldığı düşünülmektedir. *RBI* genindeki genomik hasarın gerçek nedeni ise kimse tarafından net olarak bilinmemekte ancak retinoblastoma, yerel çevreden bağımsız olarak tüm ırklarda sabit bir oranda ortaya çıkmaktadır. Hastaların yaklaşık % 50'sinde *RBI* geninin ilk kopyası hastanın normal hücrelerinin çoğunda veya tümünde hasar görmüş durumdadır. Bir retinal tümör, gelişmekte olan bir retinal hücrede *RBI* geninin ikinci kopyasının da hasar gördüğü durumda gelişebilir [77]. Ancak *RBI* geninde yapılan mutasyon taramaları sonucunda negatif bulunan hastalarda hastalığın nasıl oluştuğu henüz net olarak bilinmemektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında; ailesinde retinoblastoma hastalığı hikayesi olup *RBI* gen mutasyonu saptanmamış yüksek riskli ailelerde retina oluşumunda rol oynayan genlerin de içinde bulunduğu, klinik açıdan karsinogenezde önemi belirlenmiş toplam 4813 gendeki değişikliklerin yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak araştırılması hedeflendi. Literatürlerde özellikle aynı aileden hastaların bulunduğu ve 4813 gene ait mutasyonların bir arada değerlendirildiği bir çalışma mevcut değildir. Bu açıdan düşünüldüğünde bu çalışmanın retinoblastoma patogenezi, etiyolojisi ve genetik kökeni konusunda literatüre oldukça katkı sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca yeni bulunan gen mutasyonlarının hastalara ve onların sonraki jenerasyonlarına özel erken tanı ve tedavi seçenekleri açısından yarar sağladığı da kabul edilmektedir. Dolayısıyla, hastalık tanısının konmasına bağlı olarak belirsizliği ortadan kaldırıp, hasta bireylerin ileride karşılaşılabileceği sorunların önceden bilinebilmesine yardımcı olmaktadır. Ayrıca, ailenin yeni gebeliklerinde prenatal ve preimplantasyon evrede genetik testler yapılarak hastalık tanısının daha bebek doğmadan konabilmesine de olanak vermektedir.

Bugüne kadarki veriler değerlendirildiğinde; retinoblastomanın sadece *RBI* mutasyonu tarafından başlatılmadığı düşünülmekteydi. Bu nedenle hastalık oluşumundan sorumlu olabilecek diğer genlerdeki mutasyonların retinoblastoma

patogenezindeki rolünün ne olduğu da hala bilinmemektedir. Bunun arkasında 2 mekanizma olduğu fikri mevcuttur. Bu mekanizmalardan ilki; her iki *RBI* allel kaybının sadece retinoblastomanın bening başlatıcısı olan retinomaya sebep olduğu ve diğer genlerin ise kanser progresyonunu etkilediği görüşüdür. İkincisi ise; unilateral retinoblastomalı hastaların %2'sinin *RBI* mutasyonu ve *MYCN* amplifikasyonuna sahip olduğu ve farklı bir gen ile başlatıldığı düşüncesidir [76].

Dimaras ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada; *RBI* kaybının proliferatif olmayan retinomaya neden olduğunu ve genomik instabilitenin artmasının retinoblastoma progresyonu ile ilişkili olduğunu savunmuşlardır [78]. *RBI* kaybına ek olarak diğer genlerin kopya sayısı değişiklikleri de retinoblastomada yaygın olarak görülmektedir. Corson ve ark. 2007 yılında *MDM4*, *KIF14* (1q32), *MYCN* (2p24), *DEK* ve *E2F3* (6p22) onkogenlerinde 4-10 kopya arasında kazanım olduğunu ve *CDH11* (16q22-24) tümör baskılayıcı geninde ise kayıp olduğunu belirtmişlerdir [79]. Huang ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada; retinoblastomada bazı mikroRNA'ların farklı ekspresyon profillerini araştırmışlar ve let-7b downregülasyonunu saptamışlardır [80]. Kooi ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada; retinoblastomalı hastalarda *BCOR* ve *CREBBP* genlerinde tek nükleotidlik delesyon ve insersiyonlara rastlamışlar ve bu genlerin retinoblastoma ile ilişkili olabileceklerini savunmuşlardır [81]. Zhang ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada; *SYK* protoonkogeninin retinoblastomada upregüle olduğunu ve böylece tümör hücre sağkalımını tetiklediğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada 42 retinoblastomalı hastada 11 genin tüm ekzonlarını dizilemişler ve hastalarda sadece *BCOR* geninde mutasyona rastlamışlardır [82]. Diğer kanserler ile karşılaştırıldığında, retinoblastoma en az mutasyona uğrayan kanserlerdendir ve gen ekspresyonlarının epigenetik modifikasyonları retinoblastomanın progresyonunda önemli bir rol oynamaktadır [83]. Bu bilgiler ışığında çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde; 27 patojenik varyant saptanan 26 genin retinoblastoma patogenezinde aday genler olabileceği ve bu genlerin retinoblastoma progresyonunun arkasında yatan anahtar mekanizmayı oluşturabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *RBI* gen mutasyonu bulunmayan hastalarımızda görülen bu genomik değişikliklerin hastalığın oluşumunu tetiklediği sonucuna da ulaşılabilmektedir.

Çalışmamızda R550, R590 ve R893 numaralı hastalarımızda *ACADS* geninde c.625G>A (p.Gly209Ser) varyantı saptanmıştır. *ACADS* geni, açıl-CoA dehidrogenaz

ailesinin üyesi olan bir tetramerik mitokondriyal flavoproteini kodlar. Kısa zincirli açıl-CoA dehidrogenaz (SCAD) olarak adlandırılan bu enzim, mitokondriyal yağ asidi beta-oksidasyon yolunun başlangıç aşamasını katalize eder. Yağ asidi oksidasyonu yağların parçalanıp enerjiye dönüştürüldüğü çok aşamalı bir olaydır. *ACADS* genindeki mutasyonlar, kısa zincirli açıl-CoA dehidrogenaz eksikliği (SCADD) ile ilişkilendirilmiştir. *ACADS* geninde 55'den fazla mutasyonun SCAD eksikliğine neden olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonlar enzimin kısa zincirli yağ asitlerini düzgün şekilde metabolize etmesini engeller. Sonuç olarak, bu yağlar enerji haline dönüştürülmez; enerji eksikliği (letarji), düşük kan şekeri (hipoglisemi), zayıf kas tonusu (hipotoni) ve zayıflık gibi karakteristik belirtilere ve semptomlara yol açar [84]. Ayrıca genetik belirteç olarak da *ACADS* patojenik varyantları kullanılmaktadır. Bu patojenik varyantlar genellikle SCAD enzimatik aktivitesini etkisiz hale getiren veya bozan missense değişikliklerdir. Bilinen yatkınlık varyantları c.511C> T ve c.625G>A'dır. Van Maldegem ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada; Amerika'da yeni doğmuş 694 SCADD tanılı vakanın %6'sında homozigot c.625G>A değişikliğine rastlamışlardır [85]. Yatkınlık varyantlarının, hastalığın ortaya çıkması için gerekli bir veya daha fazla genetik ya da çevresel faktörleri temsil ettiği düşünülmektedir [86]. Corydon ve ark. 1996 yılında yaptıkları çalışmada; c.625G>A varyantının etilmalonik asitüria (EMA) ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [87]. Çalışmamızda R550, R590 ve R893 hastalarımızda bu gendeki c.625G>A (p.Gly209Ser) varyantına rastlanması bu hastalarda ileriki yaşlarda SCAD eksikliği görülebileceğini göstermektedir. R550 nolu hastamızda ayrıca *GNPAT* geninde c.1556A>G (p.Asp519Gly) varyantına da rastlanmıştır. *GNPAT* geni dihidroksiasetonfosfat açıltransferaz (DHAPAT) olarak bilinen bir enzim üretir. Sindirim ve sinir sisteminde kullanılan yağların üretimi için gerekli olan peroksizomların içinde yer alan bu enzim plazmalojenler olarak adlandırılan yağ moleküllerinin üretiminin ilk aşamasından sorumludurlar. Bu moleküller hücreyi oksidatif strese korurlar. DHAPAT eksikliği bir açıl CoA eksikliğidir [88]. Literatürler incelendiğinde açıl CoA'nın retinoik asit yolağı ile de ilişkili olduğu görülmüştür. Retinoik asit (RA), nükleer RA reseptörleri (RAR'lar) için ligand görevi gören ve onları transkripsiyonel baskılayıcılardan aktivatörlere dönüştüren, A vitamini (retinol) türevidir, peptidik olmayan, küçük bir lipofilik moleküldür. A vitamininin izomerizasyonu, retinanın fotoreseptör hücrelerinde fototransdüksiyon sürecini tetikleyerek görme fonksiyonunun gerçekleşmesini sağlar

[89]. Açıl CoA/Retinol açıltransferaz (ARAT) aktivitesi ince bağırsak, karaciğer, ya dokuları, deri, testis ve retina gibi birçok dokuda gösterilmiştir [90-93]. Ayrıca retinoik döngüdeki genlerin birçok hastalıkla da ilişkili olduğu bulunmuştur [94-97]. Genetik mutasyonlar ve retinal hastalıklar arasındaki bu ilişki retinoik döngüde bu proteinlerin fizyolojik rolü hakkında da bilgi vermektedir. Retinoik asit, ayrıca hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser tedavisinde de önemli rol oynamaktadır. Akciğer, prostat, meme, over, mesane, ağız ve deri kanserlerinin retinoik asit ile baskılandığı gösterilmiştir [98-102]. Chen ve ark. 2014 yılında, düşük doz retinoik asitin hücre döngüsünü durdurduu ve yüksek dozda retinoik asitin kanser hücrelerinin apoptozuna neden olduğunu göstermişlerdir [103]. Bu sonuçlar, retinoik asidin moleküler mekanizmalarının kanser hücrelerinin kaderini kontrol edebileceğini gösteren yeni kanıtlar ortaya koymaktadır. Retinoik asit vücutta kanser oluşumunu engelleme fonksiyonunun yanında kanser oluştuktan sonra da kanser hücrelerine saldırarak onların büyüme ve bölünmesini durdurup özel yolaklar yardımıyla hücrelerin ölümünü tetikleme özelliğine de sahiptir. Retinoik asit eksikliği immün sistem, embriyonik gelişim, görme fonksiyonu, beyin fonksiyonu ve diğer sistemlerde hasarlara sebep olur [104]. Bu bilgiler ışığında *ACADS* ve *GNPAT* genlerinde bulunan patojenik varyantların retinoik asit yolağına etki ederek retinoblastomayı tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda aynı aileye mensup R550 ve R590 nolu hastalarımızda ***CLEC7A*** geninde c.714T>G (p.Tyr238Ter) varyantı saptanmıştır. Dectin-1 olarak da bilinen *CLEC7A*, fungal hücre duvarlarındaki beta-glukanları tanıyan, fagositoz ve reaktif oksijen üretimi gibi doğrudan hücreSEL antimikrobiyal aktiviteyi tetikleyen miyeloid fagositler (makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofiller) tarafından ifade edilen bir model tanıma reseptörüdür [105]. Literatürlerde Dectin-1 eksikliği ve gözde de görülebilen mukokutanöz fungal enfeksiyonları arasında ilişki olduğu belirtilmiştir [106]. Mukokutanöz fungal enfeksiyonlarının immün defekte sebep olduğu düşünülmektedir. Ferwerda ve ark. 2009 yılında; aynı aileden 4 kadında yapmış oldukları çalışmada *CLEC7A* geninde c.714T>G (p.Tyr238Ter) mutasyonuna rastlamışlardır ve bu varyantın hastalık ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [107]. Çalışmamızda da aynı aileden R550 ve R590 nolu hastalarda bu mutasyona rastlanmıştır. Bu hastalarda mantar enfeksiyonunun olup olmadığı ve retinoblastoma patogenezi ne ölçüde etkilediği konusunda ek çalışmalar yapılmalıdır. *CLEC7A* geni

TLR2 aracılı inflamatuvar tepki ve NF-kappa-B aktivasyonunda da gerekli olduğu bilinen bir gendir. Makrofaj ve dendritik hücrelerdeki sitokin üretimini arttırmalar. Manicassamy ve ark. 2009 yılında, TLR2 ve Dectin-1'in dendritik hücrelerde mikrobiyal bir uyarana olan zimosanı tanıdıklarını ve adaptif tepkileri uyardıklarını göstermişlerdir. TLR2 sinyalinin Raldh2 ve Il10 ekspresyonuna neden olduğunu ve vitamin A'yı metabolize ederek retinoik asite çevirdiğini belirtmişlerdir. Bu verilerin retinoik asitin sistemik indüksiyonu ve otoimmüniteye karşı bağışıklığın baskılanması için bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir [108]. Retinoik asit yolağında etkisi olduğu gösterilen bu genin retinoblastoma oluşumundan da sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda aynı aileye mensup R660 ve R663 nolu hastalarda *APOC3* geninde patojenik c.55C>T (p.Arg19Ter) değişikliği saptanmıştır. *APOC3* çok düşük yoğunluklu bir lipoproteindir. *APOC3*, lipoprotein lipaz ve hepatik lipazı inhibe eder ve trigliserid açısından zengin parçacıkların katabolizmasını geciktirdiği düşünülmektedir. *APOC3* düzeylerindeki artış, hipertrigliseridemi gelişimine neden olur. Hipertrigliseridemi, retinoik terapinin metabolik bir komplikasyonudur. Vu-Dac ve ark. 1998 yılında retinoidlerin Retinoid X Reseptörü (RXR) yoluyla *APOC3* ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde arttırdığını belirtmişlerdir [109]. Retinoidlerin karaciğerde *APOC3* ekspresyonunu, üretimini ve salgılanmasını arttırması, *APOC3*'ün bir retinoid tepki geni olabileceğini göstermektedir. Retinal yolak ile ilişkisi olduğu bilinen bu gendeki değişikliğin retinoblastoma ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, R660 nolu hastamızın unilateral retinoblastoma tanısı alması ve sonraki dönemlerde fibrosarkoma yakalanıp hayatını kaybetmiş olması; R663 hastamızın bilateral retinoblastoma tanısı almış olması ve yine aynı ailede 3 kuzende daha unilateral retinoblastoma ve 1 kuzende ise rabdomiyosarkom bulunması bu varyantın retinoblastoma hastalığı ile ilişkili olabileceği üzerinde ciddi şüpheler doğurmaktadır.

Çalışmamızda, yine aynı aileye mensup R660 ve R663 nolu hastalarda *MUTYH* geninde patojenik c.1171C>T (p.Gln391Ter) varyantına rastlanmıştır. *MUTYH* geni oksidatif DNA hasar tamirinde rol alan MYH glikosilaz adı verilen bir enzimin üretilmesinde görevlidir. Bu enzim, hücre bölünmesine hazırlık aşamasında DNA kopyalanırken (DNA replikasyonu) yapılan hataları düzeltir. Normal hücresel aktiviteler sırasında, guanin bazen oksijen tarafından değiştirilir ve sitozin yerine adenin ile

eşleşmesine neden olur. MYH glikosilaz bu hatayı düzelterek DNA'da mutasyon birikimini ve tümör oluşumunu engeller. Bu tip tamirat, baz eksizyon tamiri olarak bilinir. *MUTYH* genindeki mutasyonlar ailesel adenomatöz polipozis'in (MYH-ilişkili polipozis) otozomal resesif formu ile ilişkilidir [110]. Çalışmamızda, R660 ve R663 nolu hastalarımızda *MUTYH* geninde patojenik bir değişikliğe rastlanması aynı aileye mensup bu hastalarda ileri ki yıllarda MYH-ilişkili polipozis ve kolon kanseri görülme riski bulunduğu anlamı taşımaktadır. R660 nolu hastamızın unilateral retinoblastoma tanısı alması ve sonraki dönemlerde fibrosarkoma yakalanıp hayatını kaybetmiş olması; R663 nolu hastamızın bilateral retinoblastoma tanısı almış olması ve yine aynı ailede 3 kuzende daha unilateral retinoblastoma ve 1 kuzende ise rabdomiyosarkom bulunması bu varyantın retinoblastoma hastalığı ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunlara ek olarak STRING protein-protein analizine göre; *MUTYH* geni ile *RBI* geni anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur. Bu ilişki *CDK4* gen amplifikasyonu üzerine kuruludur. *CDK4*, Siklin D1 ile aktive edildiğinde retinoblastoma gen ürünü olan pRB proteinini fosforile ederek hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini sağlar. Hücre döngüsü düzenleyici yollarındaki bu değişiklik tümör oluşumunu tetiklemektedir ve birçok kanserde de bu mekanizma gösterilmiştir [111]. Zhang ve ark. *CDK4* proteininin aşırı ekspresyonunun kolon adenomlarında proliferen olan hücre sayısında önemli düzeyde artışa yol açtığını belirtmişlerdir [112]. Dolayısıyla kolon kanseri gelişimde rolü olduğu bilinen *MUTYH* geni ile de ilişkili olabileceği düşünülebilir. *MUTYH* geni ile *RBI* geni arasındaki bu ilişki, bulunan varyantın bu ailede retinoblastoma hastalığının oluşumundan sorumlu olabileceği hakkında şüpheler doğurmaktadır. Bu ilişkiyi netleştirebilmek için ailenin diğer retinoblastoma tanılı bireylerinde de bu patojenik varyant araştırılmalıdır. Bundan başka ailede retinoblastoma hastalığından başka juvenil kolon kanseri yatkınlığı da olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda aynı aileden R890 ve R893 nolu hastalarımızda *UGT1A1* geninde c.211G>A (p.Gly71Arg) patojenik varyantına rastlanmıştır. *UGT1A1*, UDP-glukuronosil transferazlar adı verilen enzimlerin üretilmesine yardım eden gen grubuna ait bir gendir. Bu enzimler, glukuronik asit bileşiğinin, bir dizi farklı maddeden birine bağlandığı glukuronidasyon adı verilen bir kimyasal reaksiyon gerçekleştirir [113]. Literatürlerde bu kimyasal reaksiyon ile 13-cis retinoik asit arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Rowbotham ve ark. 2010 yılında; 13-cis retinoik asit metabolizmasındaki

UDP-glukuronosiltransferazların rolünü araştırmışlardır. Retinoidler, embriyogenez, büyüme, farklılaşma, görme ve üreme dahil olmak üzere sayısız biyolojik işlemi düzenleyen retinol türevleri 'dir [114]. Retinoik asit, retinolün biyolojik olarak aktif türevidir ve all-trans retinoik asit (ATRA), 13-cis retinoik asit ve 9-cis retinoik asidi kapsayan çeşitli formlarda bulunur. Retinoidler, dermatolojide, kanserin önlenmesi ve kemoterapide yararlı birçok farmakolojik özellik gösterir [115]. Retinoidlerin en dramatik klinik faydası, Matthay ve ark. tarafından 2009 yılında; yüksek riskli nöroblastom tedavisinde 13-cis retinoik asit kullanımıyla ve Reynolds ve ark. tarafından 2001 yılında; akut promiyelositik lösemi tedavisi için ATRA kullanımı ile gösterilmiştir [116, 117]. Bugüne kadar insanlarda birçoğu çeşitli çevresel kanserojenler, beslenme kemopreventifleri ve antikanser ajanlar olmak üzere glukuronidasyonunu katalizleyen 21 fonksiyonel UGT izoformu tanımlanmıştır [118]. Çalışmamızda aynı aileden R890 ve R893 nolu hastalarımızda *UGT1A1* geninde c.211G>A (p.Gly71Arg) patojenik varyantına rastlanmış olması bu mutasyonun hastalarda retinoik asit metabolizmasını etkileyerek kanser gelişimini tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

R550, R660 ve R663 nolu hastalarımızda ***TYR*** geninde c.1205G>A (p.Arg402Gln) varyantı saptanmıştır. *TYR* geni, tirozinaz adı verilen bir enzimin üretilmesinde sorumludur. Bu enzim, melanin adı verilen pigment üreten özel hücreler olan melanositlerde bulunur. Melanin cilt, saç ve göz renklerini veren maddedir. Melanin, retina olarak bilinen gözün arka tarafındaki ışığa duyarlı dokuda bulunur. Tirozinaz melanin üretiminin ilk adımından sorumludur. Tirozin adı verilen amino asiti dopakuinon adı verilen başka bir bileşiğe dönüştürür. Ek kimyasal reaksiyonlar, dopakuinonu cilt, saç folikülü, iris ve retinada melanin haline dönüştürür. Bu gendeki mutasyonlar okülokutanöz albinizm ve nonpatolojik polimorfizmleri ise cilt pigmentasyon değişiklikleri ile ilişkilidir [119]. Yavuzer ve ark. 1995 yılında yapmış oldukları çalışmada; mikroftalmi gen ürününün pRB proteini ile etkileşime girdiğini ve melanosite özgü transkripsiyonun deregülasyonu için hedef olduğunu göstermişlerdir [120]. Melanin içeriğindeki farklılıklar p16 tarafından pRB proteininin kontrol edilmesi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, pRB proteininin *TYR* geninin ekspresyonunu kontrol eden mikroftalmi transkripsiyon faktörü (Mift) ile etkileşime girdiği gözlemiyle de açıklanabilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde; retinoblastoma ile ilişkisi olabileceği düşünülen *TYR* genindeki mutasyonun bu hastalarda saptanmış olması *TYR* geninin retinoblastomada aday bir gen olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda R550, R590, R660 ve R663 nolu hastalarımızda **NQOI** geninde c.559C>T (p.Pro187Ser) patojenik varyantına rastlanmıştır. **NQOI** geni NAD(P)H dehidrogenaz (kinon) ailesinin bir üyesidir ve sitoplazmik 2-elektron redüktazı kodlar. Bu FAD-bağlayıcı protein homodimerler oluşturur ve kinonları hidrokinonlara indirger. Bu proteinin enzimatik aktivitesi, radikaller üreten kinonların bir elektron indirgemelerini engeller. Bu yolla hücreleri oksidatif hasardan korur. Bu nedenle antikanser enzimi olarak adlandırılır. Karsinogenezdeki koruyucu rolüne ek olarak **NQOI** geni antitümör tedavide ilaç metabolize eden enzim görevi de görür. Bu gendeki mutasyonlar, tardif diskinezi (TD), benzen maruz kaldıktan sonra hematotoksisite riskinde artış ve çeşitli kanser türlerine yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir [121, 122]. Bu proteinin değişmiş ifadesi akciğer, mesane, meme, hepatoselüler karsinom, akut miyeloid lösemi (AML), kolorektal kanser, gastrointestinal kanserler gibi birçok tümörde görülmüştür ve ayrıca Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [123-125]. Chao ve ark. 2006 yılında **NQOI** genindeki c.559C>T (p.Pro187Ser) varyantının enzimatik aktiviteyi azaltarak akciğer kanser riskini arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu varyantın mesane ve kolorektal kanserine yatkınlığa da sebep olduğunu vurgulamışlardır [124]. Çalışmamızda da benzer şekilde R550, R590, R660 ve R663 nolu hastalarda saptanan c.559C>T (p.Pro187Ser) varyantının bu hastalarda akciğer, mesane ve kolorektal kanser riskini arttırabileceği düşünülmektedir. Valenzuela ve ark. 2014 yılında; AML'nin bir alt tipi olan akut promiyelositik lösemi (APL)'nin standart tedavisinde ATRA'nın kullanıldığını ve Nrf2 nükleer translokasyonu ile ATRA'nın antioksidan tepki oluşturduğunu ve böylece **NQOI** hedef geninin transkripsiyonunu arttırarak kanserin önlenmesine neden olduğunu göstermişlerdir [125]. Bu nedenle retinoik asit yolağına etki ettiği bilinen **NQOI** genindeki bu patojenik varyantın 2 farklı aileye mensup hastalarımızın dördünde de görülmesi retinoblastoma patogenezi ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

R663, R890 ve R893 nolu hastalarda **GBE1** geninde saptanan c.986A>G (p.Tyr329Cys) varyantı literatürde Glikojen Depolama Hastalığı IV ve Polyglukosan Vücut Hastalığı Erişkin Formu ile ilişkilendirilmiştir. **GBE1** geni, glikojen dallandırma enzimi (glycogen branching enzyme) üretiminden sorumlu olan bir gendir. Zincirlerin dallandırılması glikojen molekülünün çözünürlüğünü artırır ve sonuç olarak hücre içindeki ozmotik basıncı azaltır. Bu enzim karaciğer ve kasta yüksek düzeyde bulunur. Uruno ve ark. 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada; kastaki glikojen

metabolizmasında *GBE1* gen ekspresyonunun etkili olduğunu göstermişlerdir [126]. Glikojen metabolizması birçok kanser tipinde upregüle olmaktadır. Glikojen dallandırma enzimi ve glikojenin etkileşimi glikojen sentezini başlatmaktadır. Glikojenin ise kanserde iyi bir terapötik hedef olarak kullanılmaktadır [127]. Bu açıdan düşünüldüğünde; kanser mikroçevresinde anahtar rolü olduğu bilinen glikojen metabolizmasında etkili *GBE1* geni kanser terapisinde yeni bir hedef gen olabilir. Bu hipotezin desteklenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

R550, R590 ve R663 nolu hastalarımızda ***KRT85*** geninde c.233G>A (p.Arg78His) varyantına rastlanmıştır. Bu gen mutasyonları ektodermal displazi 4, saç / tırnak tipi ve saç hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde, insanlarda embriyogenez ve doku homeostazında rol aldığı bilinen retinoik asitin aşırı ekspresyonunun saç dökülmesi ile bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Okano ve ark. 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada; saç folikülü (hf) morfogenezisi için retinoik asit indirgeyici enzimlerden biri olan *Cyp26b1* tarafından regüle edilen belli düzeyde retinoik asitin gerekli olduğunu göstermişlerdir [128]. Sitokrom P450 ailesinin bir üyesi olan ve retinoik asiti degrade eden bir enzim olan *Cyp26b1*'in kanserdeki rolü üzerine yapılmış olan çalışmalar bulunmaktadır. Kipp ve ark. 2012 yılında; *Cyp26b1*'in artmış ekspresyonunun over kanser hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğunu ve azalmış ekspresyonunun ise büyümeyi baskıladığını belirtmişlerdir [129]. Brown ve ark. 2014 yılında; *Cyp26b1*'in kolorektal kanserinde aşırı eksprese olduğunu göstermişler [130]. Chen ve ark. 2011 yılında; oral skuamöz hücre karsinom patogeneğinde *Cyp26b1*'in aday bir rol oynadığını belirtmişlerdir [131]. Bu bağlamda düşünüldüğünde; *KRT85* gen mutasyonunun retinoik asit yolağı üzerinden hastalık gelişimini tetikleyebileceği söylenebilir. Bu konuda daha detaylı ek çalışmalar gerekmektedir.

Çalışmamızda R550, R660, R663, R890 ve R893 nolu hastalarımızda ***FGFR4*** geninde c.1162G>A (p.Gly388Arg) varyantı saptanmıştır. *FGFR4* geni, fibroblast büyüme faktör (FGF) ailesinin bir üyesidir. Fibroblast büyüme faktörleri için hücre yüzey reseptörü olarak davranır ve hücre proliferasyonu, farklılaşma, doku tamiri, invazyon, yağ metabolizmasının düzenlenmesi, safra asiti biyosentezi, glikoz alımı, D vitamini metabolizması ve fosfat dengesi gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır. Bange ve ark. 2002 yılında; *FGFR4* genindeki c.1162G>A (p.Gly388Arg) varyantının

ve *FGFR4* ekspresyonundaki artışın meme ve kolon kanser gelişimi ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca lenf nodu metastazı ve artmış TNM evresi ile istatistiksel olarak ilişkili olduğunu belirtmişler ve böylece kanser progresyonunu tetiklediğini göstermişlerdir [132]. Leung ve ark. 1994 yılında yapmış oldukları çalışmada; *FGFR4* ekspresyonunun pankreatik kanserler ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır [133]. Bange ve ark. 2002 yılında; kanser progresyonu ve tümör hücre motilitesinin *FGFR4* genindeki c.1162G>A (p.Gly388Arg) değişikliği ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [132]. Wang ve ark. 2004 yılındaki çalışmalarında; prostat kanserinin başlaması ve progresyonunda *FGFR4* genindeki bu varyantın etkili olduğunu belirtmişlerdir [134]. Brito ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada; *FGFR4* genindeki bu varyantın Cushing hastalığında marker olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir [135]. *FGFR4* geni onkogenik transformasyon aktivitesi ile de bilinen bir genidir. FGF19'a yanıt olarak safra asidi sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan CYP7A1'in ekspresyonunun downregülasyonu için gereklidir. Bazı fibroblast büyüme faktörünün, retinal fotoreseptör dejenerasyonuna karşı nöroprotektif etkiler gösterdiği bilinmektedir. Fotoreseptörlerde *FGFR4* ekspresyonu, spesifik bir ligand olan FGF-19'un faydalı olabileceğini düşündürmektedir. FGF-19 oküler dokunun gelişimi için önemli ve embriyonik retina tarafından eksprese edilen bir moleküldür. Bu nedenle literatürde FGF-19'un potansiyel rolünün araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Siffroi-Fernandez ve ark. 2008 yılında; FGF19'un memeli fotoreseptörlerinde nöroprotektif etkileri olduğunu vurgulamışlardır [136]. Fotoreseptör dejenerasyonu, sayısız çevresel ve genetik bozukluğa patolojik bir yanıt olarak ortaya çıkan ve ilerleyici görme kaybına ve körlüğe yol açan bir durumdur. Retinitis pigmentosa ve yaşla ilişkili maküler dejenerasyon (AMD) gibi kalıtsal retinal hastalıklar etkilenen kişiler için büyük sıkıntılar yaratır. Siffroi-Fernandez ve ark. FGF-19'un fotoreseptör tabakasına bitişik hücreler tarafından eksprese edildiğini ve saflaştırılmış erişkin fotoreseptör kültürlerinde FGF-19'un, *FGFR4*'ün doza ve zamana bağlı fosforilasyonunu indüklediğini, spesifik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu upregüle ettiğini ve sağkalımı arttırdığını görmüşler [136]. Bu nedenle retinal dejenerasyonun tedavisinde faydalı bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde; R550, R660, R663, R890 ve R893 nolu hastalarımızda kanser progresyonu ve retinal gelişimde rol aldığı bilinen *FGFR4* geninde ortak olarak görülen c.1162G>A (p.Gly388Arg) patojenik varyantının

retinoblastoma oluşumunu tetikleyen bir aday mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışma kapsamında değerlendirilen 6 hastanın 5'inde 4813 gen arasından ortak olarak görülen *FGFR4* geni retinoblastoma hastalığı için marker gen olabilir. Bu konuda daha geniş hasta gruplarında bu varyantın varlığı gelecekteki çalışmalarda araştırılacaktır.

R550 nolu hastada *C2* geninde c.954G>C (p.Glu318Asp) ve *CFB* geninde c.26T>A (p.Leu9His); R550, R590 ve R663 nolu hastalarda ise *CX3CR1* geninde c.935C>T (p.Thr312Met) varyantlarına rastlanmıştır. *C2* ve *CFB* genleri kompleman sisteminin klasik yolağının bir parçası olarak işlev gören serum glikoproteinleridir. *CFB* geninin poliadenilasyon bölgesi *C2* geninin 5' ucunun 421 bp uzağındadır. *CX3CR1* geni ise monosit homeostazı, makrofaj fenotipi ve fonksiyonu gibi inflamatuvar tepkilerin yürütülmesinde anahtar rol oynayan bir gendir. Zheng ve ark. 2013 yılında, *CX3CR1*'in anjiyogenik makrofaj sağkalımı ve tümör metastazı üzerine etkilerini araştırmışlar ve *CX3CR1*'in tümör mikroçevresinde tümör metastazına katkıda bulunan anjiyogenik makrofaj sağkalımında rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir [137]. Ayrıca literatürlerde *CX3CR1*'in koroner arter hastalıkları ve yaşla ilişkili maküler dejenerasyon ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir [138, 139]. *C2* ve *CFB* eksikliğinin bazı otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu ve bu genlerdeki SNP'lerin yine yaşla ilişkili maküler dejenerasyon gibi kalıtsal retinal hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. Gold ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada; *C2* geninde c.954G>C (p.Glu318Asp) ve *CFB* geninde c.26T>A (p.Leu9His) varyantlarının yaşla ilişkili maküler dejenerasyon ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu göstermişlerdir [140]. Literatürler yaşla ilişkili maküler dejenerasyon ve retinoik asit yolağı arasındaki ilişki açısından tarandığında; birkaç bağlantıya rastlanmıştır. Pavan ve ark. 2008 yılında; RPE (retinal pigment epiteli) hücrelerinin, altı retinoik asit reseptöründen yalnızca biri olan RAR-beta'yı ifade ettiğini göstermişlerdir [141]. Tavakolifar ve ark. 2015 yılında, retinoik asitin, yaşla ilişkili maküler dejenerasyonda yer alan major hücre tipi RPE hücrelerinde anti-anjiyogenik etki yaptığını vurgulamışlardır [142]. Tan ve ark. AMD hastalarında fazla retinoik asitin, lipofuscin parçacıklarının oluşumunu ve gelişimini hızlandırarak AMD'yi kötüleştirebileceğini belirtmişlerdir [143]. Bu nedenle, RAR-beta ekspresyonunun azalması nedeniyle retinoik aside direnç oluşturabilecek RPE hücrelerinin, AMD'nin gelişmesine ve ilerlemesine neden olduğunu söyleyebiliriz. Çalışma sonuçlarımız bu bağlamda değerlendirildiğinde; *C2*, *CFB* ve *CX3CR1*

genlerindeki patojenik varyantların AMD gelişimine retinoik asit yolağı üzerinden etki edebileceği düşünülebilir. Ayrıca retinoik asit yolağı ile bağlantılı olması nedeniyle bu varyantların retinoblastoma hastalığı ile de ilişkili olabileceği varsayılmaktadır. Bu anlamda daha geniş hasta gruplarında ek çalışmalar yapılmalıdır.

*ATP6V0A4* geninde c.1739T>C (p.Met580Thr) varyantına sadece R550 nolu hastamızda rastlanılmıştır. Kawamura ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada; *ATP6V0A4* geninin retinal pigment epitelinde aşırı eksprese olduğunu belirtmişlerdir. Retinal dokulardaki yüksek *ATP6V0A4* ekspresyonuna rağmen, insanlarda bu gendeki fonksiyon kaybından dolayı görme bozuklukları rapor edilen vakalar bulunmamaktadır [144]. Çalışmamızda da sadece tek vakada saptanan bu değişikliğin retinoblastoma hastalığı ile ne ölçüde ilişkili olabileceği konusunda net bilgi mevcut değildir. Bu açıdan ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yine R550 nolu hastamızda *HFE* geninde c.187C>G (p.His63Asp) varyantına rastlanılmıştır. Bu gende görülen mutasyonlar hemokromatoz hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Demirin aşırı birikimi olan hemokromatoz hastalığı demir metabolizmasının genetik bir bozukluğudur ve karaciğer, kolorektal, prostat, meme ve beyin tümörü ile ilişkilendirilmiştir [145-147]. Bu hastalıktan sorumlu iki mutasyon saptanmıştır. Lee ve ark. 2005 yılında; C282Y mutasyonunun meme kanseri ile bağlantılı olduğunu ve agresif hastalığın göstergesi olarak değerlendirilebileceğini; H63D mutasyonun ise malign gliomalarda daha sık görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca C282Y gen mutasyonu olan hücrelerde DNA tamir, invazyon ve metastaz ve apoptoz genleri, Jak-Stat yolak geni ve retinoik asit yolak geninin ekspresyonlarının düştüğünü de göstermişlerdir [148]. Demirin kanser gelişiminde nedensel bir faktör olarak muhtemel rolü uzun süre tartışılmıştır. Demiri potansiyel bir kanserojen yapan mantık, bu metalin Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikal oluşumunu katalize ederek oksidatif stres yaratma kabiliyetine dayanır. Demir katalizli oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna ve protein modifikasyonuna, DNA hasarına ve sonuçta mutasyonun teşvik edilmesine neden olur ve antioksidan savunmalarının tükenmesine yol açar. Ayrıca demir, kanser büyümesi için gerekli olan bir kofaktördür. Hücresel seviyede, hücresel demir metabolizmasının düzenlenmesi, kanserojen ifadeyle uyarılan malign fenotipe katkıda bulunur. Aynı zamanda, demir homeostazındaki değişiklikler, çok adımlı karsinogenez sırasında hücre içi demir birikimini aşamalı olarak belirler.

Bununla birlikte, demirin hücre döngüsü kontrolünde yer alan moleküllerin ekspresyonu üzerinde de karmaşık etkileri bulunmaktadır [149]. Demirin kanser oluşum sürecindeki tüm bu etkileri düşünüldüğünde; *HFE* geninde saptanmış olan c.187C>G (p.His63Asp) mutasyonu hastamızdaki retinoblastoma oluşumunu da tetiklemiş olabilir. Ayrıca bu hastamızın ileriki yıllarda karaciğer kanseri başta olmak üzere kolorektal, prostat, meme kanserleri ve beyin tümörüne yakalanma riski de bulunmaktadır.

R550 nolu hastamızda *RHAG* geninde c.808G>A (p.Val270Ile); *SLC34A1* geninde c.272\_292del21 (p.Val91\_Ala97del) varyantlarına rastlanmıştır. *RHAG* genindeki defektler Rh-eksiklik sendromu ile ilişkilidir. *SLC34A1* gen mutasyonları ise hipofosfatemi nefrolitiazisi / osteoporoz 1 hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. *SLC34A1* geni Npt2a denilen bir protein kodlar. Iwaki ve ark. 2007 yılında; Npt2a'nın fosfat dengesinin sağlanmasında önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca *SLC34A1* geninde görülen mutasyonların fosfat dengesinden sorumlu olduğu bilinen böbrekteki anormal patolojiye neden olduğunu da göstermişlerdir [150]. Masuda ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada; All-trans-retinoik-asit (ATRA)'ın renal proksimal tübüler hücrelerinde inorganik fosfat oranını arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca vitamin A eksikliğinin Npt2a gen ekspresyonunu downregüle ederek böbrekte hiperfosfatüri'ye neden olduğunu vurgulamışlardır [151]. *SLC34A1* geninin retinoik asit yolağı ile ilişkisi olduğu bilinse de bununla ilgili moleküler mekanizma henüz netleşmemiştir. *RHAG* geninin kanser gelişimi üzerine etkisi de henüz bilinmemektedir. Bu genlerin retinoblastoma oluşumu ile nasıl bir ilgisi olduğunun aydınlatılması için detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

R660 nolu hastada *DSPP* geninde saptanan c.202A>T (p.Arg68Trp) varyantı literatürde dentinogenesis imperfekta ve dentin displazisi ile ilişkilendirilmiştir. Zhang ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada; dentinogenesis imperfekta hastalığının osteogenesis imperfekta ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [152]. Osteogenesis imperfekta hastalığı kemiğin temel maddesini oluşturan bağ dokusundaki kalıtsal bir defekte bağlı gelişen bir hastalıktır. Tip I de dahil olmak üzere osteogenesis imperfekta'nın hafif formları çocuklukta ve ergenlikte genellikle küçük travmadan kaynaklanan kemik kırıkları ile karakterizedir. Kırıklar yetişkinlikte daha seyrek görülmektedir. Hastalığın hafif formlarına sahip olan kişilerde genellikle göz akı (sklera) mavi veya gri renk tonlarına sahiptir ve yetişkinlikte işitme kaybına neden

olabilir. R660 nolu hastamızda ikincil tümör olarak fibrosarkom görülmüş ve bu nedenle 12 yaşında hayatını kaybetmiştir. Tüm bu veriler ışığında çalışma sonucumuz değerlendirildiğinde; bir bağ doku hastalığı olan fibrosarkom ile *DSPP* geninde görülmüş olan bu mutasyonun ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu mutasyona sadece fibrosarkom görülen hastamızda rastlanması bu şüpheleri ciddi şekilde güçlendirmektedir.

R660 nolu hastamızda ***MBL2*** geninde c.161G>A (p.Gly54Asp) varyantına ve R590 hastamızda ise c.154C>T (p.Arg52Cys) varyantına rastlanılmıştır. *MBL2* geni mannoz bağlayan lektin olarak adlandırılan bir protein üretir. Bu protein patojenlere karşı immün sistem cevabında önemli rol oynamaktadır. Bu gende görülen mutasyonlar otoimmün yatkınlık ve infeksiyöz hastalıklarla ilişkilidir. Baccarelli ve ark. 2006 yılında; c.154C>T (p.Arg52Cys) varyantının gastrik kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [153]. Bernig ve ark. ise 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada; *MBL2* genindeki c.161G>A (p.Gly54Asp) ve c.154C>T (p.Arg52Cys) varyantlarının meme kanser riskini arttırdığını vurgulamışlar [154]. Bu veriler ışığında; çalışma kapsamında saptanmış olan bu varyantların hastalık oluşumunda etkili olabileceği düşünülebilir ve hastanın ileri ki yıllarda meme kanseri ve gastrik kanserlere yakalanma riski taşıyor olabileceğini düşündürmektedir.

R663 nolu hastamızda ***FUT6*** geninde saptanan c.739G>A (p.Glu247Lys) varyantı literatürde fukoziltransferaz-6 eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. Brinkman-Van der Linden ve ark. 1996 yılında; *FUT6* genindeki bu missense varyantın plazmadaki enzim aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir [155]. Hutchinson ve ark. yaptıkları çalışmada fukozil transferaz enzim aktivitesinin karaciğer kanserli hastalarda daha düşük düzeyde saptandığını göstermişlerdir [156]. Kanser tedavisi için yararlı olabilecek bu enzimatik aktivitesinin baskılanması *FUT6* geninin kanser metastazında rol oynadığını kanıtlamaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde; R663 nolu hastada saptanmış olan mutasyonun ileri ki yıllarda hastada metastaz gelişimine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Yine R663 nolu hastada ***GHRL*** geninde c.178C>A (p.Leu60Met) varyantı saptanmıştır. *GHRL* geni insanlarda obesite için aday gen olarak bilinmektedir. Obezite genlerin, davranışsal faktörlerin ve onların etkileşiminin kombine etkisi sonucu kaynaklanan kompleks bir fenotiptir. Enerji dengesini düzenleyen biyolojik faktörler

insanlarda görülen obezitede önemli etki yaratmaktadır. Tschop ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada; büyüme hormonu salgılayan peptit olan ghrelinin, büyüme hormon salgılanması ve enerji dengesindeki düzenleyici sistemlerle bağlantılı olduğunu göstermişler [157]. Ukkola ve ark. 2001 yılında yapmış oldukları çalışmada; GHRL lokusundaki genetik değişikliklerin morbid obezitenin genetik sebeplerinden biri olacağını vurgulamışlardır [158]. Bunların dışında *GHRL* geninin retinoblastoma patogenezi ile nasıl bir ilişkisi olduğu üzerine literatürde net bir bilgi yer almamaktadır. Bu ilişkinin aydınlatılması için birçok koldan ek çalışmalar yapılmalıdır.

R890 nolu hastada ***HBD*** geninde c.82G>T (p.Ala28Ser) varyantına rastlanmıştır. *HBD* genindeki mutasyonlar literatürde sadece beta-talasemi ile ilişkilendirilmiştir [159]. Yine R890 nolu hastamızda ***MCCC2*** geninde c.1015G>A (p.Val339Met) varyantına rastlanılmıştır. *MCCC2* geni, 3-metilkrotonoil-CoA karboksilaz veya 3-MCC olarak adlandırılan bir enzimin üretiminden sorumludur. 3-MCC enzimi, hücrelerdeki enerji üreten organel olan mitokondride bulunur. Bu enzim, diyetten elde edilen proteinlerin parçalanmasında ve enerji için kullanılmasında kritik bir rol oynamaktadır. *MCCC2* genindeki mutasyonlar 3-MCC eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. 3-MCC eksikliği, en sık organik asidüri olarak görülen lösin katabolizmasının otozomal resesif geçişli bir bozukluğudur [160]. Bu genlerin retinoblastoma hastalığı ile ilişkisi üzerine hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan yapılacak detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

R550 ve R660 nolu hastalarımızda ***RPGRIP1*** geninde c.1639G>T (p.Ala547Ser) varyantı saptanmıştır. *RPGRIP1*, retinada eksprese olan bir genidir. Retinitis pigmentosa GTPaz düzenleyici protein ile etkileşime girer ve koni ve çubuk fotoreseptör hücrelerinin önemli bir bileşeni olan bir fotoreseptör proteinini kodlar. Bu gendeki mutasyonlar otozomal resesif bir hastalık olan retinitis pigmentosaya yol açar. Retinitis pigmentosa retinadaki fotoreseptör hücrelerinde kırıklara ya da kayıplara yol açan genetik bir hastalıktır [161]. Retinoblastoma ise fotoreseptör hücrelerinde görülen bir tümördür. Literatürde retinitis pigmentosa ve kanser oluşumu arasında ilişki olduğu da gösterilmiştir. Winzelberg ve ark. 1980 yılında retinitis pigmentosa ve kolon kanseri arasındaki ilk ilişkiyi rapor etmişlerdir [162]. Bu açıdan değerlendirildiğinde; *RPGRIP1* geninde görülen mutasyon bu hastalarda retinoblastoma oluşumunu tetiklemiş olabilir.

R590 nolu hastamızda **SERPINA1** geninde c.1177C>T (p.Pro393Ser) varyantı saptanmıştır. *SERPINA1* geni, bir tür serin proteaz inhibitörü (serpin) olan alfa-1 antitripsin adı verilen proteininin üretiminden sorumludur. Serpinler, bazı enzimlerin aktivitesini bloke ederek çeşitli kimyasal reaksiyonun kontrolüne yardımcı olur. Alfa-1 antitripsin, sindirim enzimi tripsininin bağırsaklara ulaşana kadar proteinleri parçalamasını engeller. Alfa-1 antitripsin, enfeksiyona karşı savaşmak için beyaz kan hücrelerinden salınan nötrofil elastaz adı verilen güçlü bir enzim de dahil olmak üzere diğer enzimleri de bloke eder. Alfa-1 antitripsin, akciğerleri nötrofil elastazdan korur ve bu da düzgün kontrol edilmediğinde akciğer dokusuna zarar verebilir. Alfa-1 antitripsin karaciğerde üretilir ve daha sonra kandan akciğerlere taşınır [163]. Bu nedenle *SERPINA1* genindeki bozukluklar amfizem ve karaciğer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [164]. Yoon ve ark. 2002 yılında yapmış oldukları çalışmada; Alfa-1 antitripsinin kronik akciğer hastalık riskini artırdığını belirtmişlerdir [165]. Alfa-1 antitripsin ekspresyonunun akciğer, kolorektal ve gastrik karsinomada invazyon ve metastaz potansiyeli ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [166-168]. Ayrıca gastrik, tükürük bezi kanserleri ve malign melanomda yüksek düzeyde eksprese edildiği de bildirilmiştir [169, 170]. Chan ve ark. 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada; *SERPINA1* geninin östrojen reseptörü hedef geni olduğunu ve meme kanser hastalarında sağkalımın değerlendirilmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir [171]. *SERPINA1* geni ve kanser gelişimi arasındaki ilişki düşünüldüğünde retinoblastoma ile ilişkisi belirtilmiş olmamasına rağmen ek çalışmalarla araştırılması uygun olacaktır.

Tüm çalışma sonuçları değerlendirildiğinde; ailelere özel belirlenmiş genler ve hastalarda ortak olarak görülen genler oldukça dikkat çekmektedir. Özellikle FN096 ailesindeki *CLEC7A* geni; FN106 ailesindeki *APOC3* ve *MUTYH* genleri ve FN129 ailesindeki *UGT1A1* geni bu ailelere özel *RBI* dışında retinoblastoma oluşumunu tetikleyen aday genler olarak düşünülebilir. Bu hastaların aileleri en az 3 jenerasyon boyunca bu genlerin aktarımı açısından detaylı bir şekilde araştırılmalı ve bu mutasyonların hastalara kalıtsal mı yoksa de novo olarak mı aktarıldığı belirlenmelidir. Ayrıca 6 hastanın beşinde ortak olarak saptanmış olan *FGFR4* geni başta olmak üzere *ACADS*, *CX3CR1*, *GBE1*, *KRT85*, *NQO1* ve *TYR* genlerinin retinoblastoma etiyolojisi ve patogenezinde etkili aday genler olabilecekleri düşünülmektedir. Bu genlerin geniş hasta gruplarında detaylı bir şekilde çalışılması ve ailesel aktarımlarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmada dikkat çeken bir diğer gen ise ikinci tümör

olarak sadece fibrosarkoma sahip olan R660 nolu hastamızda görülen *DSPP* genidir. Bu gendeki mutasyonların retinoblastoma hastalarında özellikle sarkom şeklinde görülen ikincil tümörlerin oluşumundaki aday gen olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezin desteklenmesi için ikincil tümör saptanmış olan retinoblastoma hastalarında daha detaylı araştırma yapılması ya da fibrosarkoma sahip diğer hastaların incelenmesi gerekmektedir. *RB1* geni dışında retinoblastoma oluşumunu tetikleyen diğer genlerin araştırılmasını amaçlamış olduğumuz bu tez çalışmamızda; elde edilen sonuçlar retinoblastoma etiyolojisinde *RB1* geninden başka genlerin de varlığını göstermektedir. Literatürdeki bu konudaki eksiklikler düşünüldüğünde oldukça katkı sağlayacak bir çalışma olduğu düşünülmektedir. Bundan başka ilk bakışta; retinoblastoma oluşum sürecinde hiç bir etkisi gösterilmemiş ve birbiri ile alakasız gibi görülen gen mutasyonlarının aslında retinoik asit yolağı ile ilişkili olması, söz konusu genlerin retinoblastoma oluşumunda bilinen yolakların dışında bir gen yolağının etkili olduğuna dair ilk sonuçları doğurmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
2. *The Genetics of Cancer*. October 12, 2017; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>.
3. Sumarokov, A.B., et al., *[A case of primary diagnosis of patent ductus arteriosus at the age of 75 years]*. Ter Arkh, 2017. **89**(4): p. 86-90.
4. Pandey, A.N., *Retinoblastoma: An overview*. Saudi J Ophthalmol, 2014. **28**(4): p. 310-5.
5. Leal-Leal, C., et al., *A multicentre report from the Mexican Retinoblastoma Group*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(8): p. 1074-7.
6. Draper, G.J., et al., *Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling*. Br J Cancer, 1992. **66**(1): p. 211-9.
7. Abramson, D.H., et al., *Presenting signs of retinoblastoma*. J Pediatr, 1998. **132**(3 Pt 1): p. 505-8.
8. Chintagumpala, M., et al., *Retinoblastoma: review of current management*. Oncologist, 2007. **12**(10): p. 1237-46.
9. M. Tezer Kutluk, A.Y., *Turkish National Pediatric Cancer Registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society)*. Journal of Clinical Oncology 2013.
10. Jagadeesan, M., V. Khetan, and A. Mallipatna, *Genetic perspective of retinoblastoma: From present to future*. Indian J Ophthalmol, 2016. **64**(5): p. 332-6.
11. Wong, F.L., et al., *Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk*. JAMA, 1997. **278**(15): p. 1262-7.
12. Hospital, S.J.C.s.R. *Hereditary Retinoblastoma*. 2010 October 2010; Available from: <https://www.stjude.org/disease/hereditary-retinoblastoma.html>.
13. Ganguly, A. and C.L. Shields, *Differential gene expression profile of retinoblastoma compared to normal retina*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 1292-303.
14. Chakraborty, S., et al., *Identification of genes associated with tumorigenesis of retinoblastoma by microarray analysis*. Genomics, 2007. **90**(3): p. 344-53.
15. Indovina, P., et al., *Downregulation and aberrant promoter methylation of p16INK4A: a possible novel heritable susceptibility marker to retinoblastoma*. J Cell Physiol, 2010. **223**(1): p. 143-50.
16. Livide, G., et al., *Epigenetic and copy number variation analysis in retinoblastoma by MS-MLPA*. Pathol Oncol Res, 2012. **18**(3): p. 703-12.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
19. Tom Strachan, A.R., *Human Molecular Genetics*. 4th ed. 2011: Garland Science.
20. and C.N.E. Board. *The Genetics of Cancer*. 2012; Available from: <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/genetics/genetics-cancer>.

21. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al., *Section 8.1 Mutations: Types and Causes*, in *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman, Editor. 2000: New York.
22. Levine, A.J. and A.M. Puzio-Kuter, *The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes*. *Science*, 2010. **330**(6009): p. 1340-4.
23. Institute., N.C. *Childhood cancers. NCI FactSheet.* . 2017 August 24, 2017; Available from: [www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/childhood](http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/childhood).
24. Ries LAG, P.C., Bunin GR. , *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975–1995.* , ed. S.M. Ries LAG, Gurney JG, . 1999.
25. Tamara MacDonald, P., *Pediatric cancer: A comprehensive review. Part I: Biology, epidemiology, common tumours, principles of treatment and late effects*. *Can Pharm J*, 2010. **143**: p. 176-183.
26. Zhang, J., et al., *Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(24): p. 2336-2346.
27. Orjuela, M., et al., *Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(10): p. 4010-6.
28. Murphree AL, S.M., Harbour JW, Mansfield NC. , *Retinoblastoma*. 4th ed. *Retina*, ed. R. SJ. 2006, Philadelphia: Mosby Elsevier.
29. Lidegaard, O., A. Pinborg, and A.N. Andersen, *Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study*. *Hum Reprod*, 2005. **20**(4): p. 950-4.
30. Anand, B., et al., *Prevalence of high-risk human papillomavirus genotypes in retinoblastoma*. *Br J Ophthalmol*, 2011. **95**(7): p. 1014-8.
31. Espinoza, J.P., et al., *Loss of 10p material in a child with human papillomavirus-positive disseminated bilateral retinoblastoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005. **161**(2): p. 146-50.
32. Mohan, A., et al., *Detection of human papillomavirus DNA in retinoblastoma samples: a preliminary study*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009. **31**(1): p. 8-13.
33. Gillison, M.L., et al., *Human retinoblastoma is not caused by known pRb-inactivating human DNA tumor viruses*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(7): p. 1482-90.
34. 2015; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/childrens-cancer/eye-cancer-retinoblastoma/about>.
35. Winslow, T., *Eye Anatomy*, in *National Cancer Institute*. 2008.
36. *RB1 gene: Chromosomal Location*. 2017; Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/RB1#location>.
37. Dietmar R Lohmann, M.a.B.L.G., MD., *Retinoblastoma*, in *GeneReviews*, M.P.A. Roberta A Pagon, Holly H Ardinger, Stephanie E Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D Bird, Nikki Ledbetter, Heather C Mefford, Richard JH Smith, and Karen Stephens, Editor. 2015.
38. Knudsen, E.S. and J.Y. Wang, *Targeting the RB-pathway in cancer therapy*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(4): p. 1094-9.
39. Bajčiová, V., *Pediatric Oncology. Special Section. Rare Tumors. Retinoblastoma*. 2015.
40. Yun, J., et al., *Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma*. *Int J Ophthalmol*, 2011. **4**(1): p. 103-9.
41. Mateu, E., et al., *Genetics of retinoblastoma: a study*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. **95**(1): p. 40-50.

42. Reese, A.B. and R.M. Ellsworth, *The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy*. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol, 1963. **67**: p. 164-72.
43. Linn Murphree, A., *Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification*. Ophthalmol Clin North Am, 2005. **18**(1): p. 41-53, viii.
44. Balmer, A., L. Zografos, and F. Munier, *Diagnosis and current management of retinoblastoma*. Oncogene, 2006. **25**(38): p. 5341-9.
45. Murthy R, H.S., Naik MN, Reddy VA. Retinoblastoma. In:; e.M.o.N.D. Dutta LC, India: Jaypee, and B.p. 849859, *Retinoblastoma*. Modern ophthalmology, ed. D. LC. 2004, New Delhi, India: Jaypee Brothers.
46. Reese, A.B., et al., *The treatment of retinoblastoma by x-ray and triethylene melamine*. AMA Arch Ophthalmol, 1958. **60**(5): p. 897-906.
47. Stallard, H.B., *Irradiation of retinoblastoma (glioma retinae)*. Lancet, 1952. **1**(6717): p. 1046-9.
48. Fletcher, O., et al., *Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(5): p. 357-63.
49. Kleinerman, R.A., et al., *Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up*. J Clin Oncol, 2005. **23**(10): p. 2272-9.
50. Fabian, I.D., et al., *Focal laser treatment in addition to chemotherapy for retinoblastoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **6**: p. CD012366.
51. *Retinoblastoma Treatment*. 2017; Available from: <https://www.cancer.gov/types/retinoblastoma/hp/retinoblastoma-treatment-pdq>.
52. Şule Ari, M.A., *Plant Omics: Trends and Applications. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future*, H.T. K.R. Hakeem, G. Tombuloglu, Editor. 2016, Springer International Publishing. p. 109-135.
53. *TruSight Sequencing Panels*. [cited June 2017; Available from: [www.illumina.com/products/trusightpanels.html](http://www.illumina.com/products/trusightpanels.html)].
54. Behjati, S. and P.S. Tarpey, *What is next generation sequencing?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2013. **98**(6): p. 236-8.
55. *Human Gene Mutation Database (HGMD)*. [cited 2017; Available from: [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)].
56. *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* [cited June 2017.; Available from: [www.omim.org](http://www.omim.org)].
57. *GeneTests*. [cited 2017; Available from: [www.genetests.org](http://www.genetests.org)].
58. Bainbridge, M.N., et al., *Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals exons with higher variant densities*. Genome Biol, 2011. **12**(7): p. R68.
59. *TruSight One Series of Sequencing Panels Data Sheet*. 2017]; Available from: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_trusight\\_one\\_panel.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_one_panel.pdf).
60. *UCSC Genome Browser*. June 2017]; Available from: [genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/).
61. *Illumina. (2014) Optimizing coverage for targeted resequencing technical note*. June 2017].
62. *Illumina VariantStudio Data Analysis Software*. 17 March 2016; Available from: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_illumina\\_variantstudio\\_software.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_illumina_variantstudio_software.pdf).
63. *Illumina VariantStudio Data Analysis Software*. 2016.

64. McLaren, W., et al., *The Ensembl Variant Effect Predictor*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 122.
65. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database. 2017.
66. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
67. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
68. Forbes, S.A., et al., *COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D777-D783.
69. CLINVAR. 03-03-2017; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
70. dbSNP Short Genetic Variations. Feb 03, 2017; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
71. 1000 Genomes Project. July 12, 2017; Available from: <http://www.internationalgenome.org/>.
72. Exome Variant Server. 10,2017; Available from: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
73. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
74. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.
75. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D362-D368.
76. Soliman, S.E., et al., *Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma--An Update*. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2017. **6**(2): p. 197-207.
77. Dimaras, H., et al., *Retinoblastoma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15021.
78. Dimaras, H., et al., *Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(10): p. 1363-72.
79. Corson, T.W. and B.L. Gallie, *One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2007. **46**(7): p. 617-34.
80. Huang, J.C., et al., *Using expression profiling data to identify human microRNA targets*. Nat Methods, 2007. **4**(12): p. 1045-9.
81. Kooi, I.E., et al., *Somatic genomic alterations in retinoblastoma beyond RB1 are rare and limited to copy number changes*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25264.
82. Zhang, J., et al., *A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 329-34.
83. Temming, P., T.W. Corson, and D.R. Lohmann, *Retinoblastoma tumorigenesis: genetic and epigenetic changes walk hand in hand*. Future Oncol, 2012. **8**(5): p. 525-8.
84. Amendt, B.A., et al., *Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients*. J Clin Invest, 1987. **79**(5): p. 1303-9.

85. van Maldegem, B.T., R.J. Wanders, and F.A. Wijburg, *Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 507-11.
86. Lynne Wolfe, M., CRNP, BC, Reena Jethva, MD, Devin Oglesbee, PhD, and Jerry Vockley, MD, PhD., *Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency*, in *GeneReviews*, A.M. Pagon RA, Ardinger HH, et al., Editor. 2014.
87. Corydon, M.J., et al., *Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*. Pediatr Res, 1996. **39**(6): p. 1059-66.
88. Liu, D., et al., *Role of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in the biosynthesis of plasmalogens and nonether glycerolipids*. J Lipid Res, 2005. **46**(4): p. 727-35.
89. Rhinn, M. and P. Dolle, *Retinoic acid signalling during development*. Development, 2012. **139**(5): p. 843-58.
90. Kaschula, C.H., et al., *Acyl CoA:retinol acyltransferase (ARAT) activity is present in bovine retinal pigment epithelium*. Exp Eye Res, 2006. **82**(1): p. 111-21.
91. Cooper, D.A. and J.A. Olson, *Properties of liver retinyl ester hydrolase in young pigs*. Biochim Biophys Acta, 1986. **884**(2): p. 251-8.
92. Yen, C.L., et al., *A human skin multifunctional O-acyltransferase that catalyzes the synthesis of acylglycerols, waxes, and retinyl esters*. J Lipid Res, 2005. **46**(11): p. 2388-97.
93. Kiser, P.D., M. Golczak, and K. Palczewski, *Chemistry of the retinoid (visual) cycle*. Chem Rev, 2014. **114**(1): p. 194-232.
94. Travis, G.H., et al., *Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 469-512.
95. Tsybovsky, Y., R.S. Molday, and K. Palczewski, *The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease*. Adv Exp Med Biol, 2010. **703**: p. 105-25.
96. Pollock, N.L. and R. Callaghan, *The lipid translocase, ABCA4: seeing is believing*. FEBS J, 2011. **278**(18): p. 3204-14.
97. Saari, J.C., *Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles*. Annu Rev Nutr, 2012. **32**: p. 125-45.
98. Meyskens, F.L., Jr. and S.E. Salmon, *Inhibition of human melanoma colony formation by retinoids*. Cancer Res, 1979. **39**(10): p. 4055-7.
99. Hsu, S.L., H.M. Lin, and C.K. Chou, *Suppression of the tumorigenicity of human hepatoma hep3B cells by long-term retinoic acid treatment*. Cancer Lett, 1996. **99**(1): p. 79-85.
100. Siddikuzzaman and V.M. Grace, *Inhibition of metastatic lung cancer in C57BL/6 mice by liposome encapsulated all trans retinoic acid (ATRA)*. Int Immunopharmacol, 2012. **14**(4): p. 570-9.
101. Huber, P.R., et al., *Retinoic acid-binding protein in human breast cancer and dysplasia*. J Natl Cancer Inst, 1978. **61**(6): p. 1375-8.
102. Brandes, D., *Retinoic acid receptor and surface markers: models for the study of prostatic cancer cells*. Prog Clin Biol Res, 1981. **75B**: p. 207-28.
103. Chen, M.C., et al., *Retinoic acid and cancer treatment*. Biomedicine (Taipei), 2014. **4**: p. 22.

104. Pino-Lagos, K., M.J. Benson, and R.J. Noelle, *Retinoic acid in the immune system*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 170-87.
105. Goodridge, H.S., et al., *Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 471-5.
106. Klotz, S.A., et al., *Fungal and parasitic infections of the eye*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(4): p. 662-85.
107. Ferwerda, B., et al., *Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections*. N Engl J Med, 2009. **361**(18): p. 1760-7.
108. Manicassamy, S., et al., *Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity*. Nat Med, 2009. **15**(4): p. 401-9.
109. Vu-Dac, N., et al., *Retinoids increase human apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor. Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids*. J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 625-32.
110. Ali, M., et al., *Characterization of mutant MUTYH proteins associated with familial colorectal cancer*. Gastroenterology, 2008. **135**(2): p. 499-507.
111. An, H.X., et al., *Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 113-8.
112. Zhang, T., et al., *Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients*. Cancer Res, 1997. **57**(1): p. 169-75.
113. Gong, Q.H., et al., *Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(4): p. 357-68.
114. Evans, T.R. and S.B. Kaye, *Retinoids: present role and future potential*. Br J Cancer, 1999. **80**(1-2): p. 1-8.
115. Rowbotham, S.E., et al., *Role of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in 13-cis retinoic acid metabolism in humans*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(7): p. 1211-7.
116. Matthay, K.K., et al., *Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(7): p. 1007-13.
117. Reynolds, C.P. and R.S. Lemons, *Retinoid therapy of childhood cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2001. **15**(5): p. 867-910.
118. Nagar, S. and R.P. Remmel, *Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer*. Oncogene, 2006. **25**(11): p. 1659-72.
119. Opitz, S., et al., *Detection of 53 novel DNA variations within the tyrosinase gene and accumulation of mutations in 17 patients with albinism*. Hum Mutat, 2004. **23**(6): p. 630-1.
120. Yavuzer, U., et al., *The Microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein in vitro and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription*. Oncogene, 1995. **10**(1): p. 123-34.
121. Zai, C.C., et al., *Oxidative stress in tardive dyskinesia: genetic association study and meta-analysis of NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and Superoxide dismutase 2 (SOD2, MnSOD) genes*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010. **34**(1): p. 50-6.

122. Smith, M.T., *Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7624-6.
123. Chhetri, J., A.E. King, and N. Gueven, *Alzheimer's Disease and NQO1: Is there a Link?* Curr Alzheimer Res, 2017.
124. Chao, C., et al., *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser polymorphism and the risk of lung, bladder, and colorectal cancers: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(5): p. 979-87.
125. Valenzuela, M., et al., *Retinoic acid synergizes ATO-mediated cytotoxicity by precluding Nrf2 activity in AML cells*. Br J Cancer, 2014. **111**(5): p. 874-82.
126. Uruno, A., et al., *Nrf2-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Glycogen Metabolism*. Mol Cell Biol, 2016. **36**(11): p. 1655-72.
127. Zois, C.E. and A.L. Harris, *Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy*. J Mol Med (Berl), 2016. **94**(2): p. 137-54.
128. Okano, J., et al., *Cutaneous retinoic acid levels determine hair follicle development and downgrowth*. J Biol Chem, 2012. **287**(47): p. 39304-15.
129. Jingjing Kipp, M.D., Ann Golebiowski, Kelly Mayo and Brendan Butkut, *Roles of Cyp26b1 and Retinoic Acid in the Proliferation and Apoptosis of Normal Ovarian Granulosa Cells and Ovarian Cancer Cells*, in *he Endocrine Society's 94th Annual Meeting and Expo*. 2012: Houston.
130. Brown, G.T., et al., *The expression and prognostic significance of retinoic acid metabolising enzymes in colorectal cancer*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90776.
131. Chen, P.H., et al., *CYP26B1 is a novel candidate gene for betel quid-related oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2011. **47**(7): p. 594-600.
132. Bange, J., et al., *Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 840-7.
133. Leung, H.Y., W.J. Gullick, and N.R. Lemoine, *Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer*. Int J Cancer, 1994. **59**(5): p. 667-75.
134. Wang, J., D.W. Stockton, and M. Ittmann, *The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6169-78.
135. Brito, L.P., et al., *Influence of the fibroblast growth factor receptor 4 expression and the G388R functional polymorphism on Cushing's disease outcome*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(10): p. E271-9.
136. Siffroi-Fernandez, S., et al., *FGF19 exhibits neuroprotective effects on adult mammalian photoreceptors in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(4): p. 1696-704.
137. Zheng, J., et al., *Chemokine receptor CX3CR1 contributes to macrophage survival in tumor metastasis*. Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 141.
138. Matzhold, E.M., et al., *Association of polymorphisms in the chemokine receptor CX3CR1 gene with coronary artery disease*. Cytokine, 2009. **47**(3): p. 224-7.
139. Combadiere, C., et al., *CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2920-8.
140. Gold, B., et al., *Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 458-62.

141. Pavan, B., et al., *An RPE cell line as a useful in vitro model for studying retinoic acid receptor beta: expression and affinity*. Biosci Rep, 2008. **28**(6): p. 327-34.
142. Tavakolifar, S., et al., *Retinoic Acid Receptor Beta in Pathophysiology of Age-Related Macular Degeneration*. Iran J Public Health, 2015. **44**(11): p. 1570-1.
143. Tan, J.S., et al., *Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study*. Ophthalmology, 2008. **115**(2): p. 334-41.
144. Kawamura, N., et al., *Optic nerve compression and retinal degeneration in Tcirg1 mutant mice lacking the vacuolar-type H-ATPase  $\alpha 3$  subunit*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12086.
145. Robinson, J.P., et al., *Evidence for an association between compound heterozygosity for germ line mutations in the hemochromatosis (HFE) gene and increased risk of colorectal cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(6): p. 1460-3.
146. Syrjakoski, K., et al., *Hemochromatosis gene mutations among Finnish male breast and prostate cancer patients*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 518-20.
147. Shi, Z., et al., *Haemochromatosis HFE gene polymorphisms as potential modifiers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer risk and onset age*. Int J Cancer, 2009. **125**(1): p. 78-83.
148. Sang Y. Lee, B.S.-W., Jonas M. Sheehan and James R. Connor, *Role of HFE mutation in the brain tumors*, in *American Association for Cancer Research*. 2005, American Association for Cancer Research. p. 851.
149. Fargion, S., L. Valenti, and A.L. Fracanzani, *Hemochromatosis gene (HFE) mutations and cancer risk: expanding the clinical manifestations of hereditary iron overload*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1119-21.
150. Iwaki, T., et al., *A missense mutation in the sodium phosphate co-transporter Slc34a1 impairs phosphate homeostasis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(9): p. 1753-62.
151. Masuda, M., et al., *Regulation of renal sodium-dependent phosphate co-transporter genes (Npt2a and Npt2c) by all-trans-retinoic acid and its receptors*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 583-92.
152. Zhang, X., et al., *A novel DSPP mutation is associated with type II dentinogenesis imperfecta in a Chinese family*. BMC Med Genet, 2007. **8**: p. 52.
153. Baccarelli, A., et al., *Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk*. Int J Cancer, 2006. **119**(8): p. 1970-5.
154. Bernig, T., et al., *The mannose-binding lectin (MBL2) haplotype and breast cancer: an association study in African-American and Caucasian women*. Carcinogenesis, 2007. **28**(4): p. 828-36.
155. Brinkman-Van der Linden, E.C., et al., *A missense mutation in the FUT6 gene results in total absence of alpha3-fucosylation of human alpha1-acid glycoprotein*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14492-5.
156. Hutchinson, W.L., et al., *Fucosyltransferases: differential plasma and tissue alterations in hepatocellular carcinoma and cirrhosis*. Hepatology, 1991. **13**(4): p. 683-8.
157. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
158. Ukkola, O., et al., *Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3996-9.

159. Al Zadjali, S., et al., *First reported case of compound heterozygosity for HbA2-Yialousa (HBD: c.82 G>C) and HbA2-Wrens (HBD: c.295 G>A) in Oman*. Int J Hematol, 2013. **98**(2): p. 240-2.
160. Baumgartner, M.R., et al., *The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency*. J Clin Invest, 2001. **107**(4): p. 495-504.
161. Zhao, Y., et al., *The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3965-70.
162. Winzelberg, G.G., R. Greenstein, and J.T. Ferrucci, Jr., *Retinitis pigmentosa and colon cancer: a previously unreported association*. Cancer, 1980. **45**(11): p. 2897-8.
163. Law, R.H., et al., *An overview of the serpin superfamily*. Genome Biol, 2006. **7**(5): p. 216.
164. Carrell, R.W. and D.A. Lomas, *Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases*. N Engl J Med, 2002. **346**(1): p. 45-53.
165. Yoon, D., et al., *Role of alpha-1-antichymotrypsin deficiency in promoting cirrhosis in two siblings with heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency phenotype SZ*. Gut, 2002. **50**(5): p. 730-2.
166. Higashiyama, M., et al., *An evaluation of the prognostic significance of alpha-1-antitrypsin expression in adenocarcinomas of the lung: an immunohistochemical analysis*. Br J Cancer, 1992. **65**(2): p. 300-2.
167. Karashima, S., et al., *Prognostic significance of alpha-1-antitrypsin in early stage of colorectal carcinomas*. Int J Cancer, 1990. **45**(2): p. 244-50.
168. Allgayer, H., et al., *Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(1): p. 62-73.
169. Wang, Y., et al., *Alpha 1 antichymotrypsin is aberrantly expressed during melanoma progression and predicts poor survival for patients with metastatic melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(4): p. 575-8.
170. Chomette, G., et al., *An immunohistochemical study of the distribution of lysozyme, lactoferrin, alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin in salivary adenoid cystic carcinoma*. Pathol Res Pract, 1991. **187**(8): p. 1001-8.
171. Chan, H.J., et al., *SERPINA1 is a direct estrogen receptor target gene and a predictor of survival in breast cancer patients*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 25815-27.

## ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 453

Tarih : 30.03.2016

Konu : Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK

Sayın Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK  
Onkoloji Enstitüsü

İlgili : Onkoloji Enstitüsünün 15/02/2016 gün ve 57963 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Araş. Gör. Demet Akdeniz ÖDEMİŞ'in yürüteceği 2016/360 dosya numaralı "Hereditör Retinoblastoma Oluşumunda Rol Oynayan Diğer Genlerin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 25/03/2016 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yazıcı ÖRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

|                       |                                                                                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | "Hereditör Retinoblastoma Oluşumunda Rol Oynayan Diğer Genlerin Araştırılması" |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|

| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER       | Belge Adı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Tarihi                              | Versiyon Numarası | Dili                                                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/> |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/> |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                | OLGU RAPOR FORMU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <input type="checkbox"/>            |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>            |
|                                | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input type="checkbox"/>            |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>            |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | Belge Adı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                     | Açıklama          |                                                                                                              |
|                                | TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | SİGORTA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input checked="" type="checkbox"/> |                   |                                                                                                              |
|                                | BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | İLAN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | YILLIK BİLDİRİM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | SONUÇ RAPORU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
|                                | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/>            |                   |                                                                                                              |
| KARAR BELGELERİ                | Karar No:06                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Tarih: 25/03/2016                   |                   |                                                                                                              |
|                                | İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde görevli Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK* in sorumluluğunda ve Araş. Gör. Demet Akdemir ÖDEMİŞ* in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel salınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. |                                     |                   |                                                                                                              |

| İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU |                                   |                                                                                                      |                                                                  |                                                                  |                                                                  |      |  |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------|--|
| ÇALIŞMA ESASI                                           |                                   | 19.08.2011 tarihli, 28630 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik |                                                                  |                                                                  |                                                                  |      |  |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:                         |                                   | Prof. Dr. A. Yağuz ÜRESİN                                                                            |                                                                  |                                                                  |                                                                  |      |  |
| Unvanı/Adı/Soyadı                                       | Uzmanlık Alanı                    | Kurumu                                                                                               | Cinsiyet                                                         | Araştırma ile ilişkisi *                                         | Katılım **                                                       | İmza |  |
| Prof. Dr. A. Yağuz ÜRESİN                               | Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji | İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)                                                          | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |  |
| Prof. Dr. Berrin UMMAN                                  | Kardiyoloji                       | İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)                                                | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |  |
| Prof. Dr. Ahmet GÜL                                     | Romatoloji                        | İstanbul Tıp Fakültesi                                                                               | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |  |
| Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN                                 | Nöroloji                          | İstanbul Tıp Fakültesi                                                                               | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |  |
| Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ                                   | Biyostatistik                     | İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyostatistik                                                            | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |  |

- \* -Araştırma ile ilgili  
 \*\* -Toplantıda Bulunma

İ.E. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamındaki kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

|                             |                  |                                                                                      |
|-----------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b> | ETİK KURULUN ADI | <b>İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ<br/>KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU</b>                   |
|                             | AÇIK ADRESİ:     | <b>İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET<br/>KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL</b> |
|                             | TELEFON          | <b>0 (212) 414 21 53</b>                                                             |
|                             | FAKS             | <b>0 (212) 414 21 53</b>                                                             |
|                             | E-POSTA          | <b>itfetikkurul@istanbul.edu.tr.</b>                                                 |

|                          |                                                     |                                                                                       |                                          |                                               |                                          |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b> | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                               | <b>“Hereditör Retinoblastoma Oluşumunda Rol Oynayan Diğer Genlerin Araştırılması”</b> |                                          |                                               |                                          |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                             | ---                                                                                   |                                          |                                               |                                          |
|                          | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI   | <b>Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK</b>                                                   |                                          |                                               |                                          |
|                          | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI   | <b>Kanser Genetiği</b>                                                                |                                          |                                               |                                          |
|                          | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | <b>İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü</b>                                       |                                          |                                               |                                          |
|                          | DESTEKLEYİCİ                                        | <b>İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi</b>                             |                                          |                                               |                                          |
|                          | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ                    | ---                                                                                   |                                          |                                               |                                          |
|                          | ARAŞTIRMANIN FAZİ                                   | FAZ 1                                                                                 | <input type="checkbox"/>                 |                                               |                                          |
|                          |                                                     | FAZ 2                                                                                 | <input type="checkbox"/>                 |                                               |                                          |
|                          |                                                     | FAZ 3                                                                                 | <input type="checkbox"/>                 |                                               |                                          |
|                          |                                                     | FAZ 4                                                                                 | <input type="checkbox"/>                 |                                               |                                          |
|                          | ARAŞTIRMANIN TÜRÜ                                   | Yeni Bir Endikasyon                                                                   | <input type="checkbox"/>                 |                                               |                                          |
|                          |                                                     | Yüksek Doz Araştırması                                                                | <input type="checkbox"/>                 |                                               |                                          |
|                          |                                                     | Diğer ise belirtiniz :                                                                |                                          |                                               |                                          |
|                          | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                       | TEK MERKEZ<br><input checked="" type="checkbox"/>                                     | ÇOK MERKEZLİ<br><input type="checkbox"/> | ULUSAL<br><input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI<br><input type="checkbox"/> |

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HEREDİTER RETİNOBLASTOMA OLUŞUMUNDA ROL  
OYNAYAN DİĞER GENLERİN ARAŞTIRILMASI

## ORJİNALLİK RAPORU

%2

BENZERLİK ENDEKSİ

%2

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%1

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%1

2

biotek.ankara.edu.tr

İnternet Kaynağı

&lt;%1

3

www.onkder.org

İnternet Kaynağı

&lt;%1

4

medya.nigde.edu.tr

İnternet Kaynağı

&lt;%1

5

Submitted to Trakya University

Öğrenci Ödevi

&lt;%1

6

polen.itu.edu.tr

İnternet Kaynağı

&lt;%1

7

issuu.com

İnternet Kaynağı

&lt;%1

8

acikerisim.pau.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

&lt;%1