

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 OLGULARINDA
DNA TAMİR GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN
KLİNİK ÖNEMİ**

DUYGU DURSUN

TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR- 2013

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970109

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 OLGULARINDA
DNA TAMİR GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN
KLİNİK ÖNEMİ**

TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ
DUYGU DURSUN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. NUR OLGUN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Daire Başkanlığı tarafından
“2012 KB SAG 019” numaralı proje olarak ve Türk Pediatri Onkoloji Grubu (TPOG)
Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında desteklenmiştir.

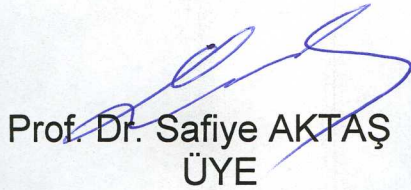
TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970109

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi **Duygu DURSUN**; "NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 OLGULARINDA DNA TAMİR GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN KLİNİK ÖNEMİ" konulu Yüksek Lisans Tezini 15.01.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

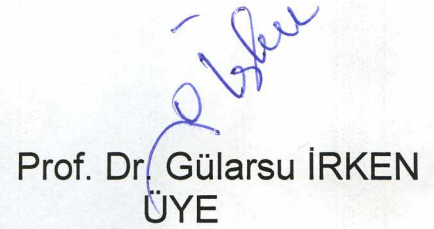


Prof.Dr. Nur OLGUN

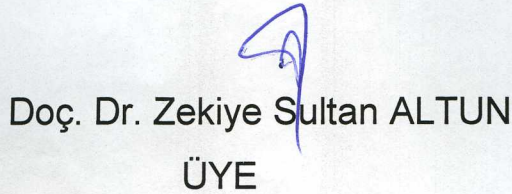
BAŞKAN



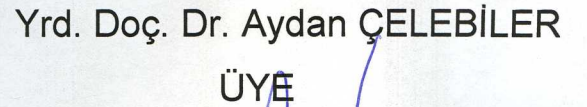
Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
ÜYE



Prof. Dr. Gülersu İRKEN
ÜYE

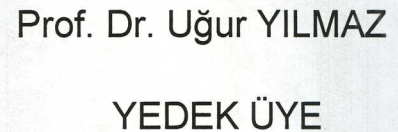


Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Aydan CELEBİLER
ÜYE

Doç. Dr. Yasemin BASKIN
YEDEK ÜYE



Prof. Dr. Uğur YILMAZ
YEDEK ÜYE

ÖN BÖLÜM	i
İçindekiler.....	i
Tablo Dizini.....	iii
Resim Dizini.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	i
ANA BÖLÜM	1
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.0 GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.0 GENEL BİLGİLER	6
2.1. Nörofibromatozis Tip 1.....	6
2.1.1. Nörofibromatozis Tip 1 'in Tarihsel süreci.....	6
2.1.2. Nörofibromatozis Tip 1'in klinik bulguları ve tanı.....	7
2.1.2.1.Café-au Lait lekeleri.....	7
2.1.2.2.Nörofibrom ve Pleksiform Nörofibromlar.....	8
2.1.2.3.Aksiller, inguinal çillenme.....	8
2.1.2.4.Optik gliomlar.....	8
2.1.2.5. Lisch Nodülleri.....	9
2.1.2.6. İskelet Displazisi Bulguları.....	9
2.1.2.7.Diğer klinik Bulguları.....	9
2.1.3. Nörofibromatozis tip 1'in Genetik Özellikleri.....	10
2.1.3.1.Nörofibromatozis Tip 1 geninin yapısı.....	10
2.1.3.2.Nörofibromatozis Tip 1 geninin proteini.....	10

2.2. DNA Tamir Genleri.....	11
2.2.1. DNA tamir mekanizmaları.....	19
2.2.1.1. DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesi.....	19
2.2.1.2. Kesip çıkararak (ekzizyon) onarım.....	19
2.2.1.2.1. Baz çıkarma.....	20
2.2.1.2.2. Nükleotid çıkarma.....	20
2.2.1.2.3. Hatalı eşleşme onarım.....	21
2.3. Nörofibromatozis Tip 1 de DNA tamir genlerinin önemi.....	22
3.0 GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
3.1. Araştırmanın Tipi.....	24
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	24
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları.....	24
3.4. Çalışma Materyali.....	25
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	25
3.6. Veri Toplama Araçları.....	26
3.6.1. Cihazlar, Sarf malzemeler ve Gereçler, Kitler ve Reaktifler.....	26
3.6.1.1. Cihazlar.....	26
3.6.1.2. Sarf Malzemeler ve Gereçler.....	27
3.6.1.3. Kitler ve reaktifler.....	28
3.6.2. Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu.....	29
3.6.2.1. Genel ilke.....	29
3.6.2.2. Uygulama basamakları.....	29
3.6.3. RNA izolasyonu ve ölçümü.....	31
3.6.3.1. Genel ilke.....	31
3.6.3.2. Uygulama basamakları.....	31
3.6.4. cDNA sentezi.....	35
3.6.4.1. Genel ilke.....	35
3.6.4.2. Uygulama basamakları.....	35
3.6.5. RT-PCR array analizi.....	37
3.6.5.1. Genel ilke.....	37
3.6.5.2. Uygulama basamakları.....	38

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	40
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	41
3.9. Araştırmaların Sınırlılıkları.....	41
3.10. Etik Kurul Onayı.....	41
4.0 BULGULAR.....	42
5.0 TARTIŞMA	59
6.0 SONUÇLAR.....	62
SON BÖLÜM.....	63
7.0. KAYNAKLAR.....	63
8.0 EKLER.....	76
8.1. Etik Kurul Raporu.....	76
8.2. Özgeçmiş.....	77
8.3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	82

TABLO DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 1	İnsan DNA onarım genleri.....	12
Tablo 2	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	26
Tablo 3	Çalışmada kullanılan kitler ve reaktifler.....	28
Tablo 4	cDNA master mix hazırlama protokolü.....	37

RESİM DİZİNİ

Resim No		Sayfa No
Resim 1	NF1 hastalarında nörofibromlu olanların nörofibromsuz olanlara göre <i>cluster gram</i> karşılaştırılması.....	42
Resim 2	Nörofibrom varlığında ekspresyonu değişen genler.....	43

Resim 3	Nörofibrom varlığında ekspresyonu azalan genler.....	44
Resim 4	Nörofibromları olan hastalar ile kontrol grubunun <i>heat map analizi</i>	45
Resim 5	Nörofibromları olmayan NF1 hastaları ile kontrol grubunun <i>heat map analizi</i>	46
Resim 6	Nörofibromlu hastalar ile nörofibromsuz hastaların <i>heat map analizi</i> ...	47
Resim 7	Ailesel NF1 hastaları ile ailede NF1 hastası olmayan grupların karşılaştırılması.....	48
Resim 8	DDB2, MLH3, RFC1, XPA genlerinin kontrol grubuna göre iki grupta da artışı.....	49
Resim 9	Hamartomatöz lezyon olmayan hastalar ile kontrol grubunun <i>heat map analizi</i>	50
Resim 10	Hamartomatöz lezyonlu hastalar ile kontrol grubunun <i>heat map analizi</i> ..	51
Resim 11	Hamartomatöz lezyonlu hastalar ile hamartomatöz lezyon olmayan hastaların <i>heat map analizi</i>	52
Resim 12	NF1 olan ve olmayan tüm olguların <i>clustergram analizi</i>	53
Resim 13	<i>Fold change</i> e göre anlamlı çıkan genler ile NF1 hastaları ve kontrol grubunun <i>cluster gram analizi</i>	54
Resim 14	NF1 olan ve olmayan tüm olguların <i>clustergram analizi</i>	55
Resim 15	11 alt grupta yapılan <i>clustergram analizi</i>	57

KISALTMALAR:

AP: Apürinik ya da apirimidinik bölge

BER: Baz ekzisyon onarım

CLS: Cafe-au-lait lekeleri

CMMR-D: Yapısal mismatch tamir eksiklik sendromu

DNA-PK: DNA bağımlı protein kinaz

EMSA: Elektroforetik hareketlilik sapma denemeleri
GAIT: Translasyonun IFN-gama active inhibitörü
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
NER: Nükleotit ekzisyon onarım
NF1: Nörofibromatozis Tip 1
NF2: Nörofibromatozis Tip 2
MMR: Mismatch tamir genleri
PBMC: Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu
POLD1NER: Polimeraz delta nükleotit ekzisyon onarımı
TFIIH: Bazal transkripsiyon faktör 2
SET: Endoplazmik retikulum ilişkili kompleks

TEŞEKKÜR

DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı içerisinde tez çalışmamın planlanması, yürütölmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında ilgi, destek ve bilimsel katkılarından dolayı; Prof. Dr. Nur Olgun'a, Prof. Dr. Safiye Aktaş'a, Doç. Dr. Zekiye Sultan Altun'a, MSc.Pınar Erçetin ile tüm Onkoloji Enstitüsü çalışanlarına ve çalışmalarımın her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen annem Zihnifer Dursun'a, babam Erol Dursun'a ve kız kardeşim Gözde Dursun'a teşekkür ederim.

Duygu DURSUN

Aralık, 2012

ÖZET

Nörofibromatozis Tip 1 Olgularında DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonunun Klinik Önemi

Duygu Dursun

DEÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Bölümü

Yazışma Adresi: Eğitim Mah. / Ekrem Güer Sok. / No:42/5 / Murat Öz Apartmanı
Balçova/İZMİR

AMAÇ: Nörofibromatozis Tip 1 (NF1), çeşitli fenotiplere sahip, sık görülen otozomal dominant genetik bir hastalıktır. NF1 hastalarının klinik çeşitliliğinin genetik nedeni sorgulanmaktadır. DNA onarım genleri DNA' daki hataların onarımından sorumludur. Biz DNA onarım genlerinin ekspresyonunu ve onların NF1 hastalarındaki klinik önemini nörofibrom, hamartomatöz lezyon, diğer tümörler ya da ailesel NF1 varlığı ile karşılaştırarak analiz etmeyi amaçladık. Bu çalışmanın diğer amacı gen ekspresyonları ile klinik bulgular arasında ilişki olup olmadığını belirlemektir.

METOD: NF1' li hastalar ve NF1 ile birlikte malignitesi olan hastalar çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak da benzer yaş grubundaki herhangi bir hastalığı olmayan çocuklar ve NF1 ile ilgisi olmayan maligniteli olgular oluşturdu. Çalışma toplam 46 olgu içermekteydi: 36 NF1 hastası (30 çocuk; 6 ebeveyn), hiç bir hastalığı olmayan 8 kontrol olgusu, rabdomiyosarkomlu NF1 olmayan 2 kontrol olgusuydu. 8 kontrol olgusunun yaş ortalaması $17\pm 7,03$ (10-30 yaş) (ortanca 13 yaş) idi. NF1 olgularının 17' si kadın 19' u erkekti. NF1' li olgularımız için tanı anındaki yaş ortalaması $10,08\pm 8,86$ (9 ay- 38 yaş) (ortanca 8 yaş) iken hastalarımızın çalışmaya alınan ebeveynlerinin yaş ortalaması $40,50\pm 1,22$ (39-42 yaş) (ortanca 40 yaş) idi. 36 hastanın, 17' si nörofibromlu, 17' si hamartomatöz lezyonluydu. 1 hastada rabdomiyosarkom gözlenmiş, 1 hasta meme kanseri ve 4 hasta da optik gliomluydu. Her bir hasta ve kontrol grubundan periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu ve cDNA dönüşümünden sonra, her bir olguda Real-Time PCR ile DNA onarımı ile ilişkili 84 genin ekspresyonu (standart array, SABiosciences)

belirlendi. Ekspresyonların kontrol grubuna göre kat değışiklikleri ve T test ile p değeri karşılaştırmalı gruplarda değerlendirildi.

BULGULAR: Araştırma grubunu 36 NF1 hastası, kontrol grubunu ise 8 sağlam çocuk ve 2 adet de NF1 ile ilişkisi olmayan maligniteli olgu (rabdomiyosarkom) oluşturmaktadır. NF1 olgularında, PNKP, RAD18, XAB2, XRCC3, XRCC4 ve XRCC5 genlerinin ekspresyonu kontrol grup ile karşılaştırıldığında azaldı ($p < 0.05$, T test). Nörofibromlu NF 1 olgularında, nörofibromsuz NF 1 olgularıyla karşılaştırıldığında POLB ekspresyonu artarken; ERCC3, LIG1, MGMT, MRE11A, MPG, MSH6, PARP2, PRKDC, RAD51B, RAD52, RPA3, SMUG1, TREX1, UNG ekspresyonu azaldı. RAD18 ailesel NF 1 varlığında ekspresyonu azalmış ve istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı. Malign tümör olgularında NF 1'li ya da NF 1'siz gruplar karşılaştırıldığında gen ekspresyonunda kat değışiklikleri vardı. DDB2, MGMT, MLH1, POLB UNG, XPA ekspresyonları arttı. NF 1'li RMS olgusu ile NF 1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG, XPA olmak üzere 6 genin ekspresyonu 10 kattan fazla arttı.

SONUÇ: Bulgularımız NF 1 olgularındaki klinik bulguları öngörmek için DNA onarım sistemi ilişkili gen ekspresyon değışikliklerinin rolü olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nörofibromatozis Tip 1, DNA onarım genleri, klinik ilişki

ABSTRACT

Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type 1 Cases

Duygu Dursun

DEU, Institute of Health Sciences, Oncology Institute, Fundamental Oncology
Departure

Corresponding Adress: Egitim Quarter/ Ekrem Guer street No:42/5

Murat Oz Apartment Balcova IZMIR/ TURKEY

OBJECTIVE: Neurofibromatosis Type 1 (NF1) is a a common autosomal dominant genetic disorder that has a variable phenotype. The genetical causes of clinical variability of NF1 patients is questioned. DNA repair genes are responsible for proofreading the missing in the DNA. We aimed to analyze expression of DNA repair genes and their clinical significance in NF1 patients; comparing exsistance of neurofibroma or hamartomatous lesions or other tumours or exsistance of NF1 in the family. The other aim of this study was to determine whether any relationship between gene expressions and clinical findings.

METHOD: NF1 patients and malignancy with NF1 pateints were included and in this study. In the control grup children that they are in the similar age group and they have no disease and no malignacy group were included. This study included total 46 cases. 36 NF1 patients (30 children; 6 parents), 8 control cases without any disease, two control cases with rhabdomyosarcoma without NF1 were included in this study. The mean age of control group was $17\pm 7,03$ (10-30 age) (median 13 age). In the NF1 pateints grup 17 of them are female, and 19 are male. The mean age at diagnosis is $10,08\pm 8,86$ (9 months- 38 age)(median age 8) for children and $40,50\pm 1,22$ (39-42 age) (median age 40) for parents. Among 36 patients, 17 had neurofibromas, 17 had hamartomatous lesions. Rhabdomyosarcoma (RMS) was observed in one patient, breast cancer in one patient and four patients suffered optic

glioma. Peripheral blood was obtained from each cases and mononuclear cells were separated. After RNA isolation and cDNA converting, expressions of 84 genes related with DNA Repair in standard array (SABiosciences) were determined by Real-Time PCR for each case. Fold changes and p values compared with control groups and fold changes evaluated with T test and p value in the comparative groups.

RESULTS: 36 NF1 patients, 8 healthy children as a control and 2 cases no NF1 relationship with malignancy (rhabdomyosarcoma) were included in the study group. In NF1 cases PNKP, RAD18, XAB2, XRCC3, XRCC4 and XRCC5 genes were downregulated compared with control group. In NF1 cases having neurofibromas, POLB was overexpressed; while ERCC3, LIG1, MGMT, MRE11A, MPG, MSH6, PARP2, PRKDC, RAD51B, RAD52, RPA3, SMUG1, TREX1, UNG were downregulated compared with the NF1 cases without neurofibromas ($p < 0.05$, T test). RAD18 is the downregulated and statistical significant gene for existence of NF1 in the family. There are gene expression fold change differences determined when malign tumor cases with/without NF1 were compared. DDB2, MGMT, MLH1, POLB UNG, XPA are increased.

CONCLUSION: Our results may point toward a role of gene expression changes of DNA repair system to be predictive for clinical manifestations in NF1 cases.

KEY WORDS: neurofibromatosis type 1, DNA repair genes, clinical relationship

1.0. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörofibromatozis Tip 1 (NF1), çeşitli fenotiplere sahip, sık görülen otozomal dominant genetik bir hastalıktır. Nörofibromatozis aslında iki ayrı hastalıktır ve her biri farklı gen bozukluğu sonucunda oluşur. NF tip 1 (NF1) von Recklinghausen hastalığı olarak bilinir. Toplumda en sık rastlanan nörokutanoz sendromdur ve 17. kromozomda meydana gelen bir mutasyonla oluşur. NF tip 2 (NF2) 22. kromozomda meydana gelen mutasyonla oluşur.

NF1 olgularında nörofibromların yanı sıra lösemi, yumuşak doku tümörleri, beyin tümörleri, nöroblastom gibi malign tümörler de gelişebilmektedir. Kanserin oluşmasında en önemli nedenlerden biri de DNA' da meydana gelmiş olan hatanın düzeltilememesidir. Bu durum DNA tamir genlerinin doğru çalışmamasından kaynaklanır.

Bu çalışmada; NF1 hastalarının klinik çeşitliliğinin genetik nedeni sorgulanması amaçlandı. Bu nedenle de farklı alt gruplar oluşturularak, gen ekspresyonlarında ki benzer artış ve azalışlar analiz ederek klinik bulgularla ilişkisi değerlendirildi.

2.0. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖROFİBROMATOZİS TİP 1

Nörofibromatozis Tip 1 (NF1); toplumda görülme sıklığı 1/4000 oranına sahip olan, otozomal dominant kalıtılan, (olguların %50' si ailesel olmakla birlikte diğer % 50' lik kısmın yeni mutasyonlar sonucu ortaya çıkabilen) bir nörokutanöz sendromdur. Toplumda sıklıkla karşılaşılan bu antitede klinikte belirtiler çocukluk çağında ortaya çıkmakta ve klinik bulgular ilerleyerek pek çok organ sistemini etkilemektedir (**Ostergaard JR, 2005**). Diğer yandan kansere yatkınlık sendromları arasında yer alan bu hastalığın geni 17. kromozomun 11q12 bölgesinde lokalizedir ve von Recklinghausen ya da periferal NF olarak da bilinmektedir (**Sabbag A, 2009**).

2.1.1. Nörofibromatozis Tip 1' in Tarihçesi

1592 de İtalyan Ulisse Aldrovandi tarafından tanımlanan olgu 1642' de Mostroum isimli bir atlasta yayınlanmıştır.

1768' de Mark Akendise tarafından gerçekleştirilen olgu sunumunda; hastanın vücudunun pek çok bölgesinde çeşitli tomurcukların çıktığını ve hastanın bunlardan rahatsız olduğu için bu tomurcukları kestiğini ancak tekrar yerine yenilerinin çok daha fazla sayıda çıktığı belirtilmiştir.

Wilhelm Gottlieb Tilesius siğilli adam diye bahsettiği bir olguyu 1973' te yayınlamıştır. Bu makalede hastanın skolyozunun, makrosefalisinin ve cafe au lait lekelerinin (CLS) bulunduğunu belirtmiştir.

19.yy' ın en önemli hekimlerinden biri olarak kabul edilen Rudolf Ludwig Karl Virchow Nörofibromatozis Tip 1 hastalığına sahip olgular yayınlamıştır. Ardından kendisine asistan olarak atanan Friedrich Daniel von Recklinghausen' in sunduğu raporla Nörofibromatozis tip 1 hastalığının histopatolojik ve klinik özellikleri detaylı bir şekilde belirtilmiştir. İlk kez burada nörofibrom terimi kullanılmış ve daha sonra da bu hastalık von Recklinghausen hastalığı olarak tarihteki yerini almıştır.

Klinik bulguları oldukça net olan bu hastalığın 1987' de National Institute of Health Concensus Development Conferance tarafından tanı kriterleri belirlenmiştir. 90'lı

yılların başında da NF 1 geninin ekspresyonu olan nörofibromin proteini belirlenmiş ve ardından çalışmalar bu proteinin fonksiyonu üzerine yoğunlaşmıştır.

2.1.2. Nörofibromatozis Tip 1' in Klinik bulguları ve Tanı

1987' de National Institute of Health Concensus Development Conferance tarafından tanımlanan olan tanı kriterleri şöyledir;

- 6 ve üzerinde cafe-au-lait lekesi (çapları puberte öncesi 5 mm' den büyük, puberte sonrası 15 mm' den büyük)
- Nörofibromya sayısının 2 ve 2'den fazla olması veya 1 tane pleksiform nörofibrom bulunması
- Aksiler ve inguinal çillenme
- Optik gliom
- 2 ve üzerinde Lisch nodülünün (iris hamartomu) olması
- Sfenoid displazi, psödoartroz ile birlikte ya da olmaksızın uzun kemiklerin korteksinde incelme gibi kemik lezyonlarına sahip olmak
- Ailede birincil derecede akrabalarından NF 1 tanısı almış olmak

Belirtilen bu kriterlerden herhangi ikisinin olması tanının konulması için yeterlidir.

2.1.2.1. Cafe-au-lait lekeleri

NF 1' li hastalarda lekeler hayatlarının ilk yıllarında ortaya çıkabilir, çocukluk ve daha sonraki dönemlerde artış gösterebilir. Özellikle puberte döneminde büyüme ve gelişme ile sayılarında artış gözlenmektedir. Lekeler ilk yıllarda daha açık iken zamanla koyulaşabilmektedir. Bu durumun güneşe maruz kalma ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Kenarları genellikle düzgün olup; el, ayak, avuç içi, ayak tabanı ve saçlı deri dışında vücudun hemen hemen her yerinde görülebilir. NF 1' li bireyler 6 ve üzerinde cafe-au-lait lekelerine sahiptir. Bundan daha az sayıda cafe-au-lait lekelerinin varlığı NF 1 tanısı için yeterli değildir, çünkü toplumun % 10' unda birkaç tane cafe-au-lait lekesi mevcuttur. Cafe-au-lait lekeleri hastaların yaklaşık olarak % 95' inde görülür ve güneşe maruz kalma ile renklerin koyulaştığı gözlemlenebilir (Trovo-Marqui A. B, 2006; Kaufmann D, 2001).

2.1.2.2. Nörofibrom ve Pleksiform Nörofibromlar:

NF 1' de en yaygın görülen benign tümörlerdir. Bu tümörler deri yüzeyinde, altında ya da vücudun derinlerinde olabilmektedirler. Bu tümörlerin görülme sıklığı % 40-60 olarak belirtilmiş olup görülme sıklığının yaşla doğru orantılı olduğu bildirilmiştir. Genellikle puberte döneminde ortaya çıkan bu tümörler çabuk yayılma özelliği göstermezler. Nörofibromlar periferik sinir kılıfından kaynaklanan benign lezyonlardır ve temel olarak schwann hücreleri ve fibroblastlar içerir. Nörofibromların sayısı bir kaç taneden binlerce olabileceği gibi, hastalarda nörofibrom görülmeyebilir. Yüzeydeki tümörler deri nörofibromları olarak bilinirken, pleksiform nörofibromlar derinin alt yüzeyinde ya da vücudun derinliklerinde bulunmaktadır. Pleksiform nörofibromlar; belli bir düzeni olmayan, kalınlaşmış, çevredeki dokular ile sınır vermeyen, hayati dokuların içini ya da çevresini sarabilen ayrıca şekil bozukluklarına da neden olabilen agresif seyreden tümörlerdir. Pleksiform nörofibromlar tipik olarak yüzde olur ve özellikle baskıya maruz kalan bölgelerde rahatsız edici olabilmektedir.

2.1.2.3. Aksiller, İnguinal Çillenme

NF 1 hastalarında görülen aksiller ve inguinal çillenme genellikle puberte dönemi ortaya çıkar ve bunların cafe-au-lait lekelerinden ayrımı güçtür. Aksiller ve inguinal çillenme bazı etnik gruplarda her hangi bir hastalık belirtisi olmadan mevcuttur ancak aksiler ve inguinal çillenmeye ek olarak meme altı, boyun ve çene altında da çillenmenin görülmesi bu durumun NF 1 tanı kriterlerinden biri olduğunu gösterir.

2.1.2.4. Optik Gliomlar

Optik gliom optik sinirde oluşan düşük dereceli astrositik glial tümördür. Çok sık görülmemekle birlikte (%0,9-15) genellikle çocukluk döneminde kendini gösterir. İlk belirtisi görmenin zayıflaması ya da gözün öne doğru çıkık bir hal almasıdır. Optik gliomlu olguların % 50-75' inde zemininde NF 1 olduğu belirtilmiştir. Optik gliomlar buldukları yer uygulanacak tedavi protokolü ve prognoz üzerinde önemli etkiye sahiptir. Yerleşim yerlerine göre; anterior yerleşimli tümörler ve kiazmayı tutan posterior yerleşimli tümörler olmak üzere 2 temel gruba ayrılırlar. Anterior yerleşimli tümörler kiazmayı tutan posterior yerleşimli tümörlere göre daha iyi prognozludur.

Ancak ilerleyici görme kaybına neden olması gibi çeşitli semptomlara neden olurlar. Uzun yıllar sessiz kalabilen yavaş büyüyen tümörlerdir (**Albers AC, 2009**).

2.1.2.5. Lisch Nodülleri

Genellikle puberte döneminde ortaya çıkan bu pigmentler biyomikroskopla bakılarak toplumda gözlenen iris çillenmesinden ayırt edilebilir. Altı yaş altındaki çocuklarda nadiren rastlanırken, erişkin bireylerde tanının konulması için önemli bir kriterdir. Özellikle çocuklarda tanımlanması için biyomikroskopta split lamba kullanılması gerekmektedir. Lisch nodülü görmeyi engellemez ve tıbben bir soruna neden olmaz ancak hastanın nörofibromatozis tip 1 tanısı almasına yardımcı olur. Bu nodüller sarı-kahverengi melanositik hamartomatöz lezyonlar olup iris yüzeyinde kubbe şeklinde çıkıntı oluşturur. İlk olarak 1918’ de Waardenburg tarafından tanımlanmış olup, 1937’ de NF 1 ile olan ilişkisi Lisch tarafından açıklanmıştır. Bu süreçten sonra da Lisch nodülleri olarak bilinmektedir.

2.1.2.6. İskelet Displazisi Bulguları

NF 1’ deki kemik anomalileri çok sık olmamakla birlikte genellikle doğumla birlikte kendini gösterir. Sıklıkla baş kol ve bacaklarda görülmesine rağmen herhangi bir kemikte olabilir. Göz çevresindeki derinin hafif çıkıntılı görünümüne yol açan orbital kemiğin yokluğu, olması gerekenden daha ince ve eğimli olabilen diz altındaki bacak kemiklerinin eğriliği bunlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca kırıkların yavaş iyileşmesi ya da eksik iyileşmesi olabilir. Bu eksik iyileşme “yalancı eklem” (pseudoartroz)’ un nedenidir. Bu konjenital pseudoartrozlar NF 1’ de önemli bulgulardan biri olarak bildirilsede % 0,5-1 gibi düşük bir orana sahiptir. Ayrıca erkek hastalarda pseudoartrozun kadınlara göre daha sık ortaya çıktığı bildirilmiştir. NF 1 de yaygın görülen (%10-20) bulgulardan biri skolyozdur ve genellikle erken çocukluk döneminde kendini gösterir (**Ostergaard JR, 2005**).

2.1.2.7. Diğer Klinik Bulgular

Pubertenin erken ya da geç olması, boy kısalığı ya da aşırı uzunluk, zeka geriliği, öğrenme güçlüğü, hipertansiyon gibi pek çok bulgu kliniğe etki edebilir. NF 1’ li vakalarda izlenen hipertansiyon nörofibromların renal artere ve böbreğe basısı

sonucu oluşabilmektedir. Makrosefali NF 1' li hastalarda sıklıkla görülen bir bulgudur. Çok nadir olarak başın büyük olması hidrosefali ile ilişkilidir. Bu cerrahi işlem gerektiren bir durumdur ancak makrosefali tıbbi olarak bir sorun teşkil etmemektedir.

Hastaların bir kısmında öğrenme güçlüğü vardır. Yapılan nöropsikolojik çalışmalar herhangi bir özel profil ortaya koyamamaktadır. Kimi hastada sayısal alanlarda öğrenme güçlüğüne rastlanırken kimi hastada disleksi olabilir. Ayrıca çocukluk döneminde hastaların %50 sine yakın bir kısmında konsantrasyon problemi gözlenir. Sadece az sayıdaki NF 1 hastasında hafif derecede fonksiyonel engellilik vardır.

2.1.3. Nörofibromatozis Tip 1' in Genetik Özellikleri

1987' de NF 1 geninin 17. kromozomun uzun kolunda q22 bölgesinde "Nevre Growth Faktör" reseptör geni ile olan bağlantısı pE21 marker'ı kullanılarak belirtilmiştir. Ardından 1990 yılında NF 1 geni pozisyonel klonlama yöntemi ile 17q11.2 bölgesinden izole edilmiştir. Daha sonra ise 1993' te NF1 geninin tüm dizisi aydınlatılmıştır (**Martin GA, 1990**).

2.1.3.1. Nörofibromatozis Tip 1 geninin yapısı

NF 1 geni; 17q11.2 bölgesinde, 350 kilobaz büyüklüğünde ve en az 59 ekzondan oluşmaktadır. 2818 aminoasitten oluşan bir protein olan nörofibromin adında bir proteini kodlamaktadır. GTP'az aktive edici protein (GAP) ve mayalarda bulunan IRA1 ve IRA2 gen ürünleri bu genin 360 aminoasitlik kısmıyla benzerlik gösterir. Bu kısma NF 1 GAP ilişkili domein (NF 1-GRD) denir. NF 1' in izoformları olan 4 farklı bağlanma gösteren NF 1 transkripti tanımlanmıştır (**Bernards A, 1992; Martin GA, 1990**).

2.1.3.2. Nörofibromatozis Tip 1 geninin proteini

1990 yılında NF 1 geninin birçok dokuda yaygın olarak transkripsiyona uğradığı belirtilmiştir. Bunlara; lenfositler, akciğer, kas, dalak, beyin, cilt fibroblastları, nöroblastoma, nörofibroma, NF 1 nörofibrosarkoma hücre dizisi, meme kanseri hücre dizisi örnek olarak verilebilir. 1991' de yapılan bir çalışma ile nörofibrominin GTPaz aktive edici özelliği ile ras' ın aktivitesini düzenlediği ve bu yolla da hücre çoğalmasının kontrolünü sağladığı düşünülmektedir (**Martin GA, 1990**).

2.2. DNA Tamir Genleri

DNA mismatch tamirinden sorumlu 6 tane gen MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6(GTBP), MSH3 tanımlanmış ve klonlanmıştır (**McGoldrick J. P, 1995**).

İnsanlarda DNA onarım genleri, DNA hasarını onarımı bakımından hatalı olan kalıtsal hastalıklara sahip hastalar arasında yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır. James Cleaver' ın 1968 de yapmış olduğu çalışmalar DNA onarım genlerinin kanserle ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmalar olmakla beraber pek çok DNA onarım açısından kusurlu kalıtsal hastalık genlerinin de tanınmasında çok önemli bir rol oynamıştır.

Birçok DNA onarım geni, DNA metabolizmasında başka görevler de üstlenir. Örneğin; TFIID, hem transkripsiyonun başlangıcında, hem de nükleotid çıkarma onarımında görev alır. Çift zincir kırığı onarım genleri de ayrıca immün sistemin oluşumunda görev alır (**Pemov A, 2011**).

DNA onarımındaki bozukluklar, meme, kolon ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne neden olduğu gibi, ayrıca, büyüme ve beyin anomalilerine de sebep olur (**Toledano H, 2009**).

DNA hasarına yönelik standart olarak oluşturulmuş DNA onarım genleri bulunmaktadır (Tablo 1). Bu gen ekspresyonlarının analizleri tek tek yapılmıştır. Bu çalışmada Sabiosciences' in Tablo 1' deki genleri çalışılmış olup bu genler aşağıda açıklanmaya çalışılmıştır.

Tablo 1.İnsan DNA Onarım Genleri

Baz Eksizyon Tamiri (BER): APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1.

Nükleotit Eksizyon Tamiri (NER): ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC.

Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR): MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1.

Çift Zincir Kırıkları (DSB) Tamiri: BRCA1, BRCA2, DMC1, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51B, RAD51D, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6.

DNA Tamiri ile ilişkili Diğer Genler: ATM, ATR, EXO1, MGMT, RAD18, RFC1, TOP3A, TOP3B, XRCC6BP1.

Birçok kanser hücresinde, artırılmış DNA onarımı, kanser tedavisine gelişen dirençle ilişkilendirilebilir. Bu nedenle, tedavi şekli olarak, DNA onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması yönüne gidilmektedir.

DNA' nın yapısında meydana gelen değişiklikler, hücrenin RNA' lar ve proteinler gibi diğer bileşenlerindeki değişimlerden çok daha önemli sonuçlar doğurur. DNA onarımı sırasında gerçekleşen hatalar genetik kararsızlığa sebep olur ve bu da kanserin en önemli nedenlerinden biridir.

Bu çalışmada housekeeping gen olarak 3 tane gen(GADPH (gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz), RPL13A (ribozomal protein L13a), HPRT1 (Hipoksantin fosforibozil transferaz)) kullanılmıştır. Bunlar;

GADPH (gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz)

GADPH; G3PD ya da GAPD olarak da bilinmektedir. GADPH lokusuna benzer pek çok pseudogene, insan genomunda mevcuttur. Bu genden 2 farklı izoform kopyalandığı bulunmuştur. Bu genin ürünü karbohidrat metabolizmasında enerji verimliliği açısından önemli bir katalizördür. İnorganik fosfat ve nikotinamid adenin

dinükleotid (NAD) varlığında gliseraldehit 3-fosfatın geri dönüşümlü oksidatif fosforilasyonunu katalizler. Bu enzim özdeş dörtlü zincirden oluşmaktadır (Li Y, 2006).

RPL13A (ribozomal protein L13a)

İnsanlarda bulunan ribozomal bir protein olan L13A protein kodlayan bir gen olup L13A ya da TSTA1 olarak bilinmektedir. Bu gen sırasıyla ikinci, dördüncü, beşinci ve altıncı intronlarda yer alan U32, U33, U34 VE U35 küçük nükleolar RNA genlerinin kopyasıdır.

Bu gen ribozomun 60S alt biriminin bir komponenti olan ribozomal proteinlerin L13P ailesinin bir üyesini kodlar. Bu kodlanan protein ayrıca *IFN-gamma-activated inhibitör of translation (GAIT)* kompleksinin bir komponenti olarak inflamatuvar genlerin baskılanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Kenmochi N, 1998).

HPRT1 (Hipoksantin fossoribozil transferaz)

İnsanlarda bulunan protein kodlayan transferaz grubundaki bir gendir. HPRT ve HGPRT olarak da bilinir. Bu genin kodladığı transferaz grubundaki bu enzim hipoksantin inozin monofosfat ve guaninin, guanozin monofosfata dönüşümünü katalizler. Bunu 5-fosforibozil 1-pirofosfattan 5-fosforibozil grubunun transferi ile gerçekleştirir. Bu enzim pürin salvage yolu vasıtasıyla pirimidin nükleotidlerinin aktarımında önemli merkezi bir rol oynar. Bu gendeki bir mutasyon Lesch-Nyan sendromu veya Gut hastalığı ile sonuçlanır (Kim S. H, 1986; Keebaugh A. C, 2007).

Çalışılmış bulunan bu 84 DNA tamir geninden önemli olan bazıları ve fonksiyonları;

TREX1 (three prime repair exonuclease 1)

Bu gen 3. kromozomun kısa kolunda lokalize olup, insan hücrelerinde 3' > 5' yönünde DNA ekzonükleazı kodlar. İnsan DNA polimerazı için hata onarım özelliğine sahip *non-processive* bir ekzonükleazdır. Ayrıca SET kompleksinin (endoplazmik retikulum ilişkili kompleks) bir komponentidir ve granzym A'lı (apoptozisin kaspaz bağımsız hücre ölümünde aktivite gösterir) hücre ölümü boyunca DNA'nın 3' ucunun

hızla degrade olmasında rol oynar. Bu gendeki mutasyonlar Aicardi-Goutieres sendromu, Chilblain Lupus, and Cree Encephalitis ile sonuçlanmaktadır. Bu gen için çeşitli izoform tiplerinin bulunduğu rapor edilmiştir (**Fry R. C, 2008**).

PRKDC (Prkdc protein kinaz, DNA aktive, katalitik polipeptit)

Bu gen HYRC; p350; DNAPK; DNPk1; HYRC1; XRCC7; DNA-PKcs olarak bilinmekte olup 8. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. DNA bağımlı protein kinazın (DNA-PK) katalitik alt biriminin kodlanmasında görev alır. DNA çift zincir kırık onarımında ve rekombinasyonda Ku70/Ku80 heterodimer proteini ile fonksiyon gösterir. Bu protein PI3/PI4-kinaz ailesinin bir üyesini kodlar.

RAD18

RNF73 olarak da bilinen bu gen 3. kromozomun kısa kolunda lokalizedir. Bu gen tarafından kodlanan protein *S.cerevisiae* 'daki DNA hasar onarım proteini RAD18 benzeridir. Mayalardaki RAD18; hasarlı DNA nın post replike onarımı için gerekli ubiquitin-bağımlı bir enzim olan RAD6 aracılığıyla etki gösterir. Mayalardakinin tam benzeri olan bu protein; korunmuş bir *ring-finger* protein motifi vasıtasıyla mayalardaki RAD6 proteinin insanlardaki homologu ile etkileşime girebilir. Bu motifin mutasyonu UV (ultra viyole)-hasarlı DNA nın replikasyonu ile sonuçlanır ve çoklu mutasyonlara duyarlı hale gelir.

POLB (Polimerase-DNA directed-beta)

8. kromozomun kısa kolunda lokalize olan bu gen tarafından kodlanan protein baz ekzisyonu ve onarımı yapan bir DNA polimerazdır. Ayrıca bu işleme *gap-filling* DNA sentezi de denmektedir.

Kodlanan bu proteinin monomer olarak hareketi normal şartlarda sitoplazmada gerçekleşir ancak DNA hasarı olduğu durumlarda nukleusa geçer. Bu genin pek çok transkript değişkeni mevcuttur.

ERCC 3

XPB geni olarak da bilinmekte olup 2. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. Nükleotid ekzisyon onarımında ve ksedorma pigmentosumun grup B mutasyonunun da görev alan ATP-bağımlı bir DNA helikazdır. Ayrıca bazal transkripsiyon faktör 2 (TFIIH) nin 89 kDa luk bir alt birimi olup sınıf II transkripsiyonunda fonksiyon gösterirler.

APEX1 (APEX Nukleaz 1)

Gen APEX1 şeklinde sembolize edilir ve 14. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. **(Harrison L, 1992).**

Alternatif isimleri; apürinik endonükleaz, APE, APE; human apürinik endonükleaz 1, HAP1; apürinik/apirimidinik endonükleaz; redoks faktör 1, REF1' dir.

APEX genini insandan klonlandı ve 2.64 kb uzunluğunda 5 ekzon içerdiği ayrıca haploid genomda tek kopya olarak bulunduğunu göstermiştir. Ekzonlar ve intronlar arasındaki sınır GT/AG kuralını izlediğini gözlemlemiştir **(Akiyama K, 1994).**

Bu çalışmayı takiben ertesi yıl, fareden aynı homolojik gen bölgesini klonlamış ve tam dizilimini belirlemiştir ve görmüştür ki bu gen 5 ekzon ve 2.21 kb uzunluğunda 4 intron bölgesi içermektedir. Ekzonlar ile intronlar arasındaki sınır yine insanda olduğu gibi GT/AG kuralını izlemektedir **(Akiyama K, 1995).**

Apürinik endonükleaz (APE) olarak da adlandırılan APEX 1 apürinik/apirimidinik (AP) endonükleaz, 3' uç ve 5' uç ekzonükleaz ve DNA 3' uç fosfataz aktivitesine sahip bir DNA onarım enzimidir. Baz kayıpları ile oluşan AP bölgeleri in vivo hücresele DNA da en sıklıkla oluşan lezyonlardır. AP bölgelerinin; spontan hidroliz, çeşitli kimyasallar, radyasyon ve DNA glikozilaz ile oluştuğu bilinmektedir. Bu abazik bölgelerin oluşması DNA replikasyonunun bloklanmasına ve mutasyonlara sebep olabilir. Bu bölgeler genetik bütünlüğün sağlanması açısından düzeltilmelidir **(Akiyama K, 1994).**

İnsanda HeLa ve TK6 hücrelerindeki lusiferaz reporter geninin kısa süreli ekspresyonu sonucu APE1 promotorlarının aktivitesi ile genin fonksiyonu analiz

edilebilmiştir. Bu çalışmayla APE1 geninin kendi ürettiği ürünlerle downregüle olabileceği bulunmuştur (**Izumi T,1996**).

Elektroforetik hareketlilik sapma denemeleri (EMSA) Ref1 diye adlandırılan faktörlerin latent p53 proteinin kuvvetli aktivatörü olduğunu göstermiştir (**Jayaraman, L, 1997**).

APEX2, APEX Nükleaz (apürinik/apirimidinik endonükleaz) 2

Alternatif isimleri, APE2, XTH2, apürinik/apirimidinik endonükleaz like-2; APEXL2, APEX *endonükleaz-like 2'* dir.

Gen APEX2 şeklinde sembolize edilir ve X kromozomunun kısa kolunda lokalize olup 6 ekzon içerdiği tanımlanmıştır (**Tsuchimoto D, 2001**).

APEX2, N-glikozidik bağı spontan hidrolizi ile oluşan AP bölgelerinin onarımını başlatan apürinik/apirimidinik endonükleaz ailesinin bir üyesidir (**Hadi M. Z, 2002**).

APEX2 ve PCNA arasındaki ilişkiyi belirlemek için immün presipitasyonları kullanılmıştır. HAT medium ve deoksiüridin kullanarak nükleer DNA daki urasilin APEX2-PCNA birlikteliğini artırdığını göstermiştir ve böylelikle APEX2 nin hem nükleer hem de mitokondriyal baz eksizyon onarımına (BER) katıldığı belirtilmiştir (**Tsuchimoto D, 2001**).

Fare APEX2 mRNA seviyelerinin serum ile uyarılmış BALB/3T3 hücrelerinde geçici bir süreliğine arttığını ve geç S fazında da maksimuma ulaştığı saptanmıştır. Bu çalışmalar APEX2' nin *postreplicative* BER' e katıldığını önermektedir (**Ide Y, 2003**).

CCNO; (CYCLIN O)

Alternatif isimleri; urasil-DNA glikozilaz 2, UNG2, *UDG2 urasil-DNA glikozilaz siklin like'* dir.

Gen CCNO şeklinde sembolize edilir 5. kromozomun uzun kolunda lokalizedir.

HeLa hücrelerinden urasil-DNA glikozilazı saflaştırılmıştır. İn vitro transle edilmiş UDG2 nin önemli urasil-DNA glikozilaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (**Caradonna S, 1991; Muller S. J, 1991**).

3 insan hücre hattının immünohistokimyasal analizleriyle UDG2 nin yalnızca nükleusta lokalize olduğu bulunmuştur (**Caradonna S,1996**).

UDG2 nin mRNA transkripsiyonunun hem HeLa hücrelerinin hem de human akciğer fibroblastlarında hücre döngüsünün G1 fazı boyunca 2 kat dan 3 kata çıktığını bulmuşlardır. Promoter daki bir represör elementin S ve G2 fazları boyunca birkaç spesifik DNA kompleksi oluşturduğunu göstermişlerdir. Ayrıca immünopresipitasyon çalışmaları UDG2 protein seviyesinin G1 fazı boyunca arttığını ortaya çıkarmıştır (**Caradonna S, 1993; Muller S. J,1993**).

LIG3, (Ligaz III, ATP-bağımlı)

Alternatif isimi; DNA ligaz III olup genellikle LIG3 şeklinde sembolize edilir ve 17. kromozomun uzun kolunda lokalizedir.

Siğir karaciğer ve testisinden DNA ligaz II ve DNA ligaz III ü saflaştırıldı. Aminoasit dizilim çalışmaları ile bu enzimlerin aynı genden kodlandığı gösterildi. (Peptid dizilimine uygun probalar kullanılarak insan ve fareden DNA ligaz III (LIG3) ü kodlayan cDNA klonları izole edildi) (**Chen J,1995**).

XRCC1 ve LIG3 ün nükleotid ekzision repair ın başlıca esansiyel bileşenleri olduğunu göstermiştir. Bundan başka XRCC1-LIG3 ve polymeraz-delta (POLD1) NER bileşenleri ile birbirini etkilemektedir (**Moser J, 2007**).

DNA ligaz III ün mitokondride hayati önem taşıdığı ancak bu durumun XRCC1 ile birlikte yaptıkları onarım için aynı derecede önemli olmadığını göstermişlerdir (**Simsek D, 2011**).

DNA ligaz III ün mitokondriyal DNA nın doğruluğu açısından esansiyel olduğunu ancak bu durumun nükleer DNA için aynı derecede geçerli olmadığını bildirmiştir (**Gao Y, 2011**).

Fare sinir sisteminde ligaz III ün inaktivasyonu ciddi düzeyde mitokondriyal fonksiyon kaybına yol açarak hücre homeostazini bozar.

Memeli hücrelerindeki LIG3 için hayati önem taşıyan parametreler belirlenmesi için; LIG3 ün çeşitli formlarını bir LIG3 alleli içeren fare kanser kök hücrelerine

yerleştirilerek CRE rekombinleri belirlendi. Bu yaklaşımla LIG3 ün mitokondrinin hücrenel canlılığı için gerekli olduğu sonucuna ulaşıldı (**Gao Y, 2011**).

MPG, (N-metilpürin DNA glikozilaz)

Alternatif isimleri; metiladenin DNA glikozilaz, MDG 3-metiladenin DNA glikozilaz, 3MeAde DNA glikozilaz, 3-alkiladenin DNA glikozilaz (AAG), alkilpürin DNA N-glikozilaz(APNG)' dir. Gen MPG şeklinde sembolize edilir ve 16. Kromozomun kısa kolunda lokalizedir.

3-metiladenin (3MeA) DNA glikozilaz bakteriyal enzimi, *Escherichia coli* DNA replikasyonunu bloklayan 3MeA letal lezyonlarını onarır. 3MeA nın uzaklaştırılması tag ve alkA genleriyle kodlanan *Escherichia coli*' deki iki 3-metiladenin (3MeA) DNA glikozilaz aracılığıyla geręekleřtirilir (**Boosalis M, 1991**).

İnsanda da bulunan 3-metiladenin DNA metil transferaz enzimi DNA da hasara sebep olan çęitli grupları uzaklaştırılmasında görev alır (**Lau A. Y, 1998**).

MUTYH (MutY, E. COLI, MUTYH HOMOLOĞU:)

Alternatif isimi; MYH olup MUTYH şeklinde sembolize edilir ve 1. Kromozomun kısa kolunda lokalizedir.

E.coli mutY geni tarafından kodlanan enzim, bakteri mismatch onarım sisteminin ve A/G ve A/C hatalarını düzelten mutM (OGG1) ile birlikte çalışan bir bileşendir. *E.coli* mutY proteinin homoloğu proteinleri kodlayan tanımlayıcı dizi, cDNA dizi veri tabanında gösterilmiştir. Ayrıca insan beyin dokusu cDNA kütüphanesinden cDNA klonlarını izole edilmiştir (**Slupska M. M, 1996**).

Genin fenotiple ilişkisi değerlendirildiğinde; multiple kolorektal adenomlar, kolorektal adenomatoz poliposiz otozomal resesif tümörler ve gastrik somatik kanserlerde ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır (**Slupska M. M, 1996**).

2.2.1. DNA tamir mekanizmaları

Hücreler DNA hasarının onarımı için birçok mekanizmaya sahiptir. DNA onarım mekanizmaları hücrelerin genom bütünlüğünü koruyabilmek amacıyla temelde 2 ana gruba ayrılır. Bunlar;

- DNA hasarına sebep olan reaksiyonun direkt olarak tersine çevrilmesi
- Hasarlı hale gelen bazların yeni sentezlenen DNA ile değiştirilmesi

2.2.1.1. DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesi

DNA hasarına neden olan reaksiyonun doğrudan geri çevrilmesiyle gerçekleştirilen bu tamir mekanizması çok basit ve temel bir yol gibi görünmesine rağmen termodinamik açıdan ortamın enerjisi değiştiği için oldukça zor bir durumdur.

UV ışığına maruziyetle, aynı DNA ipliği üzerindeki komşu iki pirimidinin 5 ve 6' ncı karbonları arasındaki çift bağı doyurulması ile pirimidin dimerleri oluşur. DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesi ile gerçekleştirilen onarım mekanizmasında temel prensip; ve pürin halkasına etil ve metil gruplarının O-6 pozisyonundan eklenmesiyle oluşan hataların düzeltilmesidir. O-6 metilguanin metil transferaz enzimi sayesinde, alkilleyici ajanların DNA da yaptığı hasarlar metil grubunu kendi aktif merkezindeki sisteine transfer etmesiyle bu enzim aracılığıyla onarılır. Böylelikle orijinal guanin korunmuş olur. Bu direkt onarım insanlarda da sıklıkla rastladığımız bir onarım türüdür. Pirimidin dimerleri arasında çift bağı doyurulması ile gerçekleştirilen DNA hasarında, dimerizasyon reaksiyonu direkt olarak geri döndürülür. Gerekli olan enerji görünür ışıktan sağlanır ve böylelikle siklobütan halka yapısı kırılır ve bu reaksiyona enerjiyi görünür ışıktan temin ettiği için fotoreaktivasyon adı verilir (**Buttarelli FR, 2010; Brandes AA, 2006**).

2.2.1.2. Kesip çıkararak (ekzisyon) onarım

Tüm hücre tipleri için en önemli DNA onarım mekanizmasıdır. Kesip çıkararak onarımda hasarlı bölge tanınarak baz ya da nükleotidler halinde çıkarılır. Oluşan

boşluk sağlam DNA ipliği kalıp olarak kullanılarak doldurulur. Kesip çıkararak onarım 3 şekilde olur;

- Baz çıkarma
- Nükleotid çıkarma
- Hatalı eşleşme onarımı

2.2.1.2.1. Baz çıkarma

Baz çıkarma ile yapılan DNA onarımına hatalı urasil içeren DNA' nın onarımı da denebilir. DNA'da hatalı urasilin görüldüğü iki mekanizma vardır;

- dUTP olarak timin yerine katılması
- sitozinin deaminasyonu ile oluşması

Bu doğrultuda; DNA sentezi sırasında nadir olarak timin yerine katılan ya da sitozin' in deaminasyonu ile oluşan urasil' in çıkarılarak uzaklaştırılması, onarım gerçekleşemediği takdirde bir baz eşleşmeside bir hatanın ortaya çıkmasına sebep olduğu için çok önemlidir. Baz DNA glikozilaz (sadece spesifik hasarlı baz tipleri tanır) tarafından çıkarılır ve geriye baz taşımayan şeker bölgesi (apirimidinik ya da apürinik bölge) kalır. Bu bölge genellikle AP bölgesi olarak adlandırılır. İnsan vücudundaki her hücrenin birkaç bin pürin bazını her gün kaybettiği düşünülmektedir. Bu kayıplar AP endonükleaz tarafından onarılır aksi takdirde çok ciddi sorunlara yol açabilir. Ardından oluşan boşluklar DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur.

2.2.1.2.2. Nükleotid çıkarma

Hasarlı bazların oligonükleotidlerle birlikte uzaklaştırılması nedeniyle bu DNA onarım şekline nükleotid çıkarma onarımı (NER) denmektedir. DNA glikozilaz tarafından deoksiriboz ile baz arasındaki bağ koparılır. Bu işlem sonrasında serbest urasil ve apirimidinik (baz taşımayan şeker) ortaya çıkar. Genellikle bu bölge AP bölgesi olarak adlandırılır. DNA glikozilaz tarafından çıkarılan bu bölge AP endonükleaz tarafından tanınır. Kalan deoksiriboz ise deoksiribozfosfodiesteraz ile uzaklaştırılır. Oluşan

boşluklarda DNA polimeraz ile doldurulur ve bağlantı ligaz ile sağlanır. Baz çıkarma onarım ile benzer özellik prosedürüne sahip olmasına rağmen baz çıkarma onarımından daha sıklıkla görülür. Ayrıca bu onarım tipinde lezyonu içeren oligonükleotidlerle birlikte uzaklaştırma vardır.

Yapılan çalışmalar; mayalarda DNA onarımı ile ilişkili RAD genleri (radyasyona duyarlı genler) ile memelilerdeki DNA onarım genlerinin proteinleri ile benzer özellik gösterdiği için, bu DNA onarımında nükleotid çıkarımı ile onarımın ökaryotik canlılarda korunmuş olduğunu göstermektedir.

Kesip çıkararak onarımda ilk basamak, XPC ile bir protein olan h HR23B' den oluşan bir kompleks tarafından tanınır. Ardından XPB, XPD ve XPG proteinleri hasarlı bölgeye gelir. XPB ve XPD TFIIH' nin alt birimidir. TFIIH transkripsiyon faktör olmakla birlikte helikaz etkisi gösterir ve hasarlı bölge etrafındaki bazların açılmasını sağlar (~30 baz çifti). Ardından hasar XPA proteini yardımıyla onaylandıktan sonra XPF, ERCC1 ile birlikte kompleks oluşturularak onarıma katılır. XPF/ERCC1 hasarlı bölgeyi 5` ucundan XPG ise hasarlı bölgeyi 3` ucundan kesen endonükleazlardır. Oluşan boşluk RFC ve PCNA ilişkili DNA polimeraz δ ve ϵ ile doldurulur. Sonra ligaz tarafından uçlar birleştirilir (**Moser J, 2007**).

2.2.1.2.3. Hatalı eşleşme onarım

DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmiş bazlar, DNA polimerazın kendi yanlışını düzeltmesi ile uzaklaştırılır. Uzaklaştırılmayanlar ise yanlış eşleşme onarım sistemi ile uzaklaştırılır. Her hangi bir yanlış eşleşme sistem tarafından fark edildiğinde, yeni replike olmuş DNA ipliğindeki hatalı baz bulunup çıkarılır ve böylelikle orijinal dizinin korunması sağlanır. DNA' daki GATC dizilerinde yer alan adeninler metillenerek 6-metiladenini oluştururlar. Metillenme işlemi replikasyon işleminden sonra meydana geldiğinden ve yeni sentezlenmiş olan DNA ipliğinin metillenmemiş olması nedeniyle yanlış eşleşme onarım enzimleri bölgeyi spesifik olarak tanır ve hata onarılır (**Lau A. Y, 1998**).

2.3. Nörofibromatozis Tip 1' de DNA Tamir Genlerinin Önemi

Literatür incelendiğinde NF1 ile DNA tamir genleri arasındaki ilişkiyi inceleyen pek fazla bir çalışmanın yapılmadığı görülür.

NF1 genine ait DNA tamir genleri NF1 hastalarında dizi analizi yöntemi ile araştırılmıştır. NF1 hastalarında literatürde en yaygın mutasyon bölgesi olarak tanımlanan ekzon 4b, ekzon 27a ve ekzon 37 olan üç ekzona ait bölgeler dizi analiz yöntemiyle incelenmiş ve 16 NF1 hastasında bu bölgelerde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (**Pehlivan S, 2009**).

Yapılan bir çalışmada cafe au lait lekesine sahip NF1 hastalarının altında yatan mekanizmanın “Yapısal Mismatch Tamir Eksliği” olduğu belirtilmiş ve “Yapısal Mismatch Tamir Eksilik Sendromlu (CMMR-D)” hastaların mozaik NF1 mutasyonu taşıdığı olası olduğu belirtilmiştir (**Wimmer K, 2008**).

Yapılan bir çalışmada Lynch sendromu olarak tanımlanan dominant erişkin kanser sendromu Herediter nonpoliposis kolorektal kanserin nedeninin MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 mismatch tamir genlerindeki (MMR) heterozigot mutasyonlara bağlı olduğunu önermişlerdir (**Wimmer K, 2008**).

DNA onarım genlerinde buradaki biallellik kalıtıma sahip hastalarda bu fenotip gözlenmiştir. MMR tamir genlerinde de mutasyon olarak hastalarda genellikle çocukluk çağı hematolojik kanserle, gastrointestinal tümörlere, beyin kanserleri ve erken başlangıçlı kolorektal kanser olarak ortaya çıktığı saptandı. Bu hastaların hemen hepsinde NF1 işareti olan cafe au lait lekelerine rastlanmıştır. Bu durumun altında yatan mekanizmanın “Yapısal Tamir Gen Defekti sendromu (CMMR-D)” ile ilişkili olabileceği tanımlanmıştır (**Wimmer K, 2008**).

Yapılan bu çalışmada NF1 deki MMR eksikliğinin mutasyonun ana hedefi olduğunu açıkça gösterilmiştir ve aslında diğer herediter sendromlarda da gözlemlendiği belirtilmiştir (NF1 deki sendromda SPRED 1 geni, leopard sendromunda NSB geni vb.). CMMR-D sendromu biallelik BRCA2 mutasyonlarından kaynaklandığı belirtilmiştir (**Wimmer K, 2008**).

MMR tamir genlerindeki mono allelik germline mutasyonlar otozomal dominant sendrom olan Lynch sendromuna yol açar. Bu çalışmada biallelik gen mutasyonu olan erkek ve kız kardeşlerde ilk 6 kodonun patolojik delesyonu ve başlangıç kodonunun varyantı (C.1A>G(p.Met1?)) 39 ve 48 yaşlarında 4 kolorektal kanser, ince bağırsak karsinomu ve 15 adenom; 33 ve 45 yaşlarında da kolorektal endometriyum 4 adenom fenotiplerinin ve bu karsinomlardaki mikrosatellit instabilitenin (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) varlığı c.1A>6 varyantının tümörlerde bulunan ve azalan aktivite ile ilişkili alternatif protein oluşumuna neden olduğunu gösterir **(Kets CM, 2008)**.

MSH2 gen ekspresyonundaki metilasyon bağımlı değişkenlik mismatch repair kapasitesinde değişikliklere neden olabilir. MSH2'nin NF1 için modifiye edici olabileceği, bunun da NF1 deki diğer hücre tiplerindeki DNA metilasyonu ve sonraki gen ekspresyon değişiklikleri ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir **(Titze S, 2010)**.

Biallelik MMR gen mutasyonuna sahip hastaların santral sinir sistemi tümörlerinde mikrosatellit instabilite gözlenmiştir. MLH1 ve MLH2 deki patolojik biallelik mutasyonlu hastaların malignite geliştirdiği bildirilmiştir **(Titze S, 2010)**.

Yapılmış olan tüm bu çalışmaların ışığında; kanserin düzeltilmemiş DNA hasarlarından kaynaklanabileceği ve dolayısıyla NF1 hastalarında bu anlamda MMR genleri ile ilişkili nörofibromların yanı sıra lösemi, yumuşak doku tümörleri, beyin tümörleri, nöroblastom gibi malign tümörlerin gelişebildiği bilinmektedir.

Bugün gelinen nokta da NF1 hastalarında tümör gelişimi; hastanın yaşam kalitesini etkileyen skolyoz, mental retardasyon gibi kemik bulgularının nedenlerini anlamada DNA onarım genlerinin ekspresyonunun rollerinin oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Bugüne dek tıbbi literatürde; MMR genleri ve NF1 ilişkisi ile ilgili gen ekspresyonlarının değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle NF1 hastalarında MMR gen ekspresyonunun klinik bulgularla ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

3.0. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmanın tipi deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı polikliniğinde izlenen 36 NF1 hastası (30 çocuk; 6 ebeveyn), hiç bir hastalığı olmayan 8 kontrol olgusu (6 erkek; 2 kadın), rabdomiyosarkomlu NF1 olmayan 2 kontrol olgusu olmak üzere 46 olgu dahil edilmiştir. 8 kontrol olgusunun yaş ortalaması $17\pm 7,03$ (10-30 yaş) (ortanca 13 yaş) dir. NF1 olgularının 17' si kadın 19' u erkektir. NF1' li olgularımız için tanı anındaki yaş ortalaması $10,08\pm 8,86$ (9 ay- 38 yaş) (ortanca 8 yaş) iken hastalarımızın çalışmaya alınan ebeveynlerinin yaş ortalaması $40,50\pm 1,22$ (39-42 yaş) (ortanca 40 yaş) tır. 36 hastanın, 17' si nörofibromlu, 17'si hamartomatöz lezyonludur. 1 hastada rabdomiyosarkom gözlenmiş, 1 hasta meme kanseri ve 4 hasta da optik gliomludur.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine göre hasta grupları şöyledir.

- 1-Nörofibromatozis Tip 1 olgularında ailesel ilişki kanıtlanmış ancak tümörün gelişmediği olgular
- 2- Ailesel ilişkisi bulunmayan NF1 olguları
- 3-Nörofibromatozis Tip 1 olgularında tümörün geliştiği olgular
- 4- Rabdomiyosarkom tanısı almış Nörofibromatozis Tip 1 olguları
- 5- Rabdomiyosarkom tanısı almış ancak Nörofibromatozis Tip 1 olmayan olgular
- 6- Nörofibromatozis Tip 1 olgularında nörofibromların geliştiği olgular
- 7-Nörofibromatozis Tip 1 olgularında nörofibromların gelişmediği olgular

8- Nörofibromatozis Tip 1 olgularında hamartomatöz lezyonları olan olgular

9-Nörofibromatozis Tip 1 olgularında hamartomatöz lezyonların olmayan olgular

3.4. Çalışma Materyali

Hastaların ailelerine gönüllü olur formları imzalatılarak onamları alındıktan sonra hastalardan rutin işlemler sırasında kan alım işlemi esnasında steril EDTA'lı hemogram tüplerine 3 ml kan alınmıştır. Kan örnekleri hastalar zaten rutin incelemeler için kan verdiği sırada alınmış olup ayrıca bir girişim uygulanmamıştır. Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu (PBMC) taze kan örneklerinden bekletilmeden histopaque ayırma solusyonu ile yoğunluk gradient santrifügasyonu yöntemiyle izole edilmiştir. İzole edilen PBMC 'ler hemen azotta -196 °C 5 dakika kadar kısa bir süre şoklandıktan sonra -80°C de saklanmıştır

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışmada hastaların cinsiyeti, yaşı, hastalığın evresi ve izlenim süreleri bağımsız değişkenleri oluşturmaktadır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Cihazlar, Sarf malzemeler ve Gereçler, Kitler ve Reaktifler

3.6.1.1. Cihazlar

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar

Vorteks (Velp Scientifia ZX3)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
USF Elga model saf su sistemi	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
Derin dondurucu (Sanyo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
RT PCR	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
Pastör fırın	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
-80°C derin dondurucu	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
Mikrosantrifuj	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı
Santrifuj	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarı

3.6.1.2. Sarf Malzemeler ve Gereçler

- Kan alma tüpü
- Steril pastor pipet
- T p taşıma rakı
- Kağıt
- -80 saklama kutusu
- Printer kartuşu
- Kağıt havlu
- Falcon tüp 15 cc
- Heat blok
- Raklar
- Pipet rler
- Soğuk blok
- Etil alkol temizlik için

3.6.1.3. Kitler ve Reaktifler

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kitler ve Reaktifler

<i>MADDE ADI</i>	<i>FİRMA</i>	<i>KAT.NO</i>
Histopaque	Sigma	10771
RNA izolasyon kiti	Macherey-Nagel	740955.50
cDNA sentez kiti	Qiagen	330401
İnsan DNA Onarım RT-PCR Array kiti	Qiagen	330231
Master mix	Qiagen	330552
Phosphate buffered saline	Sigma	P3883

3.6.2. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

3.6.2.1. Genel İlkeler

Dansite gradient santrifüjünün temel prensibi; yoğunlukları aynı olan taneciklerin şekil ya da boyutları bakımından diğerlerinden ayrışabilme özelliğine dayanır. Bunun için çalışılacak materyal önce viskoz bir ortama yerleştirilir. Bu ortamda taneciklerin yoğunluğunun sıvının yoğunluğundan fazla olması nedeniyle tanecikler santifügasyona bağlı olarak çöker. Ancak bütün taneciklerin çökmemesi gerekir. Bunun için bu çalışmada histopaque (Sigma-aldrich Lot: 063K6001) ayırma solüsyonu kullanılmış, histopaque gradientli ortam içerisinde PBMC'ler dansite gradient santrifüjü uygulanarak izole edilir. Histopaque; polisükroz ve sodyum diatrizoate içeren yoğunluğu 1.077 g/ml olan bir ayırma solüsyonudur. Yoğunluğu 1.077 g/ml üzerindeki yapılar (lenfositler ve diğer mononükleer hücreler) bu hidrofilik polimer kullanılarak elde edilebilir. Histopaque (d:1.077 g/ml) ile yapılan dansite gradient santrifügasyonu sonucunda; en üstte sarımsı bir tabaka olarak serum (trombositler ve monositler), ortada yoğunluğu yaklaşık 1,077 g/ml olan lenfositler ince bir tabaka halinde yer alırken hemen altında histopaque solusyonu ve en altta da kırmızı bir tabaka şeklinde yoğunlukları 1,077 g/ml' den fazla olan eritrositler ve granüositler bulunur.

3.6.2.2. Uygulama Basamakları

Gönüllü olur formları imzalatıldıktan sonra steril koşullardaki rutin prosedürler sırasında EDTA' lı tüplere tam kan örnekleri alınmıştır. Alınan kanlar bire bir oranda PBS ile dilüe edildikten sonra Histopaque dansite 1077 solüsyonu ile periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) 1650 rpm de 15 dk santrifüj edilerek (Sigma 3-16 K santrifüj) dansite gradientine göre ayrılmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından bu PBMC' lerden RNA izolasyonu yapılmıştır.

Kandan mononükleer hücre izolasyonuna başlamadan önce, izolasyonda kullanılacak olan PBS hazırlandı. Bunun için 1 litre distile su içerisine 1 kutu toz halinde bulunan (Sigma P3883) eklendi ve homojen olarak dağılması sağlandı.

- 4ml histopaque (sigma-aldrich 1077 d: 1,077) alınıp 15 lik tüpe konuldu.

- Ardından alınan kanlar bire bir oranda oda ısısında PBS ile dilüe edildikten sonra pastör pipeti yardımıyla kan ile PBS homejenize edilip kan pastör pipetine çekildi.
- 15 lik tüpte bulunan histopaque (sigma-aldrich 1077 d: 1,077) alınıp 45 derecelik bir açı tutularak üzerine PBS ile dilüe edilmiş olan kan yavaş yavaş tüpün kenarından çepere değecek şekilde bırakıldı. Bu işlem 3 seferde tamamlanabildi. Bu işlemi gerçekleştirirken baloncuk oluşturmamaya özen gösterildi.
- 1600 rpm de 20 dakika santrifüj yapıldı. Burada amaç farklı fazlar oluşturmaktı.
- Santrifüj işleminden sonra; en üstte serum ortada ince bir tabaka halinde mononükleer hücreler, altta histopaque ve en dipte de kırmızı kan hücreleri elde edildi.
- Steril pastör pipeti yardımıyla direkt olarak mononükleer hücrelerin olduğu kısma kadar inilip (pastör pipeti basılı pozisyonda) hücreler toplandı. Bu işlem yapılırken tüp biraz eğik tutulup, arkasına koyu renk bir kağıt konularak hücrelerin kolaylıkla görülmeleri sağlandı.
- Hücreler 15 lik bir tüpe toplandıktan sonra üzerlerine 5 ml civarında PBS eklendi
- 1200 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüjden alınan hücrelerin üzerlerindeki sıvı pastör pipeti yardımıyla atıldı.
- Hücrelerin üzerlerine 8-9 ml ye kadar PBS eklenip 1200 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı.
- Böylelikle PBMC (periferik kandan mononükleer hücre) izolasyonu gerçekleştirildi.

3.6.3. RNA izolasyonu ve ölçümü

3.6.3.1. Genel İlke

RNA izolasyonu yönteminde temel prensip; hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp, fenol kullanılarak RNA'nın ekstrakte edilmesine dayanır. Günümüzde kullanılan protokoller 1987'de Chomczynski ve Sacchi tarafından gerçekleştirilmiş olan RNA izolasyon protokolünün modifiye halleridir. RNA izolasyonundan maksimum verim elde edebilmek için örneklerden hücreler bekletilmeden direkt olarak izole edilmeli ve hemen çalışılmamalıdır. Öncelikli olarak izole edilen hücreler sıvı azotta (-196°C) yaklaşık olarak 5 dakika gibi kısa bir süre şoklandıktan sonra RNA izolasyonuna geçilmelidir. Buradaki temel amaç; hücre duvarlarının parçalanmasını sağlayarak elde edilecek olan RNA'nın verimliliğini arttırmaktır.

3.6.3.2. Uygulama Basamakları

İzole edilen PBMC'leri uygun seyreltme işlemleri ardından TOMA lamı ile sayılmıştır. Buna göre 1×10^6 hücre başına yaklaşık 15 µg RNA eldesi için uygulanacak prosedür şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan RNA izolasyon kitinde (Macherey-Nagel) bufferlar hazır olarak temin edilmiştir.

İzolasyon işlemi için öncelikle ön hazırlıklar yapıldı. Bunun için;

- ✓ RA3 Wash Buffer (Macherey-Nagel Lot:PAF0029660) solüsyonuna 20 ml etanol eklendi.

Aşağıdaki prosedür izlendi.

- Kriyoviyollerdeki hücreler 1,5 ml 'lik konik tabanlı mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Steril mikrosantrifüj tüplerine alınan hücreler 1500 rpm 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüplere ve onların konulduğu koleksiyon tüpleri iç içe geçirilip üzerlerine hasta adları yazıldı.

- Santrifüj işleminden sonra üst kısım çekilerek atıldı. Bu işlem steril filtreli pipet uçları kullanılarak gerçekleştirildi.
- Hücrelerin üzerlerine 350 µl RA1 Lysis buffer (Macherey-Nagel Lot:PAF0029425) eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Hücrelerin üzerlerine 3,5 µl merkaptotanol eklendi ve bir kaç saniye vorteks yapıldı.
- Önceden koleksiyon tüpüne takılmış olan filtrelere bu hücreler aktarıldı.
- 11000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu aşama filtreleme aşamasıydı ve artan şeylerin uzaklaştırılması amacıyla yapıldı. O yüzden filtreli kısımlar atıldı.
- Alt kısımlar koleksiyon tüplerinin kapakları olmadığı için yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Her bir örneğin üzerine 350 µl %70' lik etanol ilave edildi.
- Nükleospin kolonları (Macherey-Nagel Lot:SPB000898) açılıp üzerlerine hasta isimleri yazıldı.
- Mikrosantrifüj tüplerindeki hücreler bu nükleospin kolonlarına aktarıldı.
- 30 saniye 11000 g de santrifüj yapıldı.
- Filtreli kısımlar alınıp yeni koleksiyon tüplerine aktarıldı.
- Her bir tüpe 350 µl MDF buffer (membrane desalting buffer Lot:PAF0029626 Macherey-Nagel) eklendi.
- 11000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüj işlemi gerçekleşirken DNase reaction mix hazırlandı.

Bu amaçla;

10 µl rDNase (Macherey-Nagel Lot:D0809R) X Örnek sayısı

+

90 µl reaction buffer (Macherey-Nagel Lot:PAF0029394) X Örnek sayısı

- Her bir örneğin üzerindeki filtreli tüpe hazırlanmış olduğumuz bu karışımdan eklendi.
- Ekleme işlemi tamamlandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Bekleme sürecinin bitmesiyle yıkama aşamasına geçildi. Bunun için hücrelerin üzerlerine 200 µl RA2 (Macherey-Nagel Lot:PAF0029438) solüsyonu eklendi.
- 30 saniye 11000 g de santrifüj yapıldı.
- Alt kısımlar atıldı.
- Filtreli kısımlar yeni koleksiyon tüplerine takıldı.
- Her bir örneğe ilk kullanımda 20 ml etanol ilavesi yapmış olduğumuz RA3 wash buffer solüsyonundan (Macherey-Nagel Lot: PAF0029660 5ml) 600 µl eklendi.
- 30 saniye 11000 g de santrifüj yapıldı.
- Alttaki koleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı.
- Her bir örneğin üzerine 250 µl RA3 wash buffer solüsyonundan (Macherey-Nagel Lot: PAF0029660 5ml) eklendi.
- 11000 g de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Böylelikle RNA toplama aşamasına gelindi. Bu aşamada steril mikrosantrifüj tüplerinin üzerlerine hasta isimleri yazıldı.
- Alt kısımlar uzaklaştırılıp filtreli kısımlar önceden üzerlerine hasta isimleri yazmış olduğumuz steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılır.
- Her bir hasta örneği üzerine 60 µl RNase free su (Macherey-Nagel Lot:PAF0029490) eklendi. Bu işlem gerçekleştirilirken filtrenin suyu hemen

emmesinden dolayı suyu çeperlere değilde filtrenin tam ortasına isabet ettirmeye dikkat edildi.

- 11000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Böylelikle alttaki 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerinde RNA' yı elde etmiş olduk.
- Bu RNA daha sonra çalışmak için -80°C 'de saklandı.

cDNA sentezi yapmadan önce ne kadar RNA kullanmamız gerektiğini anlamak için RNA ölçümü yapıldı. Bunun için; T80+UV/VIS Spektrofotometer cihazı (PG Instrument) kullanıldı. Bu amaçla;

- Yeni steril mikrosantrifüj tüplerine hasta adları yazıldı.
- RNA ölçümü için 1:25 oranında seyreltme yapıldı (72 µl distile su ve 3 µl RNA her bir mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
- Pipetaj yapıldı.
- Saf su ile küvetler yıkandı.
- Bilgisayardan UV WIN programı çalıştırılıp application→setting' den ayarlar yapılmıştır. (A1/A2→260/280)
- Her 2 küvete de 75 µl distile su konularak sıfırlama işlemi yapıldı.
- Ölçüm işlemi gerçekleştirildi.
- Örnekler 1:25 oranında seyreltiği için çıkan sonuçlar 25 ile çarpıldı.

RNA kalitesi ile ilgili olarak; her türlü kontaminasyondan kaçınılarak steril çalışmaya ve pipetajların doğru yapılmasına dikkate edildi.

3.6.4. cDNA sentezi

3.6.4.1.Genel İlke

cDNA, RNA molekülünden revers transkriptaz enzimi yardımıyla DNA kopyasının sentezlenmesi işlemidir. Hedeflenen hücrenin DNA sı ele alındığı zaman işlemlenen ya da işlemlenmeyen tüm genleri içerir. O yüzden hücrelerin anlatım yapan işlemlenen kısmı olan mRNA lar kullanılır. Böylelikle mRNA dan cDNA elde edildiği zaman yalnızca anlatımı yapılan genler bulunur. Bu amaçla önce RNA izolasyonu ardından cDNA çevrimi gerçekleştirilir. Burada mRNA işlenirken intronlar uzaklaştırılır geriye ekzonlar kalır (**Simpson D, 1988**).

cDNA sentezini gerçekleştirmek için RNA kullanılır. cDNA sentezi için kullanılan revers transkriptaz enzime başlangıç için ihtiyaç duyduğu primer poli A kuyruğundan bağlanır. Enzimde poli A kuyruğunun olması revers transkripsiyon basamağında üstünlük sağlamasına neden olmaktadır. Ardından revers transkriptaz mRNA'yı kalıp olarak kullanarak primeri yardımıyla uzamanın gerçekleşmesini sağlar ve tek zincirli cDNA kopyasını oluşturulur (**Bernards A, 1992**).

3.6.4.2. Uygulama Basamakları

Bir plate için kullanılması gereken total RNA miktarının 1 mikrogram olması gerekiyordu. O yüzden ne kadar RNA çekilmesi gerektiği hesaplandı.

Yani;

A hastası için RNA miktarı 222,222 ise;

1000 µl 222,222

X 1

1000/222,222=4,500 µl

Total volume 10 mikrolitre olması gerektiği için;

RNA	Buffer GE	RNase free su	total
4,500 µl	2 µl	3,500 µl	10 µl

cDNA sentezi konvansiyonel PCR cihazı (NY-X Teknik ATC 401 model) kullanılarak gerçekleştirildi.

- Küçük PCR tüplerine hasta isimleri yazıldı.
- Yukarıda her bir hasta için hesaplanmış olan su miktarları eklendi.
- Her bir örnek üzerine 2 µl GE buffer (24 µl Lot:DW27-2) eklendi.
- Her hasta için hesaplanan miktardaki RNA lar eklendi.
- Birkaç saniye ufak bir spin işlemi gerçekleştirildi.
- Spin işleminden sonra 42°C 5 dakika ya ayarlanmış olan SAcDNA 1 programı çalıştırıldı.
- SAcDNA 1 programı tamamlandıktan sonra en az 1 dakika kadar buzda bekletildi.
- Bu sırada cDNA nın oluşmasında çeviri kısmında görev alan master mix toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlandı. Bunun için;

Tablo 4: cDNA master mix hazırlama protokolü

	1 HASTA için
Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transkriptaz master mix	2 µl
RNase free water	3 µl

- Örnekler buzdan raka (+4°C) alındı ve hazırlanmış olan master mix den her bir örneğe 10 µl eklendi.
- Birkaç saniyelik ufak bir spin yapıldı.
- SAcDNA2 programı (NY-X Teknik ATC 401 model) çalıştırıldı.
- SAcDNA2 programı tamamlandıktan sonra her bir örnek üzerine 91 µl RNase free su' dan eklendi.
- Böylelikle cDNA sentezlenmiş oldu.

3.6.5. RT-PCR Array Analizi

3.6.5.1. Genel İlke

Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (REAL - TIME PCR), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir (**Binnie CG,1997**).

Real-time PCR dizi analizi yapılacak olan kit (QIAGEN PAHS-042A Lot:CB23.7-R1) insan kökenli olup DNA tamir enzimlerini kodlayan genler için hazırlanmış standart bir

ticari kittir. Yapılmış olan data analizinde Tablo 1' de belirtilen genlerin ekspresyonları hakkında bilgi edinilmiştir.

3.6.5.2. Uygulama Basamakları

Elde edilen RNA' lar cDNA' ya çevrilmiştir. cDNA' lar uygun PCR karışımlarına DNA kontaminasyonundan özenle kaçınılarak eklenmiştir.

Her bir kuyucuğa koymamız gereken RNase free su, cDNA ve master mix den oluşan karışım hazırlandı. Bunun için;

- 1248 µl RNase free water 5 ml' lik steril tüpe aktarıldı.
- 102 µl cDNA eklendi.
- SYBR Green Rox qPCR mastermix den 1,35 ml konulup pipetaj yapıldı.
- RT² profiller PCR Array Human DNA repair (Qiagen PAHS-042A Lot:DH26-10) array inde her bir kuyucuğa 25 µl bu karışımdan eklendi.
- Kuyucuklar tek tek kontrol edildi ve üstleri strip ile kapatıldı.
- Çeperde kalanların dairesel hareketler çizerek şekilde sallanarak aşağıya inmeleri sağlandı.
- AB Applied Biosystem 7000 Sequence Detection System cihazı ve bilgisayar çalıştırıldı.
- Bilgisayardan 7000 System Software Programı açıldı.
- Assay: Absolute Quantification (standart curve)

Countainer: 96-well clear

Template: Blank Documents

Operator: XP

Seçildikten sonra ileri tuşuyla devam edildi.

- Dedector name→GADPH

Reporter → SYBR

↓

Add

↓

İleri

- Instruments ;

✓ Stage 3 silindi.

✓ Stage 1

Reps : 1

95:00

10:00

Stage 2

Reps: 40

95:00

00:15

↓

Add step

↓

60

1:00

✓ Sample volume :25

↓

Start seçilerek cihaz çalıştırıldı.

- PCR tamamlandıktan sonra sonuçlar kaydedildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Projenin İlk 3 ayı:

Deneylerin planı

Malzeme temini

Kan örneklerinin toplanması

3-6 aylık dönem:

RNA izolasyonu

cDNA çevrim

RT-PCR

6-9 aylık dönem:

Veri analizi

Yazma

Literatür güncelleme

9-12 aylık dönem:

Yayına dönüştürme, sunma

Bitirme raporu

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Dokuz hasta grubundan elde edilen periferik kandan beyaz kan hücrelerinin gen ekspresyonuna göre her koşulun ekspresyonunun artışı ya da azalışı kat değişimleri (fold change) hesaplanmıştır. Bu analizler SA Bioscience'in data analysis expression sayfasında yapılmıştır. Bu sitenin kullanımı ücretsizdir. Heat map ve clustergramlar ile gen ekspresyon analizleri desteklenmiştir. T test tabanlı p değerli bu sitede değerlendirilmiştir. SA Bioscience'in data analysis expression (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) sayfasında yer alan 2' Average delta CT değerleri kullanılarak SPSS'de (15.0 SPSS Programı) Mann-Whitney test yapıldı. Δ CT değerleri için cut-of olarak 40 alındı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Olgu sayısı az olduğu için randomizasyona gerek olmadığı düşünülerek hastalar kontrole gelen olgu sırası ile alınmıştır. Özel bir seçim yapılmamıştır. Alt grup analizlerinin yapılabilmesi için gruplara düşen olgu sayısının az olması bu çalışmanın kısıtlılıklarından olup olgu sayısının artırılarak çalışmanın genişletilmesi ve verilerin tekrar değerlendirilmesi uygun olacaktır.

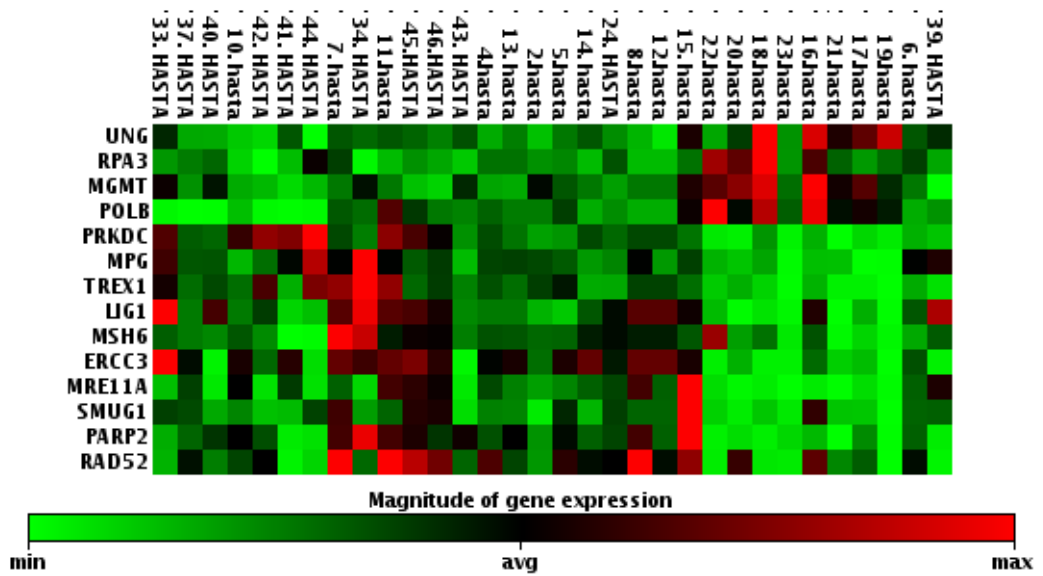
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma; 11.08.2011 tarihli 2011/27-06 karar numarasına sahip, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Raporu ile yürütülerek hasta ve sağlıklı kişilerden onam formu imzalatılarak örnekler toplanmıştır.

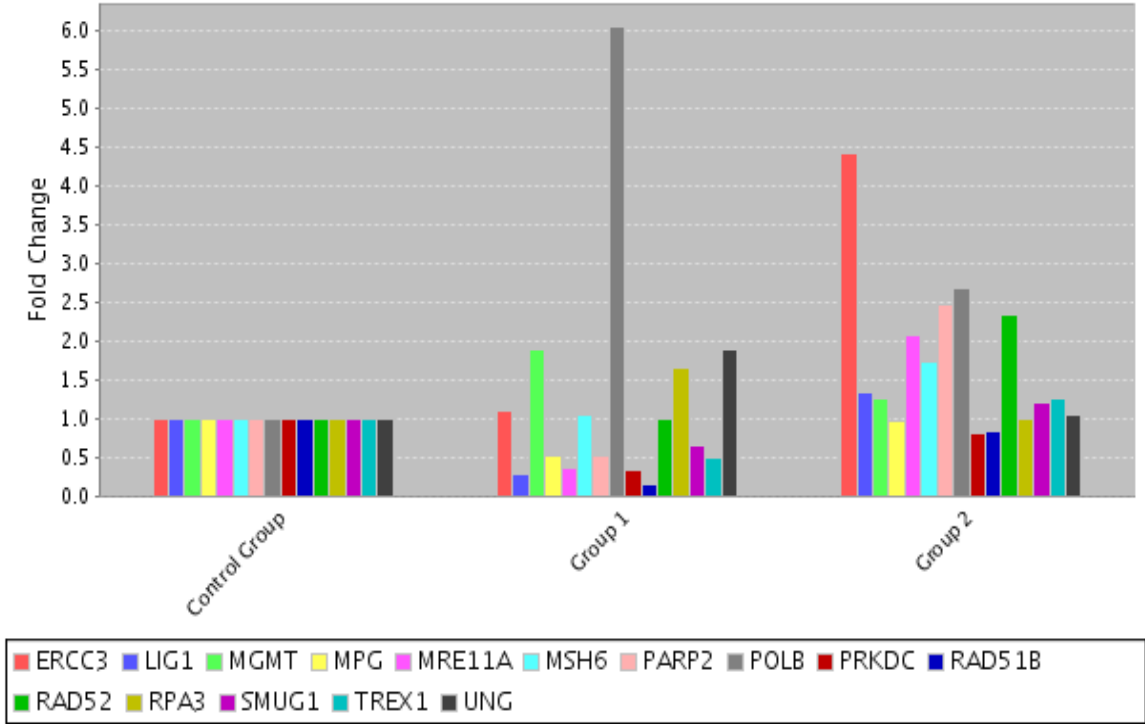
4.0. BULGULAR

Nörofibromu olan NF1 hastaları ile nörofibromu olmayan NF1 hastaları karşılaştırıldığında; nörofibromu olan Nörofibromatozis tip 1 hastaları POLB ekspresyonu artmış iken; ERCC3, LIG1, MGMT, MRE11A, MPG, MSH6, PARP2, PRKDC, RAD51B, RAD52, RPA3, SMUG1, TREX1, UNG ekspresyonu azalmıştır ($p<0.05$, T test). Bu değerlendirme için optik gliomlu, meme kanserli ve rabdomiyosarkomlu hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Resim 1. Nörofibromu olan NF1 hastaları ile nörofibromu olmayan NF1 hastalarının karşılaştırılması

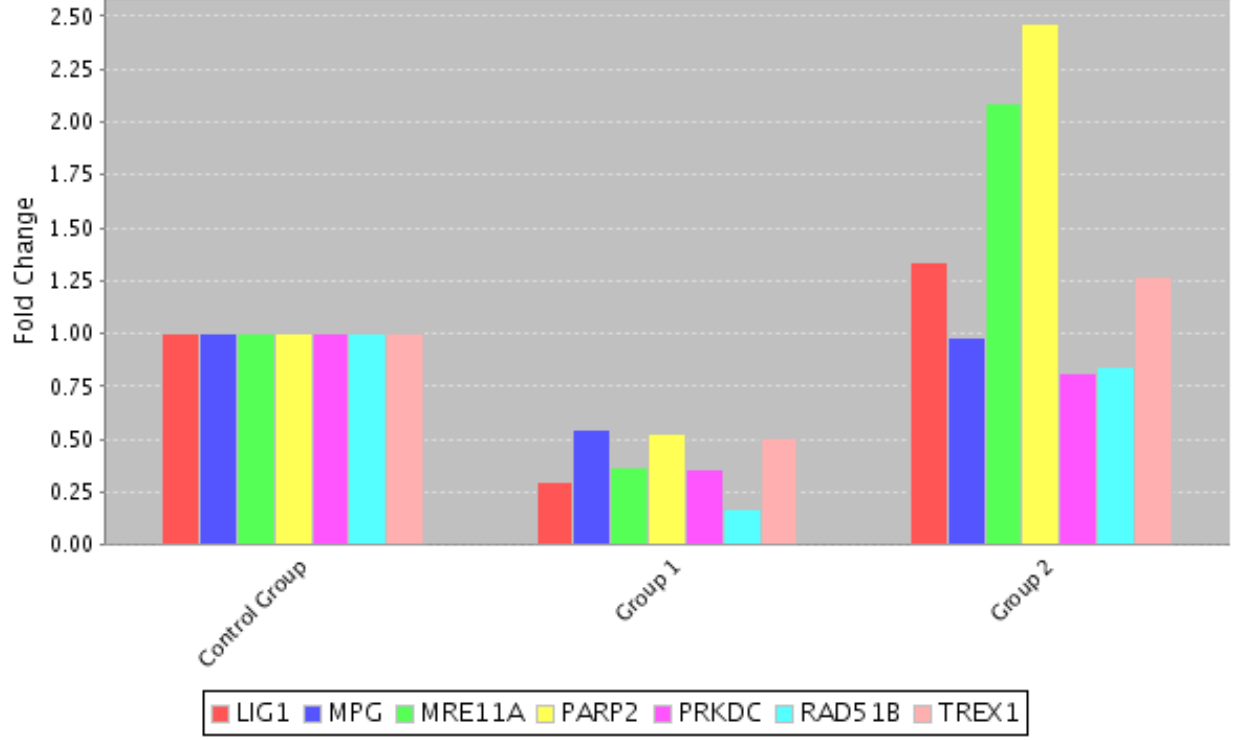


Resim 2. Nörofibrom varlığında ekspresyonu değişen genler



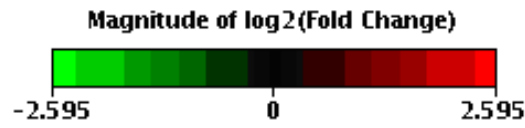
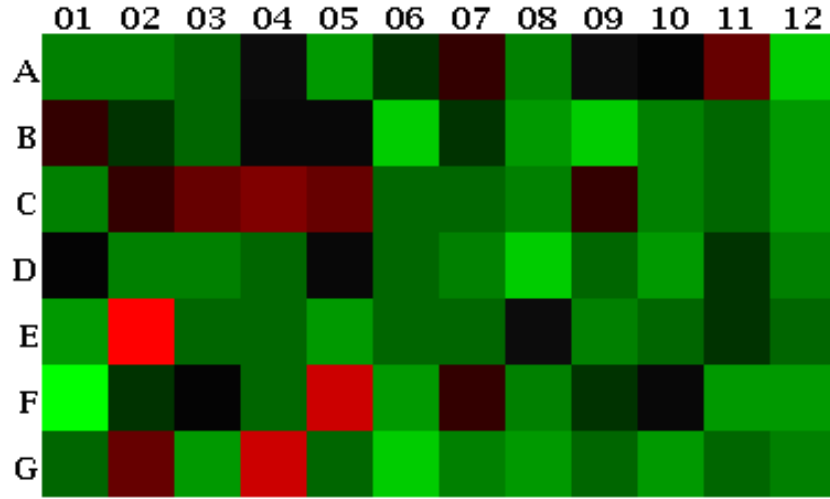
LIG1, MPG, MRE11A, PARP2, PRKDC, RAD51B, TREX1 genlerinin ekspresyonunda meydana gelen yarıdan fazla azalmalar nörofibrom varlığı ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, T test).

Resim 3. Nörofibrom varlığında ekspresyonu azalan genler



Resim 4. Nörofibromları olan hastalar ile kontrol grubunu *heat map* analizi

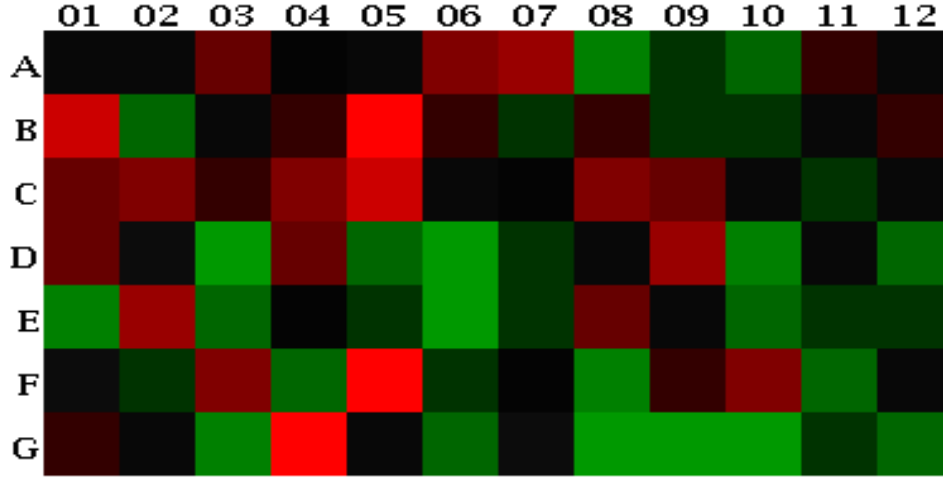
Visualization of log₂(Fold Change)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APEX1 -2.36 B	APEX2 -2.28 B	ATM -1.97 B	ATR -1.21 B	ATXN3 -3.41 B	BRCA1 -1.32 B	BRCA2 1.30 B	BRIP1 -2.25 B	CCNH -1.23 B	CCNO 1.03 A	CDK7 2.08 B	DDB1 -4.16 B
B	DDB2 1.43 B	DMC1 -1.54 B	ERCC1 -2.06 B	ERCC2 -1.15 B	ERCC3 1.12 B	ERCC4 -3.97 B	ERCC5 -1.37 B	ERCC6 -2.93 B	ERCC8 -4.38 OKAY	EXO1 -2.29 B	FEN1 -1.83 B	LIG1 -3.35 B
C	LIG3 -2.62 B	LIG4 1.62 B	MGMT 1.90 OKAY	MLH1 2.65 B	MLH3 1.88 B	MMS19 -1.91 B	MPG -1.84 OKAY	MRE11A -2.69 B	MSH2 1.48 B	MSH3 -2.22 B	MSH4 -1.94 B	MSH5 -3.39 B
D	MSH6 1.05 B	MUTYH -2.19 B	NEIL1 -2.62 B	NEIL2 -1.80 B	NEIL3 -1.15 B	NTHL1 -1.92 B	OGG1 -2.76 B	PARP1 -4.18 B	PARP2 -1.90 B	PARP3 -3.16 B	PMS1 -1.70 B	PMS2 -2.36 OKAY
E	PNKP -2.91 B	POLB 6.04 OKAY	POLD3 -1.79 B	POLL -1.83 B	PRKDC -2.80 OKAY	RAD18 -1.96 B	RAD21 -1.89 B	RAD23A -1.21 B	RAD23B -2.39 B	RAD50 -2.13 B	RAD51 -1.65 B	RAD51C -1.92 OKAY
F	RAD51B -5.86 OKAY	RAD51D -1.68 B	RAD52 1.01 B	RAD54L -1.86 B	RFC1 4.13 OKAY	RPA1 -3.03 B	RPA3 1.67 B	SLK -2.55 B	SMUG1 -1.53 B	TDG 1.12 B	TOP3A -3.17 B	TOP3B -3.03 OKAY
G	TREX1 -1.99 B	UNG 1.91 OKAY	XAB2 -3.08 OKAY	XPA 3.70 B	XPC -1.81 B	XRCC1 -3.54 B	XRCC2 -2.26 B	XRCC3 -3.28 B	XRCC4 -2.09 B	XRCC5 -3.16 OKAY	XRCC6 -1.95 B	XRCC6BP1 -2.44 OKAY

Resim 5. Nörofibromları olmayan NF1 hastaları ile kontrol grubu ile *heat map* te analizi

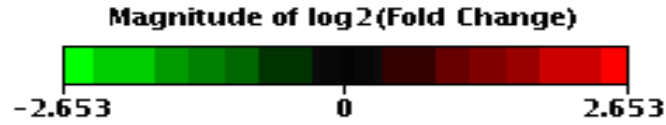
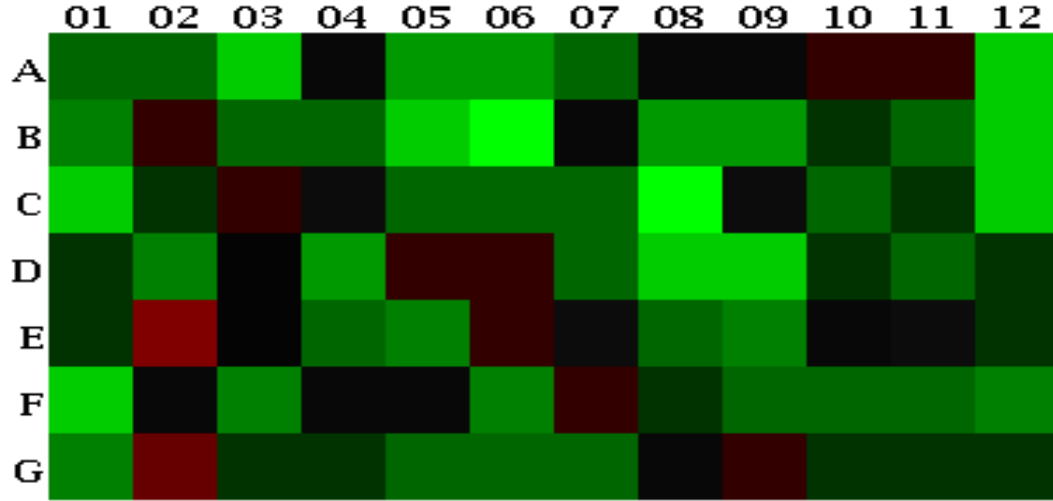
Visualization of log₂(Fold Change)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APEX1 -1.11 A	APEX2 -1.05 B	ATM 1.89 A	ATR -1.04 B	ATXN3 -1.14 B	BRCA1 2.19 B	BRCA2 2.47 B	BRIP1 -2.10 B	CCNH -1.42 A	CCNO -1.68 A	CDK7 1.56 B	DDB1 1.12 A
B	DDB2 3.32 B	DMC1 -1.95 B	ERCC1 -1.11 B	ERCC2 1.59 B	ERCC3 4.43 OKAY	ERCC4 1.59 B	ERCC5 -1.26 A	ERCC6 1.21 B	ERCC8 -1.45 B	EXO1 -1.57 B	FEN1 1.05 B	LIG1 1.34 B
C	LIG3 1.83 B	LIG4 2.32 B	MGMT 1.27 A	MLH1 2.17 B	MLH3 3.97 OKAY	MMS19 1.06 B	MPG -1.01 B	MRE11A 2.09 B	MSH2 1.82 B	MSH3 -1.08 B	MSH4 -1.30 B	MSH5 1.12 B
D	MSH6 1.74 A	MUTYH 1.17 B	NEIL1 -2.74 B	NEIL2 1.63 B	NEIL3 -1.65 OKAY	NTHL1 -2.67 B	OGG1 -1.25 B	PARP1 -1.09 B	PARP2 2.46 B	PARP3 -2.04 OKAY	PMS1 1.06 B	PMS2 -1.67 B
E	PNKP -2.16 A	POLB 2.70 B	POLD3 -1.76 B	POLL -1.02 B	PRKDC -1.22 A	RAD18 -2.49 A	RAD21 -1.58 A	RAD23A 1.67 A	RAD23B -1.05 A	RAD50 -1.89 B	RAD51 -1.40 B	RAD51C -1.52 OKAY
F	RAD51B -1.18 B	RAD51D -1.50 B	RAD52 2.35 B	RAD54L -1.76 B	RFC1 4.61 OKAY	RPA1 -1.24 A	RPA3 -1.00 B	SLK -1.98 A	SMUG1 1.22 B	TDG 2.22 A	TOP3A -1.79 B	TOP3B -1.07 B
G	TREX1 1.27 A	UNG 1.06 B	XAB2 -2.22 A	XPA 4.68 A	XPC 1.11 A	XRCC1 -1.71 B	XRCC2 -1.17 B	XRCC3 -2.86 OKAY	XRCC4 -2.69 B	XRCC5 -2.44 OKAY	XRCC6 -1.47 A	XRCC6BP1 -1.94 B

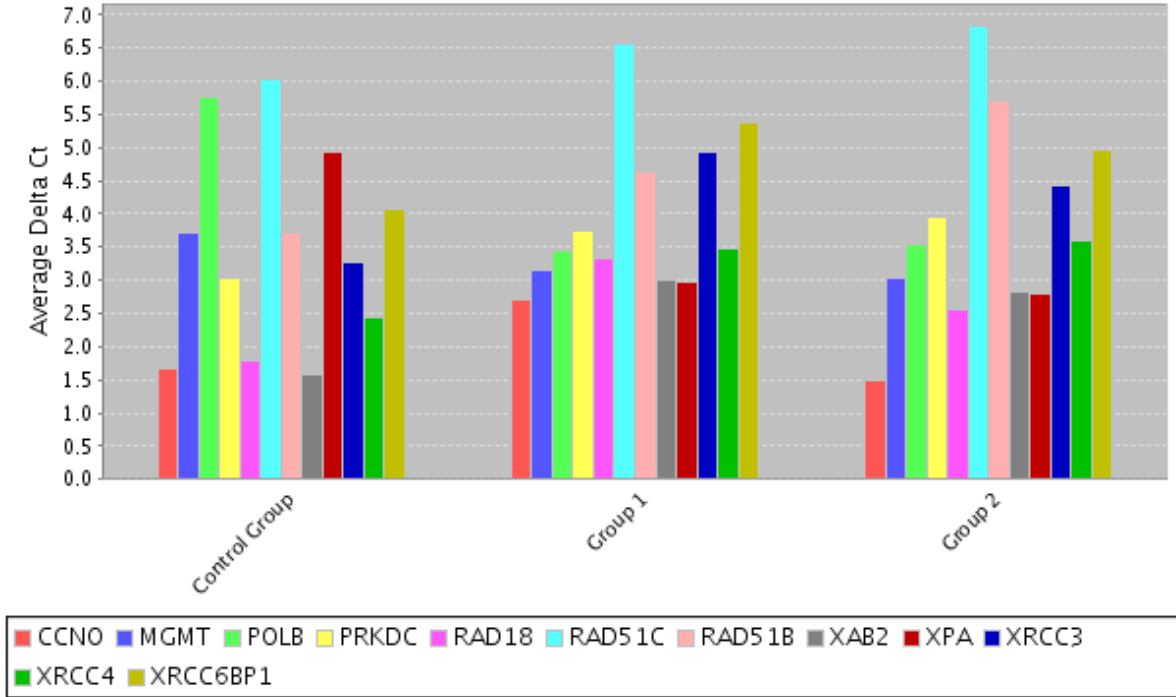
Resim 6. Nörofibromlu hastalar nörofibromsuz hastalarla *heat map* analizi

Visualization of $\log_2(\text{Fold Change})$



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APEX1 -2.13 A	APEX2 -2.18 B	ATM -3.71 A	ATR -1.17 B	ATXN3 -3.00 B	BRCA1 -2.90 B	BRCA2 -1.89 B	BRIP1 -1.07 B	CCNH 1.16 A	CCNO 1.72 OKAY	CDK7 1.33 B	DDB1 -4.67 A
B	DDB2 -2.32 B	DMC1 1.26 B	ERCC1 -1.85 B	ERCC2 -1.82 B	ERCC3 -3.95 OKAY	ERCC4 -6.29 B	ERCC5 -1.08 A	ERCC6 -3.54 B	ERCC8 -3.02 B	EXO1 -1.46 B	FEN1 -1.92 B	LIG1 -4.48 OKAY
C	LIG3 -4.80 B	LIG4 -1.43 B	MGMT 1.49 A	MLH1 1.22 B	MLH3 -2.11 B	MMS19 -2.03 B	MPG -1.81 OKAY	MRE11A -5.60 OKAY	MSH2 -1.23 B	MSH3 -2.06 B	MSH4 -1.49 B	MSH5 -3.79 B
D	MSH6 -1.66 A	MUTYH -2.56 B	NEIL1 1.05 B	NEIL2 -2.92 B	NEIL3 1.43 B	NTHL1 1.39 B	OGG1 -2.21 B	PARP1 -3.83 B	PARP2 -4.69 OKAY	PARP3 -1.55 B	PMS1 -1.79 B	PMS2 -1.41 B
E	PNKP -1.34 A	POLB 2.24 OKAY	POLD3 -1.02 B	POLL -1.80 B	PRKDC -2.29 A	RAD18 1.27 A	RAD21 -1.19 A	RAD23A -2.02 A	RAD23B -2.28 A	RAD50 -1.13 B	RAD51 -1.18 B	RAD51C -1.26 B
F	RAD51B -4.96 OKAY	RAD51D -1.12 B	RAD52 -2.33 OKAY	RAD54L -1.06 B	RFC1 -1.12 B	RPA1 -2.44 A	RPA3 1.67 OKAY	SLK -1.29 A	SMUG1 -1.86 B	TDG -1.97 A	TOP3A -1.78 B	TOP3B -2.82 B
G	TREX1 -2.52 A	UNG 1.80 OKAY	XAB2 -1.38 A	XPA -1.26 A	XPC -2.01 A	XRCC1 -2.08 B	XRCC2 -1.94 B	XRCC3 -1.15 B	XRCC4 1.29 B	XRCC5 -1.29 OKAY	XRCC6 -1.33 A	XRCC6BP1 -1.26 B

Resim 7. Ailesel NF1 hastaları ile ailede NF1 hastası olmayan grupların karşılaştırılması



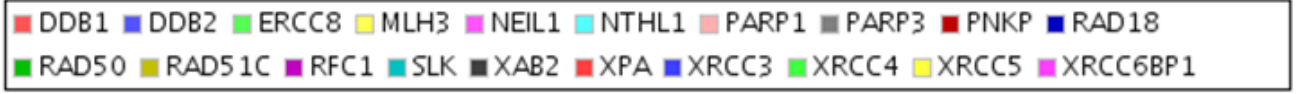
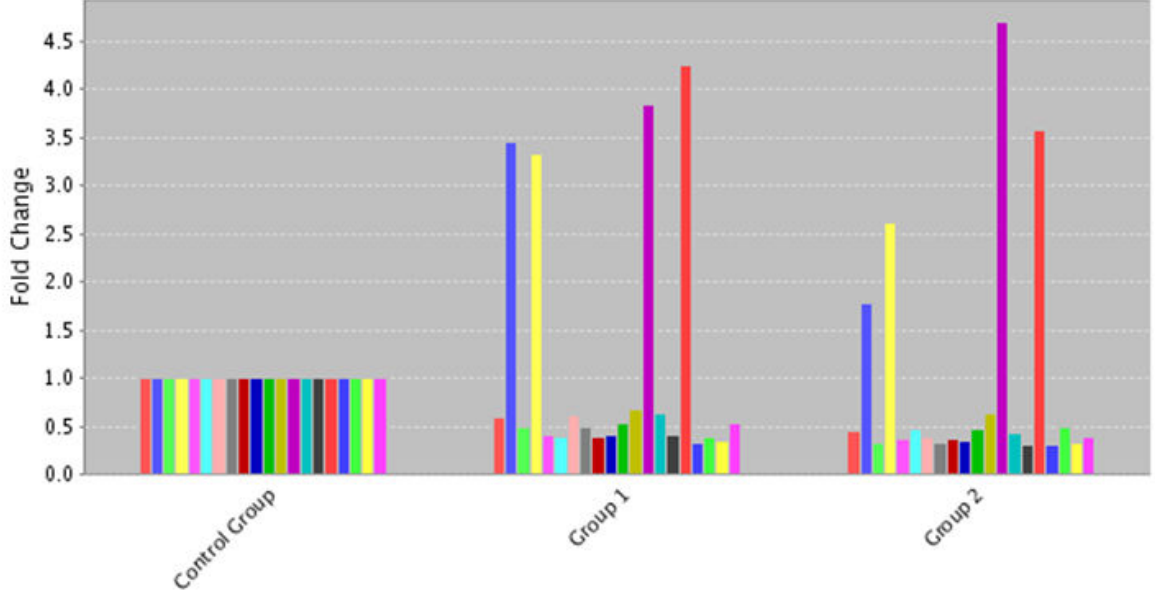
RAD18 ailesel NF 1 varlığında ekspresyonu azalmış ve istatistiksel olarak önemlidir.

Optik glioma sahip NF1 hastaları, optik gliomsuz hastalarla karşılaştırıldığında BRCA2, MLH3, MSH3, RAD23A, XPA genlerinin ekspresyonunda artış gözlenmiştir.

Hamartomatöz lezyona sahip NF1 hastaları ile hamartomatöz lezyonu bulunmayan NF1 hastaları karşılaştırıldığında; hamartomatöz lezyonlu grupta, DDB1, DDB2, ERCC8, MLH3, NTHL1, PARP1, PARP3, PNKP, RAD18, RAD50, RAD51C, RFC1, SLK, TOP3A, XAB2, XPA, XRCC1, XRCC3, XRCC4, XRCC5 genlerinin ekspresyonlarında değişiklik gözlenmiştir.

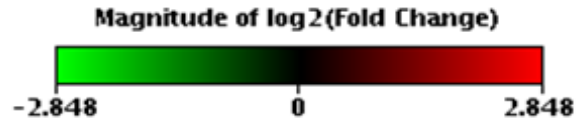
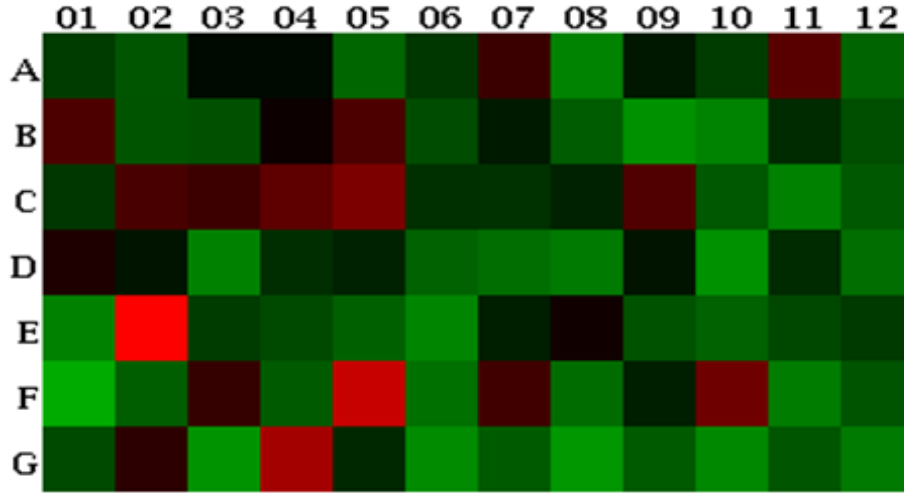
Burada 4 genin (DDB2, MLH3, RFC1, XPA) ekspresyonunun kontrol grubuna göre her iki grupta artışı bulunmuştur.

Resim 8. DDB2, MLH3, RFC1, XPA gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre iki grupta artışı



Resim 9. Hamartamatöz lezyon yok vs Kontrol Fold Change Analizi

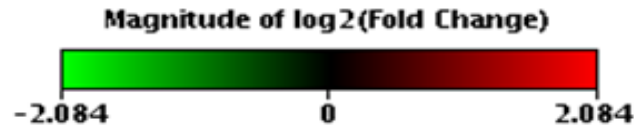
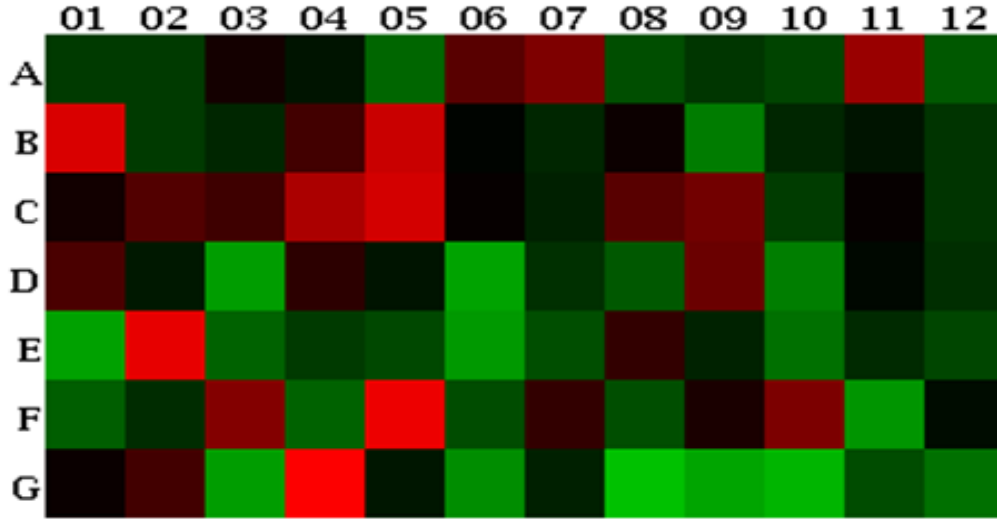
Visualization of log₂(Fold Change)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APEX1 -1.58 A	APEX2 -1.94 B	ATM -1.08 B	ATR -1.08 B	ATXN3 -2.21 B	BRCA1 -1.52 B	BRCA2 1.57 B	BRIP1 -2.78 B	CCNH -1.21 B	CCNO -1.59 B	CDK7 1.99 B	DDB1 -2.18 B
B	DDB2 1.79 B	DMC1 -1.91 B	ERCC1 -1.86 B	ERCC2 1.10 B	ERCC3 1.81 B	ERCC4 -1.81 B	ERCC5 -1.23 B	ERCC6 -2.04 B	ERCC8 -3.09 B	EXO1 -2.77 B	FEN1 -1.38 B	LIG1 -1.84 B
C	LIG3 -1.51 B	LIG4 1.74 B	MGMT 1.60 B	MLH1 2.08 B	MLH3 2.62 B	MMS19 -1.46 B	MPG -1.48 B	MRE11A -1.29 B	MSH2 1.85 B	MSH3 -1.98 B	MSH4 -2.74 B	MSH5 -1.97 B
D	MSH6 1.26 B	MUTYH -1.16 B	NEIL1 -2.72 B	NEIL2 -1.42 B	NEIL3 -1.31 B	NTHL1 -2.12 B	OGG1 -2.33 B	PARP1 -2.57 B	PARP2 -1.17 B	PARP3 -3.10 B	PMS1 -1.39 B	PMS2 -2.34 B
E	PNKP -2.74 B	POLB 7.20 B	POLD3 -1.60 B	POLL -1.76 B	PRKDC -2.11 B	RAD18 -2.81 OKAY	RAD21 -1.27 A	RAD23A 1.13 B	RAD23B -1.90 B	RAD50 -2.13 B	RAD51 -1.75 B	RAD51C -1.57 B
F	RAD51B -3.79 B	RAD51D -2.06 B	RAD52 1.50 B	RAD54L -2.01 B	RFC1 4.70 B	RPA1 -2.39 B	RPA3 1.65 B	SLK -2.31 B	SMUG1 -1.26 B	TDG 2.33 B	TOP3A -2.60 B	TOP3B -1.91 B
G	TREX1 -1.78 B	UNG 1.41 B	XAB2 -3.12 OKAY	XPA 3.58 B	XPC -1.37 B	XRCC1 -2.97 B	XRCC2 -2.01 B	XRCC3 -3.22 B	XRCC4 -2.01 B	XRCC5 -2.93 OKAY	XRCC6 -1.94 B	XRCC6BP1 -2.58 OKAY

Resim 10. Hamartomatöz lezyon var vs Kontrol Fold Change Analizi

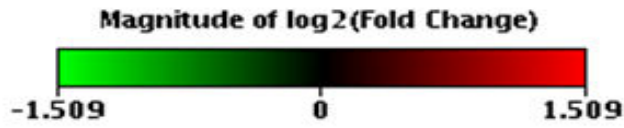
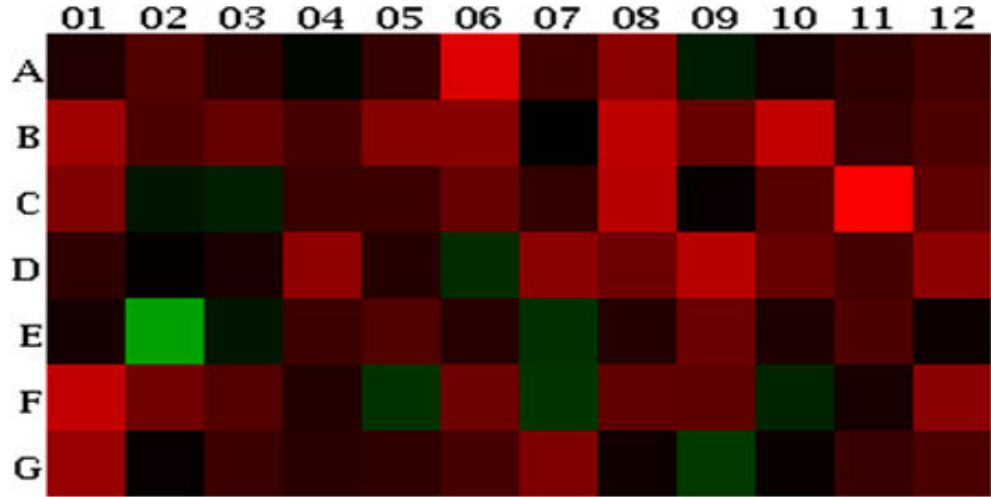
Visualization of log₂(Fold Change)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APEX1 -1.39 A	APEX2 -1.39 B	ATM 1.13 B	ATR -1.11 B	ATXN3 -1.79 B	BRCA1 1.64 B	BRCA2 2.04 B	BRIP1 -1.56 B	CCNH -1.36 A	CCNO -1.47 A	CDK7 2.39 B	DDB1 -1.66 A
	DDB2 3.45 OKAY	DMC1 -1.39 B	ERCC1 -1.24 B	ERCC2 1.46 B	ERCC3 3.16 B	ERCC4 -1.03 B	ERCC5 -1.24 A	ERCC6 1.07 B	ERCC8 -2.03 OKAY	EXO1 -1.24 B	FEN1 -1.12 B	LIG1 -1.34 B
C	LIG3 1.11 B	LIG4 1.59 B	MGMT 1.42 A	MLH1 2.65 B	MLH3 3.33 OKAY	MMS19 1.04 B	MPG -1.20 B	MRE11A 1.64 B	MSH2 1.91 B	MSH3 -1.40 B	MSH4 1.04 B	MSH5 -1.34 B
	MSH6 1.52 B	MUTYH -1.14 B	NEIL1 -2.45 OKAY	NEIL2 1.28 B	NEIL3 -1.12 B	NTHL1 -2.54 OKAY	OGG1 -1.31 B	PARP1 -1.64 OKAY	PARP2 1.82 B	PARP3 -2.04 OKAY	PMS1 -1.05 B	PMS2 -1.30 B
E	PNKP -2.51 A	POLB 3.70 B	POLD3 -1.75 B	POLL -1.38 B	PRKDC -1.51 B	RAD18 -2.39 A	RAD21 -1.55 A	RAD23A 1.33 A	RAD23B -1.22 A	RAD50 -1.89 OKAY	RAD51 -1.27 B	RAD51C -1.48 OKAY
	RAD51B -1.70 B	RAD51D -1.28 B	RAD52 2.12 B	RAD54L -1.75 B	RFC1 3.83 OKAY	RPA1 -1.53 A	RPA3 1.33 B	SLK -1.55 A	SMUG1 1.16 B	TDG 2.01 B	TOP3A -2.35 OKAY	TOP3B -1.07 B
F	TREX1 1.05 B	UNG 1.45 B	XAB2 -2.46 A	XPA 4.24 A	XPC -1.13 B	XRCC1 -2.22 OKAY	XRCC2 -1.20 B	XRCC3 -3.01 OKAY	XRCC4 -2.56 OKAY	XRCC5 -2.80 OKAY	XRCC6 -1.54 A	XRCC6BP1 -1.88 B

Resim 11. Hamartamatöz lezyon var vs Hamartamatöz lezyon yok Fold Change Analizi

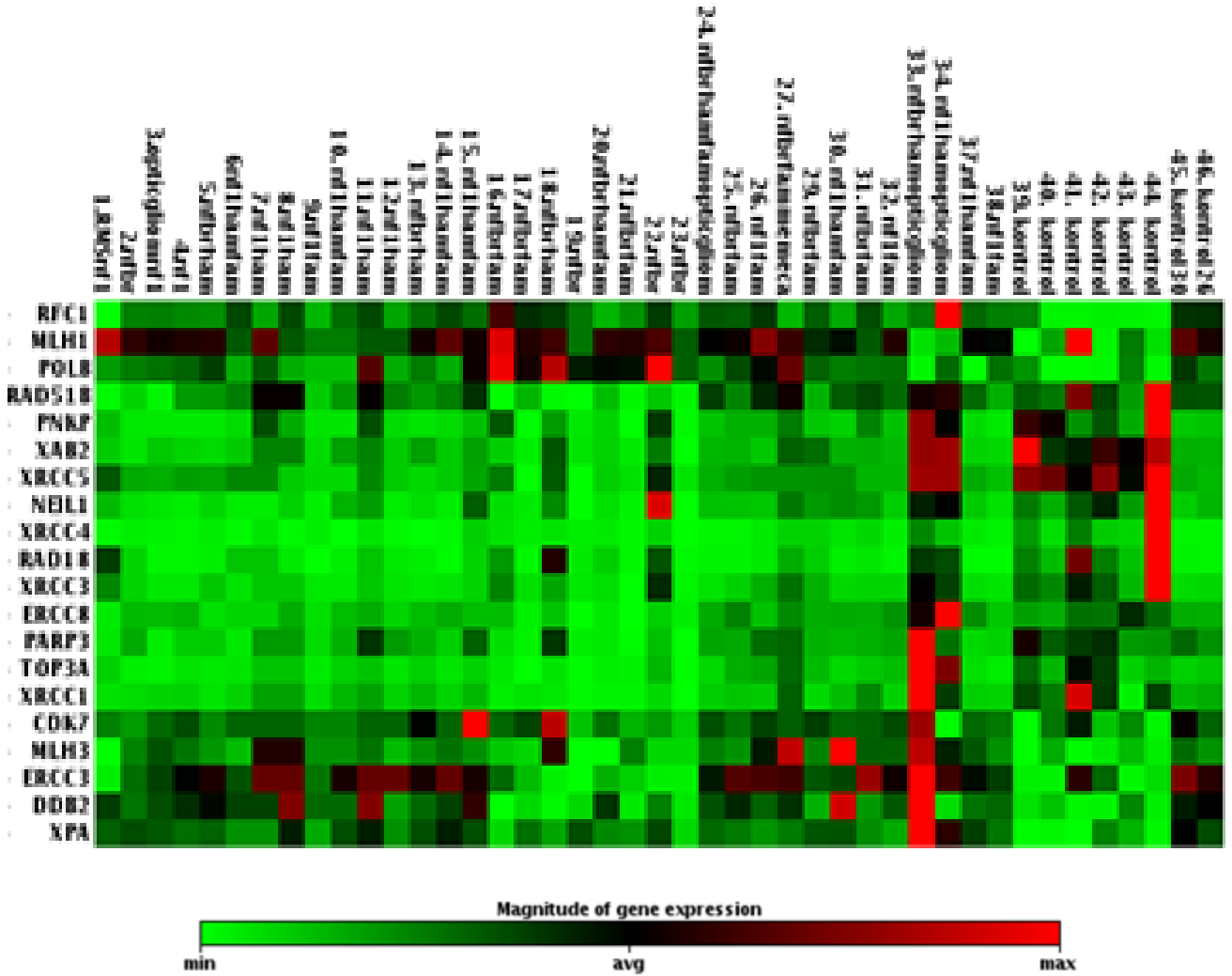
Visualization of log₂(Fold Change)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APEX1 1.14 OKAY	APEX2 1.39 B	ATM 1.21 B	ATR -1.03 B	ATXN3 1.24 B	BRCA1 2.48 B	BRCA2 1.30 B	BRIP1 1.78 B	CCNH -1.12 A	CCNO 1.08 A	CDK7 1.20 B	DDB1 1.31 A
B	DDB2 1.93 B	DMC1 1.37 B	ERCC1 1.51 B	ERCC2 1.33 B	ERCC3 1.74 B	ERCC4 1.77 B	ERCC5 -1.01 A	ERCC6 2.17 B	ERCC8 1.52 B	EXO1 2.23 B	FEN1 1.23 B	LIG1 1.37 B
C	LIG3 1.68 B	LIG4 -1.09 B	MGMT -1.13 A	MLH1 1.27 B	MLH3 1.27 B	MMS19 1.51 B	MPG 1.23 B	MRE11A 2.12 B	MSH2 1.03 B	MSH3 1.42 B	MSH4 2.85 B	MSH5 1.47 B
D	MSH6 1.20 B	MUTYH 1.02 B	NEIL1 1.11 B	NEIL2 1.82 B	NEIL3 1.17 B	NTHL1 -1.20 B	OGG1 1.78 B	PARP1 1.57 B	PARP2 2.14 B	PARP3 1.52 B	PMS1 1.33 B	PMS2 1.79 B
E	PNKP 1.09 A	POLB -1.94 B	POLD3 -1.09 B	POLL 1.28 B	PRKDC 1.40 B	RAD18 1.18 A	RAD21 -1.22 OKAY	RAD23A 1.17 A	RAD23B 1.56 A	RAD50 1.13 B	RAD51 1.38 B	RAD51C 1.06 B
F	RAD51B 2.23 B	RAD51D 1.60 B	RAD52 1.41 B	RAD54L 1.15 B	RFC1 -1.23 B	RPA1 1.57 A	RPA3 -1.24 B	SLK 1.48 A	SMUG1 1.47 B	TDG -1.16 B	TOP3A 1.11 B	TOP3B 1.77 B
G	TREX1 1.88 B	UNG 1.03 B	XAB2 1.27 A	XPA 1.18 A	XPC 1.21 B	XRCC1 1.34 B	XRCC2 1.68 B	XRCC3 1.07 B	XRCC4 -1.27 B	XRCC5 1.05 OKAY	XRCC6 1.26 A	XRCC6BP1 1.37 B

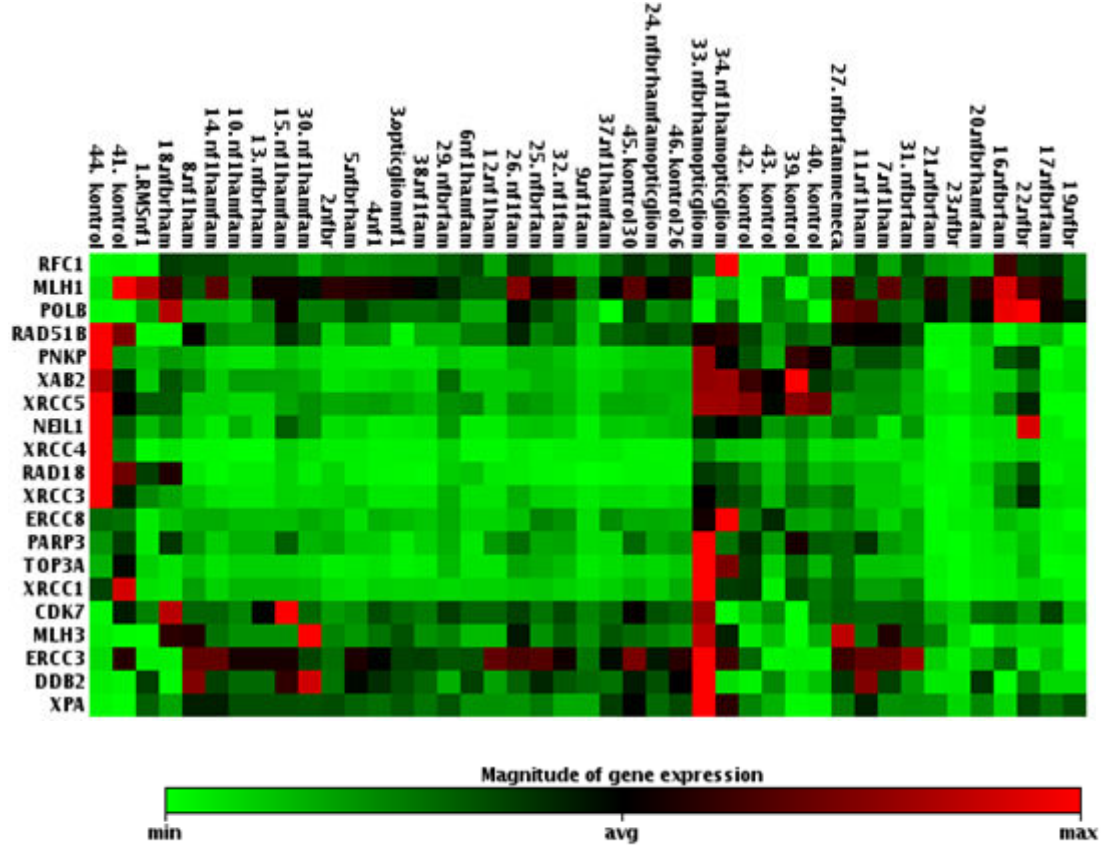
NF1 hastalığına sahip bütün olgular ile hiçbir hastalığı olmayan kontrol grubu karşılaştırıldığında; CDK7, DDB2, ERCC3, MLH1, MLH3, POLB, RFC1, XPA genlerinin ekspresyonunda artış gözlenirken; ERCC8, NEIL1, PARP3, PNKP, RAD18, RAD51B, TOP3A, XAB2, XRCC1, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6BP1 genlerinin ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Bunlardan PNKP, RAD18, XAB2, XRCC3, XRCC4, XRCC5 genlerinde meydana gelen değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$ T test).

Resim 12. P ye göre tüm olgular NF1 var vs NF1 yok Clustergram Analizi

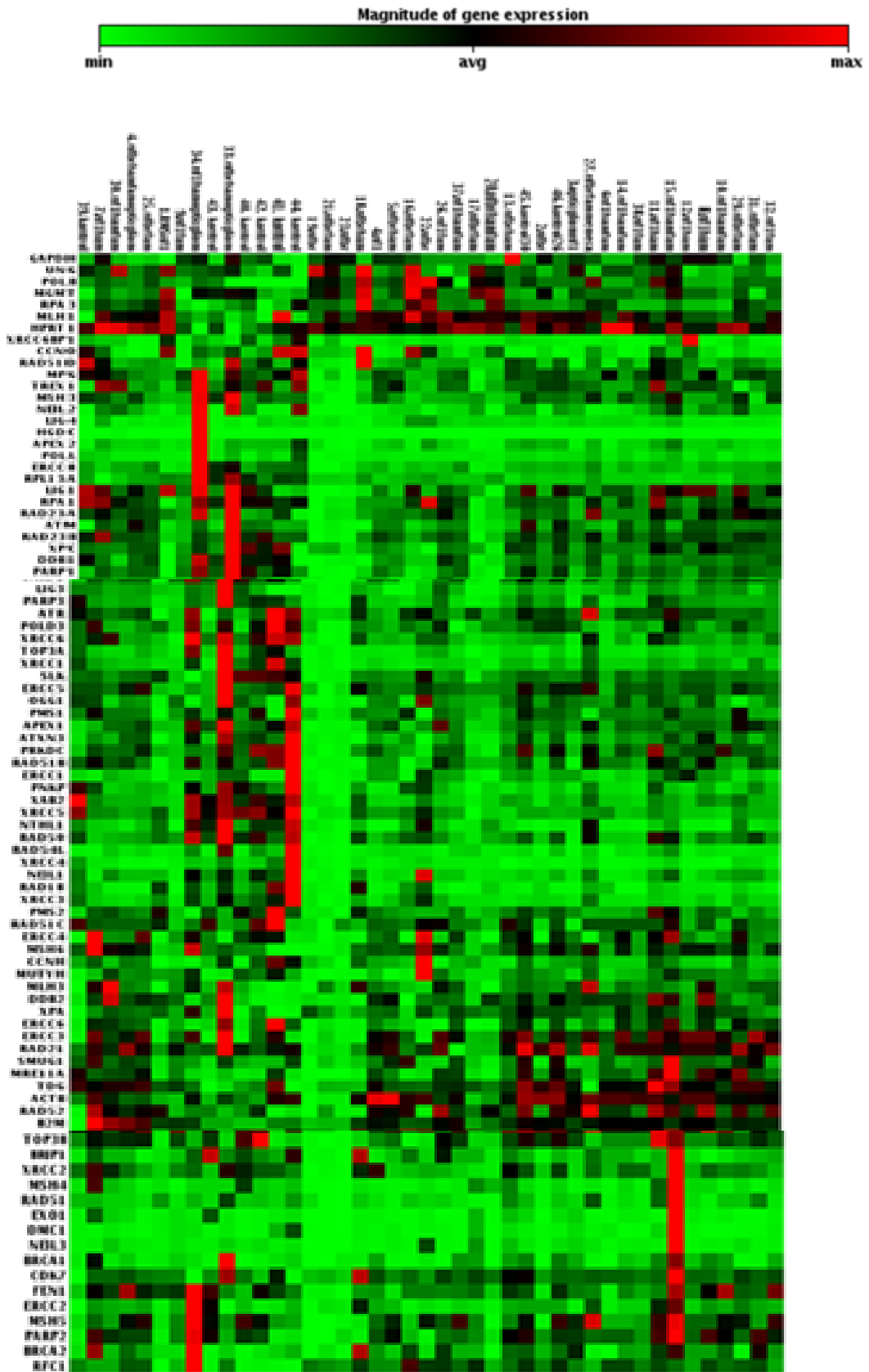


Fold change e göre anlamlı çıkan genler ile *clustergram* analizi;

Resim 13. NF1 hastaları vs Kontrol *clustergram* analizi

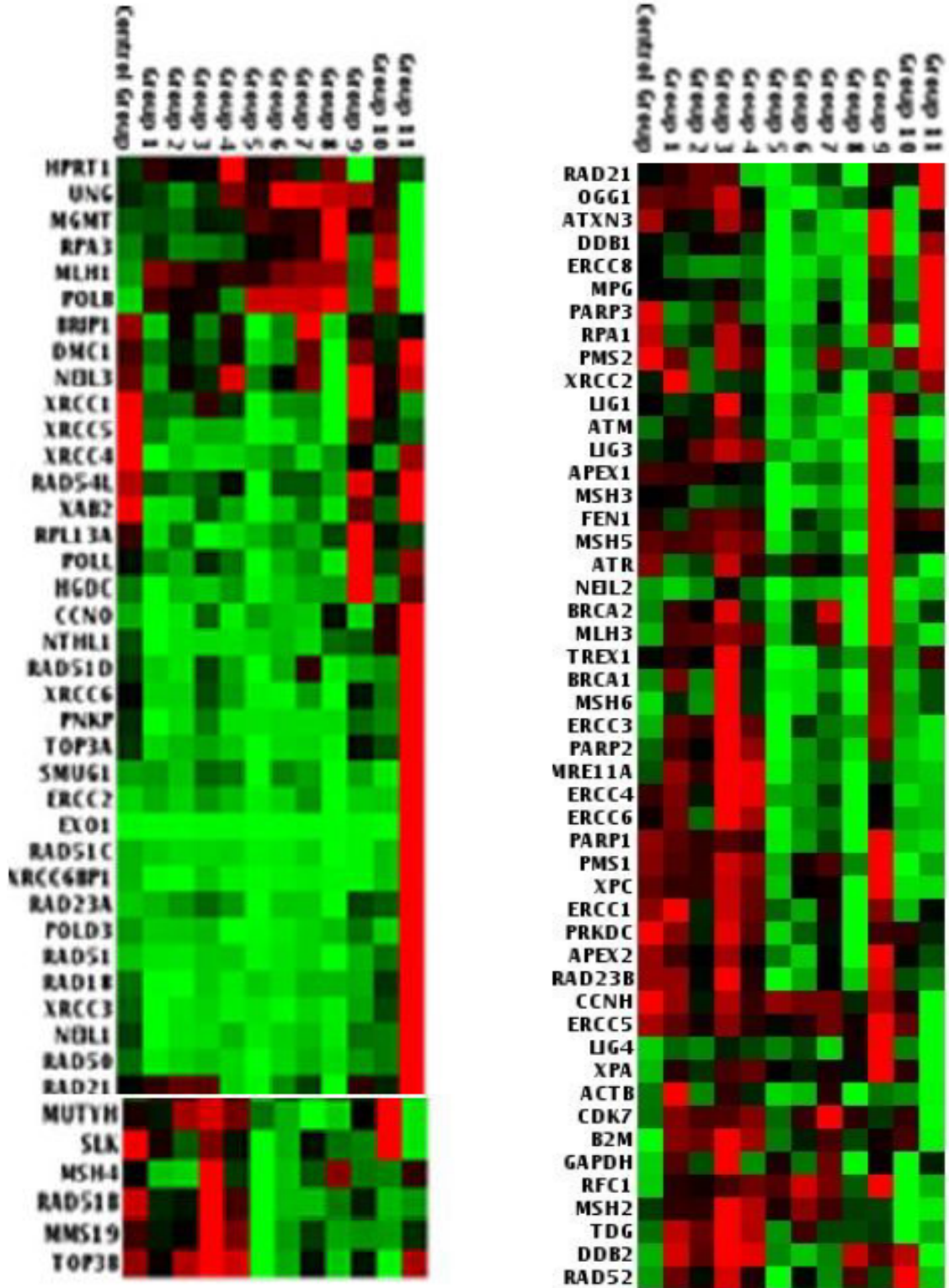


Resim 14. Tüm grup NF1 var vs NF1 yok *cluster gram* analizi



Cluster gram da değişik genlerde gruplara göre farklı sınıflamaların olduğu saptandı. Yapılmış olan 11 alt gruplu sınıflamada (NF1, NF1+ailesel, NF1+hamartomatöz, NF1+hamartomatöz+ailesel, NF1+nörofibrom, NF1+nörofibrom+ailesel, NF1+nörofibrom+hamartomatöz, NF1+nörofibrom+ailesel+hamartomatöz, NF1+optikgliom, NF1+RMS/meme kanseri, NF1 olmayan RMS) nörofibrom varlığı ya da yokluğunun gen ekspresyon değişikliklerinde hamartomatöz lezyona sahip olma ya da ailesel olup olmama kriterlerinden çok daha önemli olduğu saptanmış ve Şekilde gösterilmiştir:

Resim 15. 11 alt grubun *clustergram* analizi



NF1 hastalığına sahip RMS ya da meme kanserine sahip hastalar ile NF1 olmayan RMS olguları arasında oldukça fazla farklanmalar gözlenmiştir. RMS ve meme kanseri gelişen NF1'li 2 olgu ile NF1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında; ATM, CDK7, DDB2, ERCC5, LIG3, MLH1, MUTYH, POLB, RAD52, RPA3, SLK, XPA gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. BRCA1, BRCA2, ERCC2, ERCC8, MPG, NEIL2, NTHL1, PMS1, RAD50, XAB2, XRCC3, XRCC6 genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

NF1'li meme kanseri gelişen olguda kansersiz NF1 olgularına göre ATR, CCNO, MLH1, NEIL1, NTHL1, RAD18, RAD 51, XRCC1, XRCC3 genlerinin ekspresyonunda artış gözlenirken, ATM, BRCA1, BRCA2, ERCC4, EXO1, FEN1, LIG1, LIG3, MPG, MRE11A, MSH2, NEIL2, PMS1, POLD3, RFC1, SMUG1, TDG, TOP3B genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

NF 1'li RMS olgusu ve meme kanseri ile NF1' siz RMS olguları karşılaştırıldığında DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG, XPA genlerinin ekspresyonunda 10 kattan fazla artış gözlenmiştir.

Malign tümör olgularında NF1' li ya da NF1' siz gruplar karşılaştırıldığında gen ekspresyonunda katlanma değişiklikleri vardır. DDB2, MGMT, MLH1, POLB UNG, XPA ekspresyonları artmıştır.

Çalıştığımız 84 gende ERCC1(p:0,015) ve TREX1(p:0,026) genleri ebeveynlerde çocuklara göre istatistiksel anlamlı olarak ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Mann-Whitney Test).

- TREX1: çocuk : 0,142 \mp 0,108(0,078 - 0,346)
- TREX1: ebeveyn: 0,062 \mp 0,026(0,015 - 0,090)
- ERCC1: çocuk : 0,069 \mp 0,065(0,020 - 0,197)
- ERCC1: ebeveyn: 0,021 \mp 0,006(0,016 - 0,032)

5.0.TARTIŞMA

Bu çalışmada amaç; NF1 hastalığının bireyden bireye, aileden aileye farklı klinik gidişatını; yani farklı fenotip ekspresyon göstermesindeki genetik nedeni sorgulamaktır. Bu doğrultuda NF1 hastalarındaki klinik çeşitliliğinin genetik nedenini sorgularken, DNA tamir genlerindeki ekspresyon artış ve azalışları farklı alt gruplar oluşturularak değerlendirildi. Buradaki amaç; kanserin DNA onarımında meydana gelen hatalardan kaynaklandığını ve eğer biz bu onarım genlerinde meydana gelen ekspresyon değişikliklerinden anlamlı sonuçlar çıkarabilirsek farklı klinik gidişatlara sahip hastalardaki bulguları öngörmek için yararlı bir çalışma yapılmış olduğu gerçeğiydi.

Genetik temelli bir hastalıkta izlemde farklı klinik gidişinin nedeninin açıklanmaya çalışılması temeline dayanan bu tez çalışmasında, öncelikle izlemde malign tümör gelişme riskini öngörücü bir ya da birkaç prediktif gen ekspresyonu saptamak hedef alınmıştı. Ancak NF1' de benign bir tümör olan nörofibrom gelişme oranı % 48 iken, malign tümör gelişen olgularımızın sayısı az olduğu için çalışmada ATM, CDK7, DDB2, ERCC5, LIG3, MLH1, MUTYH, POLB, RAD52, RPA3, SLK, XPA, BRCA1, BRCA2, ERCC2, ERCC8, MPG, NEIL2, NTHL1, PMS1, RAD50, XAB2, XRCC3, XRCC6 gen ekspresyonu NF1' de izlemde RMS gelişmesini öngörülüdür ya da meme kanserinde ise ATR, CCNO, MLH1, NEIL1, NTHL1, RAD18, RAD 51, XRCC1, XRCC3, ATM, BRCA1, BRCA2, ERCC4, EXO1, FEN1, LIG1, LIG3, MPG, MRE11A, MSH2, NEIL2, PMS1, POLD3, RFC1, SMUG1, TDG, TOP3B genlerinin ekspresyonu izlemde öngörülüdür şeklinde istatistiksel olarak p değeri ile desteklenen bir sonuca ulaşamadık. Bunun nedeni malign tümör gelişen kontrol olgu sayısındaki azlıktır. Ekonomik nedenler bunda rol oynamıştır.

NF1 hastalarında ERCC3 geninin nörofibrom oluşmasında koruyucu etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada ERCC3 geninin ekspresyonunda artış olmayan hastalarda, nörofibrom geliştiği gözlenmiştir. NF1 hastalarında POLB geninin ekspresyon artışının olduğu saptanmıştır. POLB genindeki ekspresyon artışının 2,7 nin üzerinde olduğu durumlarda POLB geni nörofibrom belirleyicisi olduğu bulunmuştur. MGMT ve UNG genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen artışın nörofibrom gelişme riskinin artmasına sebep olduğu düşünülmüştür. RAD 52

ve MSH 6 gen ekspresyonlarının fazla olduğu durumlarda ise NF1 hastalarında nörofibrom gelişmediği gözlenmiştir.

Ailede NF1 hastalığına sahip olan olgular (ailesel NF1) ile ailesinde NF1 hastalığı bulunmayan olgular arasında yapılan analizlerde; ailesel NF1 grubunda, CCNO, RAD18, XAB2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6BP1 gen ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Ailesinde NF1 hastası bulunmayan grupta ise; MGMT, POLB, PRKDC, RAD51C, RAD51B, XAP2, XPA, XRCC5 gen ekspresyonlarında değişiklik gözlenmiştir. Bu genlerden MGMT, POLB ve XPA gen ekspresyonları artarken; PRKDC, RAD51C, RAD51B, XAB2 ve XRCC5 genlerinin ekspresyonlarında azalma olmuştur. Bu analizle; XAB2 geni ile XRCC5 genleri hem ailesel hem de ailesel olmayan grupta azaldığı için bu genlerinin NF1 hastalığının herediter ya da spontan olarak gelişmesinde belirleyici olmadığı hipotezini desteklemiştir. Ekspresyon azalışı NF1 hastalığına özgü bir bulgu olabilir.

Bu genlerden RAD18 ve XAB2 genleri her iki grupta da ekspresyon değişikliğine neden olduğu için hamartomatöz lezyonla ilişkisinin doğrudan olmadığı ancak kontrol gruplarına göre göstermiş olduğu ekspresyon değişikliklerinden dolayı NF1 hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Burada birçok genin ekspresyonunda hafif düzeyde azalma saptanmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu yüzden saptanan bu ekspresyon azalmaları hamartomatöz lezyona sahip hastalar ile hamartomatözsüz grup arasında ayırt edici değildir. Hamartomatöz lezyona sahip hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DNA onarım genlerinin ekspresyonunun azaldığı ancak hamartomatöz lezyona sahip olmayan hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında genlerin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. İki grup birbiri ile karşılaştırıldığında; hamartomatöz lezyona sahip olan hastalarda hamartomatöz lezyonlu hastalara göre gen ekspresyonunun çok daha fazla arttığı *heat map* lerle desteklenmiştir. Bu genlerin ekspresyon artış miktarı hamartomatöz lezyon olup olmadığını belirleyici olabilir.

NF1 hastalığında gen ekspresyon değişikliklerini temel olarak nörofibrom varlığı ile belirlenmiştir. Optik gliom gözlenen hastalarda nörofibromlu hastalar gibi benzer ekspresyon paterni göstermiştir. Optik gliomun ve nörofibromun benign natürü bu bulgularımızın benzerliğini açıklayabilir.

Nörofibromu olan hamartomatöz lezyonlu ailesel NF1 hastaları farklı alt gruplara bölünüp karşılaştırıldığında benzer ekspresyon özellikleri gösterdikleri saptanmıştır. Nörofibromu olmayan hastalarda kendi alt gruplarında birbirlerine ve kontrol grubuna benzer özellikte gen ekspresyonu göstermektedirler.

NF 1 olgularında nörofibromların yanı sıra lösemi, yumuşak doku tümörleri, beyin tümörleri, nöroblastom gibi malign tümörler de gelişebilmektedir. Kanserin oluşmasında en önemli nedenlerden biri de DNA'da meydana gelmiş olan hatanın düzeltilememesidir. Bu durum DNA tamir genlerinin doğru çalışmamasından kaynaklanır. Bu amaç doğrultusunda DNA tamir genlerindeki ekspresyon artış ve azalışlarını karşılaştırarak analiz etmeyi amaçladık. Bunun sonucunda da; NF 1' e eşlik eden kanser olgularını belirlemede DNA onarım ilişkili genlerin artış ya da azalışlarının prediktif olabileceği ve bu olguların takibinde klinisyenlerle birlikte temel onkoloji araştırma ekiplerinin yer almasının yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

6.0. SONUÇLAR

Bu değerlendirme; NF1 olgularındaki klinik bulguları öngörmek için DNA onarım sistemi ilişkili gen ekspresyon değişikliklerinin rolü olabileceğini ve NF1' e eşlik eden kanser olgularını belirlemede DNA onarım ilişkili genlerin artış ya da azalışlarının prediktif olabildiğini göstermiştir.

- NF1 hastalığına sahip bireylerde PNKP, RAD18, XAB2, XRCC3, XRCC4, XRCC5 genlerinin ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin NF1 hastalığı ile ilişkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.
- POLB, MGMT, UNG gen ekspresyon artışı NF1 hastalığında nörofibrom gelişmesi ile ilişkilidir.
- POLB geninin ekspresyonunda meydana gelen 2,7 üzerindeki ekspresyon artışı nörofibrom belirleyicisidir.
- RAD52 VE MSH6 gen ekspresyon azalışı nörofibrom gelişmesi ile ilişkilidir.
- NF1 hastalarında ERCC3 geninin nörofibrom oluşmasında koruyucu etkiye sahip olduğu ve ERCC3 geninin ekspresyonunda artış olmayan hastalarda, nörofibrom geliştiği görüldü.
- BRCA2, MLH3, MSH3, RAD23A, XPA genleri NF1' de optik gliom gelişmesi ile ilişkilidir.
- Bu çalışmada yer alan DNA tamir genlerinin ekspresyonu NF1 olgularına hamartomatöz lezyon eşlik etmesini öngörücü değildir.
- Ailesel NF1 olgularında RAD18 geninin ekspresyon azalması anlamlı bulundu.
- Bu çalışmanın sonucunda; NF 1 hastalarında yapmış olduğumuz analizlerde 84 tane DNA tamir geninin 63' ünde ekspresyon değişiklikleri gözlemlendi.

Bu çalışmadaki alt grup sayılarının arttırılarak çalışmaya devam edilmesi daha belirgin sonuçların ortaya konulması açısından faydalı olacaktır. Bu olguların takibinde klinisyenlerle birlikte temel onkoloji araştırma ekiplerinin yer almasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

7.0. KAYNAKLAR

Akiyama K, Nagao, K., Oshida, T., Tsutsui, K., Yoshida, M. C., Seki, S. Cloning, sequence analysis, and chromosomal assignment of the mouse Apex gene. *Genomics* 26: 63-69, 1995.

Akiyama K, Seki, S., Oshida, T., Yoshida, M. C. Structure, promoter analysis and chromosomal assignment of the human APEX gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1219: 15-25, 1994.

Albers AC, Gutmann DH. Gliomas in patients with neurofibromatosis type 1. *Expert Rev Neurother.* 2009 Apr;9(4):535-9

Alotaibi H, Ricciardone MD, Ozturk M. Homozygosity at variant MLH1 can lead to secondary mutation in NF1, neurofibromatosis type I and early onset leukemia.

Mutat Res. 2008 Jan 1;637(1-2):209-14. Epub 2007 Aug 9. PubMed PMID: 17889038.

Ars E, Kruyer H, Gaona A, Casquero P, Rosell J, Volpini V, Serra E, Lázaro C, Estivill X. A clinical variant of neurofibromatosis type 1: familial spinal

neurofibromatosis with a frameshift mutation in the NF1 gene. *Am J Hum Genet.*

1998 Apr;62(4):834-41. PubMed PMID: 9529361; PubMed Central PMCID: PMC1377042.

Bernards A, Haase VH, Murthy AE, Menon A, Hannigan GE, Gusella JF. Complete human NF1 cDNA sequence: two alternatively spliced mRNAs and absence of expression in a neuroblastoma line. *DNA Cell Biol.* 1992 Dec;11(10):727-34. PubMed PMID: 1457041.

Binnie C. G, Kam-Morgan LN, Cayouette MC, Marra G, Boland CR, Luce M. Rapid identification of RT-PCR clones containing translation-terminating mutations. *Mutat Res.* 1997 Jan 15;388(1):21-6.

Boosalis M, Derfler, B., Call, K., Samson, L. Cloning of a human 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA whose gene maps to human chromosome 16. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 49 (suppl.): 399 only, 1991.

Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Reni M, Franceschi E, Bonaldi L, Bertorelle R, Gardiman M, Ghimenton C, Iuzzolino P, Pession A, Blatt V, Ermanni M (2006) Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J Clin Oncol* 24:4746–4753

Buttarelli FR, Massimino M, Antonelli M, Lauriola L, Nozza P, Donofrio V, Arcella A, Oliva MA, Di Rocco C, Giangaspero F. Evaluation status and prognostic significance of O6-methylguanine- DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in pediatric high grade gliomas. *Childs Nerv Syst*, 2010, 26:1051–1056.

Caradonna S, Personal Communication. Stratford, N.J. 10/25/2006.

Caradonna S, Ladner, R., Hansbury, M., Kosciuk, M., Lynch, F., Muller, S. Affinity purification and comparative analysis of two distinct human uracil-DNA glycosylases. *Exp. Cell Res.* 222: 345-359, 1996.

Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell.* 1990 Jul 13;62(1):193-201. Erratum in: *Cell* 1990 Aug 10;62(3):following 608. PubMed PMID: 2114220.

Cecen E, Ince D, Uysal KM, Ozer E, Cetingoz R, Ozguven AA, Cakmakci H, Sarialioglu F, Olgun N. Soft tissue sarcomas and central nervous system tumors in children with neurofibromatosis type 1. *Childs Nerv Syst.* 2011 Mar 26.

Chen, J, Tomkinson, A. E., Ramos, W., Mackey, Z. B., Danehower, S., Walter, C. A., Schultz, R. A., Besterman, J. M., Husain, I. Mammalian DNA ligase III: molecular cloning, chromosomal localization, and expression in spermatocytes undergoing meiotic recombination. *Molec. Cell. Biol.* 15: 5412-5422, 1995.

Colell A, Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D. D., Beere, H. M., Green, D. R. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129: 983-997, 2007. Note: Erratum: *Cell* 130: 385 only, 2007.

Caskey C. T, Kruh, G. D. The HPRT locus: review. *Cell* 16: 1-9, 1979.

Czyzyk E, Jóźwiak S, Roszkowski M, Schwartz RA. Department of Pediatrics, Central Hospital and Pediatric Neurology Unit, Rzeszow, Poland. 5-Shofty B, Constantini S, Freedman S, Ben-Sira L, Kesler A. [Optic pathway gliomas--current position and future directions]. *Harefuah.* 2010;149(11):721-5, 748. Review. Hebrew.

De Raedt T, Brems H, Lopez-Correa C, Vermeesch JR, Marynen P, Legius E.

Genomic organization and evolution of the NF1 microdeletion region. *Genomics.*

2004 Aug;84(2):346-60. PubMed PMID: 15233998.

De Vos M, Hayward BE, Charlton R, Taylor GR, Glaser AW, Picton S, Cole TR, Maher ER, McKeown CM, Mann JR, Yates JR, Baralle D, Rankin J, Bonthron DT, Sheridan E. PMS2 mutations in childhood cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Mar 1;98(5):358-61.

Donson AM, Addo-Yobo SO, Handler MH, Gore L, Foreman NK (2007) MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 48:403–407

Elder R. H, Jansen, J. G., Weeks, R. J., Willington, M. A., Deans, B., Watson, A. J., Mynett, K. J., Bailey, J. A., Cooper, D. P., Rafferty, J. A., Heeran, M. C, Wijnhoven, S. W. P., van Zeeland, A. A., Margison, G. P. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice show increased susceptibility to induction of mutations by methyl methanesulfonate. *Molec. Cell. Biol.* 18: 5828-5837, 1998.

Etzler J, Peyrl A, Zatkova A, Schildhaus HU, Ficek A, Merkelbach-Bruse S, Kratz CP, Attarbaschi A, Hainfellner JA, Yao S, Messiaen L, Slavc I, Wimmer K. RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. *Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):299-305.

Fassan M, Tassone E, Onisto M, Perilongo G, D'Avella D, Gardiman MP. Childs Nerv Syst. 2011 Jan;27(1):7-8. Epub 2010 Oct 30. MGMT promoter methylation in pediatric high-grade gliomas.

Comment on

Childs Nerv Syst. 2010 Aug;26(8):1051-6.

Childs Nerv Syst. 2010 Nov;26(11):1613-8.

Fromme J. C, Banerjee, A., Huang, S. J., Verdine, G. L. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature* 427: 652-656, 2004.

Fry R. C, Svensson, J. P., Valiathan, C., Wang, E., Hogan, B. J., Bhattacharya, S., Bugni, J. M., Whittaker, C. A., Samson, L. D. Genomic predictors of interindividual differences in response to DNA damaging agents. *Genes Dev.* 22: 2621-2626, 2008.

Fuchs B, Spinner RJ, Rock MG. Malignant peripheral nerve sheath tumors: an update. *J Surg Orthop Adv.* 2005 Winter;14(4):168-74. Review. PubMed PMID: 16442014.

Galland F, Stefanova, M., Pirisi, V., Birnbaum, D. Characterization of a murine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene. *Biochimie* 72: 759-762, 1990.

Garza R, Hudson RA 3rd, McMahan CA, Walter CA, Vogel KS. A mild mutator phenotype arises in a mouse model for malignancies associated with neurofibromatosis type 1. *Mutat Res.* 2007 Feb 3;615(1-2):98-110. PubMed PMID: 17208258.

Gao Y, Katyal, S., Lee, Y., Zhao, J., Rehg, J. E., Russell, H. R., McKinnon, P. J. DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair. *Nature* 471: 240-244, 2011.

Gibbs R. A, Nguyen, P.-N., Edwards, A., Civitello, A. B., Caskey, C. T. Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics* 7: 235-244, 1990.

Goodfellow P. N, Davies, K. E., Ropers, H.-H. Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 40: 296-352, 1985.

Gutmann DH, The neurofibromatoses: when less is more. *Hum Molec. Genet.* 10: 747-755, 2001

Hadi MZ, Coleman, M. A., Fidelis, K., Mohrenweiser, H. W., Wilson, D. M., III. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res.* 28: 3871-3879, 2000.

Hadi MZ, Ginalski, K., Nguyen, L. H., Wilson, D. M., III. Determinants in nuclease specificity of Ape1 and Ape2, human homologues of Escherichia coli exonuclease III. *J. Molec. Biol.* 316: 853-866, 2002.

Harrison L, Ascione, G., Menninger, J. C., Ward, D. C., Demple, B. Human apurinic endonuclease gene (APE): structure and genomic mapping (chromosome 14q11.2-12). *Hum. Molec. Genet.* 1: 677-680, 1992.

Hooper M, Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., Monk, M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326: 292-295, 1987.

Huttner AJ, Kieran MW, Yao X, Cruz L, Ladner J, Quayle K, Goumnerova LC, Irons MB, Ullrich NJ. Clinicopathologic study of glioblastoma in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Jul 1;54(7):890-6.

Ide Y, Tsuchimoto, D., Tominaga, Y., Iwamoto, Y., Nakabeppu, Y. Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene. *Genomics* 81: 47-57, 2003.

Ide Y, Tsuchimoto, D., Tominaga, Y., Nakashima, M., Watanabe, T., Sakumi, K., Ohno, M., Nakabeppu, Y. Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice. *Blood* 104: 4097-4103, 2004.

Izumi T, Henner, D., Mitra, S. Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. *Biochemistry* 35: 14679-14683, 1996.

Jayaraman L, Murthy, K. G. K., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., Prives, C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev*. 11: 558-570, 1997.

Jentoft M, Giannini C, Cen L, Scheithauer BW, Hoesley B, Sarkaria JN, Abell-Aleff PC, Rodriguez EF, Li Y, Rodriguez FJ. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010 Dec 12;4(1):43-57.

Kaufmann D, Müller R, Bartelt B, Wolf M, Kunzi-Rapp K, Hanemann CO, Fahsold R, Hein C, Vogel W, Assum G. Spinal neurofibromatosis without café-au-lait macules in two families with null mutations of the NF1 gene. *Am J Hum Genet*. 2001 Dec;69(6):1395-400. Epub 2001 Oct 18. PubMed PMID: 11704931; PubMed Central PMCID: PMC1235551.

Keebaugh A. C, Sullivan, R. T., NISC Comparative Sequencing Program, Thomas, J. W. Gene duplication and inactivation in the HPRT gene family. *Genomics* 89: 134-142, 2007.

Kenmochi N, Kawaguchi, T., Rozen, S., Davis, E., Goodman, N., Hudson, T. J., Tanaka, T., Page, D. C. A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res.* 8: 509-523, 1998.

Kets CM, Hoogerbrugge N, van Krieken JH, Goossens M, Brunner HG, Ligtenberg MJ. Compound heterozygosity for two MSH2 mutations suggests mild consequences of the initiation codon variant c.1A>G of MSH2. *Eur J Hum Genet.* 2009 Feb;17(2):159-64. Epub 2008.

Kim SH, Moores, J. C., David, D., Respass, J. G., Jolly, D. J., Friedmann, T. The organization of the human HPRT gene. *Nucleic Acids Res.* 14: 3103-3118, 1986.

Kratz CP, Holter S, Etzler J, Lauten M, Pollett A, Niemeyer CM, Gallinger S, Wimmer K. Rhabdomyosarcoma in patients with constitutional mismatch-repair-deficiency syndrome. *J Med Genet.* 2009 Jun;46(6):418-20. Epub 2009 Mar 16

Krüger S, Kinzel M, Walldorf C, Gottschling S, Bier A, Tinschert S, von Stackelberg A, Henn W, Görgens H, Boue S, Kölbl K, Büttner R, Schackert HK. Homozygous PMS2 germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jan;16(1):62-72. Epub 2007 Sep

Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol.* 2010 Jan;12(1):104-13. Epub 2009 Nov 23. Review.

Laschet J. J, Kurcewicz, I., Minier, F., Trottier, S., Khallou-Laschet, J., Louvel, J., Gigout, S., Turak, B., Biraben, A., Scarabin, J.-M., Devaux, B., Chauvel, P., Pumain, R. Dysfunction of GABA-A receptor glycolysis-dependent modulation in human partial epilepsy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 104: 3472-3477, 2007.

Lau A Y, Scharer, O. D., Samson, L., Verdine, G. L., Ellenberger, T. Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. *Cell* 95: 249-258, 1998.

Li Y, Nowotny, P., Holmans, P., Smemo, S., Kauwe, J. S. K., Hinrichs, A. L., Tacey, K., Doil, L., van Luchene, R., Garcia, V., Rowland, C., Schrodi, S., and 20 others. Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 15688-15693, 2004. Note: Erratum: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 6411 only, 2006.

Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil S, Robertson M, White R, Viskochil D. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics.* 1995 Jan 1;25(1):9-18. PubMed PMID: 7774960.

Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, Genuardi M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet A.* 2003 Nov 1;122A(4):325-34. Review.

Maertens O, Brems H, Vandesomepele J, De Raedt T, Heyns I, Rosenbaum T, De Schepper S, De Paepe A, Mortier G, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat.* 2006 Oct;27(10):1030-40.

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell.* 1990 Nov 16;63(4):843-9. PubMed PMID: 2121370.

McGoldrick J. P, Yeh, Y.-C., Solomon, M., Essigmann, J. M., Lu, A.-L. Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. *Molec. Cell. Biol.* 15: 989-996, 1995.

Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, Fu C, Mikhail F, Serra E, Garcia-Linares C, Cooper DN, Lazaro C, Kehrer-Sawatzki H. Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum Mutat.* 2011 Feb;32(2):213-9. doi: 10.1002/humu.21418.

Muller S. J, Caradonna, S. Cell cycle regulation of a human cyclin-like gene encoding uracil-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 268: 1310-1319, 1993.

Muller S. J, Caradonna, S. Isolation and characterization of a human cDNA encoding uracil-DNA glycosylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1088: 197-207, 1991.

Mookherjee N, Lippert, D. N. D., Hamill, P., Falsafi, R., Nijnik, A., Kindrachuk, J., Pistolic, J., Gardy, J., Miri, P., Naseer, M., Foster, L. J., Hancock, R. E. W. Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes. *J. Immun.* 183: 2688-2696, 2009.

Moser J, Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L. H. F., Fousteri, M. I. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III-alpha in a cell-cycle-specific manner. *Molec. Cell* 27: 311-323, 2007.

Myers A, Wavrant De-Vrieze, F., Holmans, P., Hamshere, M., Crook, R., Compton, D., Marshall, H., Meyer, D., Shears, S., Booth, J., Ramic, D., Knowles, H., and 16 others. Full genome screen for Alzheimer disease: stage II analysis. *Am. J. Med. Genet.* 114: 235-244, 2002.

Ostergaard JR, Sunde L, Okkels H. Neurofibromatosis von Recklinghausen type I phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in MSH6. *Am J Med Genet A.* 2005 Dec 1;139A(2):96-105; discussion 96. PubMed PMID: 16283678.

Parsons CM, Canter RJ, Khatri VP. Surgical management of neurofibromatosis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2009 Jan;18(1):175-96

Pemov A, Park C, Reilly KM, Stewart DR. Evidence of perturbations of cell cycle and DNA repair pathways as a consequence of human and murine NF1-haploinsufficiency. *BMC Genomics*. 2010 Mar 22;11:194.

Ricciardone MD, Ozçelik T, Cevher B, Ozdağ H, Tuncer M, Gürgey A,

Uzunaliimoğlu O, Cetinkaya H, Tanyeli A, Erken E, Oztürk M. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res*. 1999 Jan 15;59(2):290-3. PubMed PMID: 9927033.

Sabbag A, Pasmant, E., Laurendeau, I., Parfait, E., Barbarot, S., Guillot, B., Combemale, P., Ferkal, S., Viduad, M., Aubourg, P., Viduad, D., Wolkenstein, P., NF France Network Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum. Molec. Genet*. 18: 2768-2778, 2009

Schlosser S, Wagner S, Mühlisch J, Hasselblatt M, Gerst J, Wolff JE, Frühwald MC (2010) MGMT as a potential stratification marker in relapsed high-grade glioma of children: the HIT-GBM experience. *Pediatr Blood Cancer* 54:228– 237

Shaw DJ, Brook JD, Meredith AL, Harley HG, Sarfarazi M, Harper PS. Gene mapping and chromosome 19. *J Med Genet*. 1986 Feb;23(1):2-10. Review.

Simpson D, Crosby, R. M., Skopek, T. R. A method for specific cloning and sequencing of human HPRT cDNA for mutation analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 151: 487-492, 1988.

Simsek D, Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.-K., Van Houten, B., Shuman, S., McKinnon, P. J., Jasin, M. Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature* 471: 245-248, 2011.

Slupska M. M, Baikalov, C., Luther, W. M., Chiang, J.-H., Wei, Y.-F., Miller, J. H. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol*. 178: 3885-3892, 1996.

Srivastava A, Jain A, Jha P, Suri V, Sharma MC, Mallick S, Puri T, Gupta DK, Gupta A, Sarkar C (2010) MGMT gene promoter methylation in pediatric glioblastomas. *Childs Nerv Syst.* doi:10. 1007/s00381-010-1214-y

Titze S, Peters H, Währisch S, Harder T, Guse K, Buske A, Tinschert S, Harder A. Differential MSH2 promoter methylation in blood cells of Neurofibromatosis type 1 (NF1) patients. *Eur J Hum Genet.* 2010 Jan;18(1):81-7. Epub . Erratum in: *Eur J Hum Genet.* 2010 Apr;18(4):509

Toledano H, Goldberg Y, Kedar-Barnes I, Baris H, Porat RM, Shochat C, Bercovich D, Pikarsky E, Lerer I, Yaniv I, Abeliovich D, Peretz T. Homozygosity of MSH2 c.1906G-->C germline mutation is associated with childhood colon cancer, astrocytoma and signs of Neurofibromatosis type I. *Fam Cancer.* 2009;8(3):187-94. Epub 2008 .

Trovo-Marqui, A. B., Tajara, E. H. Neurofibromin: a general outlook. *Clin. Genet.* 70: 1-13, 2006.

Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T., Nakabeppu, Y. Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res.* 29: 2349-2360, 2001.

Wang Q, Montmain G, Ruano E, Upadhyaya M, Dudley S, Liskay RM, Thibodeau SN, Puisieux A. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum Genet.* 2003 Feb;112(2):117-23. Epub 2002 Nov 21.

Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Frappaz D, Bergeron C, Navarro C, Ruano E, Puisieux A. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):294-7. PubMed PMID: 9927034.

Whiteside D, McLeod R, Graham G, Steckley JL, Booth K, Somerville MJ, Andrew SE. A homozygous germ-line mutation in the human MSH2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple café-au-lait spots. *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):359-62

Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):124-33

Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet*. 2008 Sep;124(2):105-22. Epub 2008.

Win AK, Jenkins MA, Buchanan DD, Clendenning M, Young JP, Giles GG, Goldblatt J, Leggett BA, Hopper JL, Thibodeau SN, Lindor NM. Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. *J Med Genet*. 2011 Jun 2.

Thomas L, Kluwe L, Chuzhanova N, Mautner V, Upadhyaya M. Analysis of NF1 somatic mutations in cutaneous neurofibromas from patients with high tumor burden. *Neurogenetics*. 2010 Oct;11(4):391-400. Epub 2010 Apr 1. PubMed PMID: 20358387.

Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleán G, Valero AM, Javier Rodríguez-Álvarez F, Tellería D, Hernández-Chico C. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn*. 2011 Mar;13(2):113



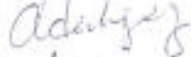

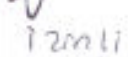





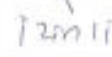
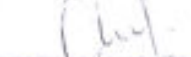

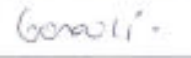

Viskochil D. Genetics of neurofibromatosis 1 and the NF1 gene. *J Child Neurol*. 2002 Aug;17(8):562-70; discussion 571-2, 646-51. Review.

Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*. 1990 Jul

Yang, T. P, Patel, P. I., Chinault, A. C., Stout, J. T., Jackson, L. G., Hildebrand, B. M., Caskey, C. T. Molecular evidence for new mutation at the HPRT locus in Lesch-Nyhan patients. *Nature* 310: 412-414, 1984.

Yohay K. Neurofibromatosis type 1 and associated malignancies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2009 May;9(3):247-53.

8.0. EKLER

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/27-06	Tarih:11.08.2011				
	Prof.Dr.Nur OLGUN'un sorumlusu Yük.Lis.Öğr.Duygu DURSUN'un yürütmücüsü olduğu "Nörofibromatozis Olgularının Klinik ve Laboratuvar Özelliklerinin Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Besti ÖSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ösman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Duygu DURSUN



TC Kimlik No / Pasaport No:	11815677714
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Eğitim mah. Ekrem Güer sok. No:42/5 Balçova/ İZMİR
Telefon :	0505 808 9286
Faks :	
e-posta :	duygu-dursun@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			



IV. MULTİDİSİPLİNER KANSER ARAŞTIRMA KONGRESİ

13 - 16 Aralık 2012

Prof. Dr. Mete Cengiz Kongre ve Kültür Merkezi, Bursa

SAYIN

Duygu Dursun
Safiye Aktaş
Pınar Erçetin
Zekiye Altun
Nur Olgun

Uludağ Üniversitesi'nde 13-16 Aralık tarihinde düzenlenecek olan IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi'ne katılmak üzere göndermiş olduğunuz "NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 KANSER İLİŞKİSİNE MOLEKÜLER YAKLAŞIM" başlıklı sözlü bildirinizi sunuma uygun bulunmuştur.

Başarılarınızın devamını diler, kongrede buluşmak üzere saygılar sunarız.

www.kanserarastirma.org

Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Kongre Başkanı

Doç. Dr. Serap ÇELİKLER

BİLİMSEL SEKRETERYA

E-posta: [sceleikler@uludag.edu.tr](mailto:scelikler@uludag.edu.tr)

NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 KANSER İLİŞKİSİNE MOLEKÜLER YAKLAŞIM

MOLECULAR APPROACH TO NEUROFIBROMATOSIS TYPE I AND CANCER RELATION

Duygu Dursun, Safiye Aktaş, Pınar Erçetin, Zekiye Altun ve Nur Olgun

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü İzmir

GİRİŞ: Nörofibromatozis Tip 1 (NF 1), çeşitli fenotiplere sahip, sık görülen otozomal dominant genetik bir hastalıktır. NF 1 olgularında nörofibromların yanı sıra lösemi, yumuşak doku tümörleri, beyin tümörleri, nöroblastom gibi malign tümörler de gelişebilmektedir. Kanser oluşmasında en önemli nedenlerden biri de DNA'da meydana gelmiş olan hatanın düzeltilmemesidir. Bu durum DNA tamir genlerinin doğru çalışmamasından kaynaklanır. Bu amaç doğrultusunda DNA tamir genlerindeki ekspresyon artış ve azalışlarını karşılaştırarak analiz etmeyi amaçladık. Bu çalışmada; NF 1 olguları arasında malignite gözlenen iki olguyu (rabdomiyosarkom (RMS), meme kanseri) DNA tamir genleri ekspresyonu yönünden malignite görülmeyen NF 1 olguları ve normal kontrol olguları ile NF 1 ilişkili olmayan rabdomiyosarkom olgularını karşılaştırarak değerlendirdik.

MATERYAL VE METOD: Gönüllü olur formu imzalatılan her bir olgudan periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu (PBMC) yapıldı. Bu aşamada alınan kanlar bekletilmeden direkt olarak çalışıldı. Elde edilen mononükleer hücreler öncelikle azotta kısa bir süre şoklandıktan sonra -80 °C de saklandı. Mononükleer hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve RNA miktarı ölçüldü. Yeterli miktarda RNA izolasyonu yapıldığı hesaplandıktan sonra cDNA çevrimi gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra PAHS-042 array'i kullanılarak 84 tane DNA tamir geninin ekspresyonu değerlendirildi. Bu değerlendirme çeşitli alt gruplarda farklı ya da benzer özellikler gerçekleştirilerek yapıldı. Değerlendirme SA Bioscience'in data analysis expression sayfasında yapıldı ve gen ekspresyon analizleri *heat map* ve *clustergram* ile desteklendi. T test tabanlı p değeri bu sitede değerlendirildi.

BULGULAR: RMS ve meme kanseri gelişen NF 1'li 2 olgu ile NF 1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında; ATM, CDK7, DDB2, ERCC5, LIG3, MLH1, MUTYH, POLB, RAD52, RPA3, SLK, XPA gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. BRCA1, BRCA2, ERCC2, ERCC8, MPG, NEIL2, NTHL1, PMS1, RAD50, XAB2, XRCC3, XRCC6 genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$, T test). NF 1'li RMS olgusu ile NF 1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG, XPA genlerinin ekspresyonunda 10 kattan fazla artış gözlenmiştir. NF 1'li meme kanseri gelişen olguda kansersiz NF 1 olgularına göre ATR, CCNO, MLH1, NEIL1, NTHL1, RAD18, RAD 51, XRCC1, XRCC3 genlerinin ekspresyonunda artış gözlenirken, ATM, BRCA1, BRCA2, ERCC4, EXO1, FEN1, LIG1, LIG3, MPG, MRE11A, MSH2, NEIL2, PMS1, POLD3, RFC1, SMUG1, TDG, TOP3B genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

SONUÇ: NF 1'e eşlik eden kanser olgularını belirlemede DNA onarım ilişkili genlerin artış ya da azalışları prediktif olabilir ve bu olguların takibinde klinisyenlerle birlikte temel onkoloji araştırma ekiplerinin yer almasının yararlı olduğu sonucuna varılmıştır.



NEUROFIBROMATOSIS (NF) ASSOCIATION

15th EUROPEAN NF MEETING

Neurofibromatosis: from childhood to adulthood



ISTANBUL • SEPTEMBER 6 - 9, 2012
LUTFİ KIRDAR Convention & Exhibition Centre

ABSTRACT BOOK

Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type 1 Cases *Duygu Dursun, Safiye Aktaş, Pınar Erçetin, Zekiye Altun, Dilek Ince, Kamer Mutafoğlu and Nur Olgun*

Dokuz Eylul University Institute of Oncology Department of Basic Oncology, Izmir, Turkey

Dokuz Eylul University Institute of Oncology Department of Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

PURPOSE: Neurofibromatosis Type 1 (NF 1) is a a common autosomal dominant genetic disorder that has a variable phenotype. The genetical cause of clinical variability of NF1 patients is questioned. DNA repair genes are responsible for proofreading the missing in the DNA. We aimed to analyze expression of DNA repair genes and their clinical significance in NF 1 patients; comparing existance of neurofibroma or hamartomatous lesions or other tumours or existance of NF1 in the family.

MATERIALS AND METHOD: This study included total 46 cases. 36 NF1 patients (30 children; 6 parents), 8 control cases without any disease, two control cases with rhabdomyosarcoma without NF1. 17 of them are female, and 19 are male. The mean age at diagnosis is 10.08 for children and 40.67 for parents.. Among 36 patients, 17 had neurofibromas, 17 had hamartomatous lesions. Rhabdomyosarcoma (RMS) was observed in one patient, breast cancer in one patient and four patients suffered optic glioma. Peripheral blood was obtained from each case. Mononuclear cells were separated. After RNA isolation and cDNA converting, expressions of 84 genes related with DNA Repair in standard array (SABiosciences) were determined by Real-Time PCR for each case. Fold changes and p values comparing groups were evaluated.

RESULTS: In NF1 cases PNKP, RAD18, XAB2, XRCC3, XRCC4 and XRCC5 genes were downregulated compared with control group. In NF1 cases having neurofibromas, POLB was overexpressed; while ERCC3,LIG1,MGMT, MRE11A, MPG, MSH6, PARP2, PRKDC, RAD51B, RAD52, RPA3, SMUG1, TREX1, UNG were downregulated compared with the NF1 cases without neurofibromas ($p < 0.05$, T test). No gene was determinant for hamartomatous lesions or optic glioma presence. RAD18 is the downregulated and statistical significant gene for existance of NF1 in the family. There are gene expression fold change differences when malign tumor cases with/without NF1 were compared. DDB2, MGMT, MLH1, POLB UNG, XPA are overexpressed. But statistical evaluation was not assesed because of low number of cases in each group.

CONCLUSION: Our results may point toward a role of gene expression changes of DNA repair system to be predictive for clinical manifestations in NF1 cases.

Note: This study was supported by Turkish Pediatric Oncology Group and Dokuz Eylul University Scientific Research Projects Unit.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın Adı : Nörofibromatozis Tip 1 Olgularında DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonunun Klinik Önemi

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Bu çalışmanın amacı NF tip 1 de ailesel ilişki ve beraberinde tümör görülmesinde DNA tamir gen farklılıklarını sorgulamaktır. Bu çalışmadan elde edilebilecek bulgular ile NF tip 1 de tümör oluşma riskini ön görebilecek genetik bulgulara ulaşılabilecektir.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için nörofibromatozis tip 1 tanısı almış olmanız gerekir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Sizden zaten tanısal amaçlı kan alınırken bir miktar çalışma için ayrılacaktır. Ek bir girişim yoktur. Alınan materyal tanınız için gerekli işlemleri etkilemeyecektir.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak sizin sorumluluklarınız yoktur.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 24 'dir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre yoktur. Bir kerelik kan alınacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada sizin için beklenen yararlar ya da zararlar yoktur. Bilime katkı sağlanabilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Size bu araştırmada kan alma işlemi uygulanacaktır. Bu uygulama zaten yapılacak işlem sırasında yapılacaktır. Ek bir risk yoktur. Alınacak miktar 10 cc olup risk teşkil etmemektedir. Size ek bir tedavi uygulaması yoktur.

Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİLEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler yoktur.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Alınan materyal yetersiz olduğunda, tanınız değiştiğinde, doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunuz tedavi ve izleminizi etkilemeyecektir.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmacının izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 2 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

RIZA ALMA İŞLEMİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		