

# Türk Toplumundaki Nörofibromatozis Tip 1'li Hastalarda Gen Mutasyonlarının Araştırılması\*

## Research of Gene Mutations in Patient Suffering from Neurofibromatosis Type 1 in Turkey

Sacide PEHLİVAN<sup>1,2</sup>, Hüseyin ONAY<sup>2</sup>, Gülçin ITIRLI<sup>2</sup>, Ayşe ERBAY<sup>3</sup>, Ahmet KOMAN<sup>4</sup>, Duri Şehvar ÖZEL ÜNAL<sup>4</sup>, Ferda ÖZKINAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, GAZİANTEP

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,

<sup>3</sup> Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi, Onkoloji Birimi, İZMİR

<sup>4</sup> Boğaziçi Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İSTANBUL

\* Bu çalışma; XII. International Biomedical Science and Technology Symposium, 20-23 September 2005, Izmir-Turkey toplantısında sözlü olarak sunulmuştur.

### ÖZET

Nörofibromatozis tip 1 (NF1) insan sinir sistemini etkileyen hastalıklar içerisinde, en sık gözlenen tek gen hastalığıdır. Otozomal dominant olarak kalıtılır. Café au lait lekeleri, nörofibromlar ve Lisch nodülleri ile karakterizedir. Bu hastalarda nörofibrosarkom sıklığı 9000 kat, lösemi sıklığı 71 kat, santral sinir sistemi tümörleri riski 46 kat artmıştır. NF1 geni 17q11.2 bölgesinde olup 360 kb büyüklüktedir. Şu ana kadar gende uluslararası konsorsiyum tarafından tanımlanmış 246 mutasyon bulunmaktadır. Gen çok büyük olduğu için daha tanımlanmamış birçok mutasyon bulunmaktadır. Çalışmamızda Türk toplumundaki (Ege bölgesi) NF1 geninde nispeten daha çok mutasyonun yer aldığı 3 bölgenin (ekson 27a, ekson 37, ekson 4b) DNA dizi analizinin yapılması amaçlanmıştır. On altı NF1 hastasına ait DNA'lardan NF genine ait 3 bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmış ve DNA dizi analizleri yapılmıştır. On altı NF1 hastasında da dizi analizi yapılan bölgelerde mutasyon saptanmamıştır. Türk NF1 hastalarında diğer toplumlarda bu ekzonlarda görülen mutasyonların olmadığı ya da çok nadir olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Nörofibromatozis tip 1 (NF1), PCR, DNA dizi analizi.

### SUMMARY

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is the most common single gene disorder among the diseases affecting the human nervous system. It is autosomal dominantly inherited. It is characterised by café au lait spots, neurofibromas and Lisch nodules. The prevalence of neurofibrosarcoma has been raised 9.000 times, leukemia 71 times, CNS tumors 46 times in these patients. NF1 gene is located in 17q11.2 region and it has 360 kb of longevity. To date, 246 mutations have been identified in the gene by the international consortium. There are many unidentified mutations since the gene is considerably large. In this study, it is aimed at performing the DNA sequencing of 3 regions (exon 27a, exon 37, exon 4b of NF1 gene) which contain comparatively larger number of mutations in NF1 gene in the Turkish society (Aegean region). Three exons (exon 27a, exon 37, exon 4b of NF1 gene) from the DNA of 16 NF1 patients were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing was performed by ABI 310. No mutations were detected in related exons of 16 Turkish NF1 patients. It is concluded that the 16 Turkish NF1 patients did not have or very scarcely had the mutations, which were observed in exon 27a, exon 37, exon 4b in other societies.

**Key Words:** Neurofibromatosis type 1 (NF1), PCR, DNA sequencing.

## GİRİŞ

Nörofibromatozis tip 1 (NF1: MIM ≠ 162.200) insan sinir sistemini etkileyen hastalıklar içerisinde en sık gözlenen tek gen hastalığıdır. Hastalık otozomal dominant kalıtılır ve kadın erkek oranı eşittir. Prevelansı 1/3000 ile 1/5000 arasında değişmektedir (1). İnsidans 2500 canlı doğumda bir olarak saptanmıştır (2). Penetrans tamdır, fakat ekspresyonu oldukça farklıdır. Aynı ailede farklı ekspresyon görülür bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir (3). Hastalık café au lait lekeleri, kutanöz nörofibromlar ve iris hamartomları (Lisch nodülleri) ile karakterizedir.

Yetişkinlerde fizik muayene ile hastalığa kolayca tanı konulabilirken çocuklarda café au lait lekeleri uzunca bir süre hastalığın tek bulgusu olarak kalabilir. Semptomlar yaşla birlikte ortaya çıkmaktadır ve penetrans 5 yaşında tamdır. Kutanöz nörofibromlar bebeklik döneminde nadir iken puberte öncesi dönemde ortaya çıkmaya başlamaktadır. Café au lait lekeleri doğumda çok sayıda bulunabilirler ya da 1 yaşına kadar ortaya çıkarlar. Bu lekelerin malign tümöre dönüşme riski yoktur. Pleksiform nörofibromlar genellikle doğumda bulunmaktadırlar. Bunlar infiltrate edici tümörlerdir ve malign transformasyon gösterebilirler. Lisch nodülleri yaşla birlikte artan bir sıklıkta gözlenir. Uzun kemik displazileri doğumda bulunur ve gelişim sırasındaki deformasyonun saptanması ile tanı konulur. Hastaların %6'sında arteriyel hipertansiyon bulunur. Hipertansiyon esansiyel olabileceği gibi renal arter stenozu, feokromasitoma ya da aort koarktasyonuna sekonder de olabilir (2).

Bu hastalıkta ortaya çıkan tümörlerin çoğunluğu benign karakterdedir (nörofibromlar). Malign tümörler nadirdir ve toplumdan topluma farklı bir dağılım göstermektedir. Tümörlerin yarısını santral sinir sistemi tümörleri (ependimom, astositom, medullablastom, menejiom, gliom), üçte birini optik gliomlar oluşturmaktadır. Hastalarda malign tümör görülme sıklığı genel olarak toplumun 16.3 katıdır (4).

NF1 ilerleyici bir hastalıktır. Hamilelikte hastalık daha hızlı ilerler, café au lait lekelerinin sıklığı ve büyüklüğü artar. Buna rağmen preeklampsi, prematür eylem, intrauterin gelişme geriliği, anormal perinatal ölüm riski artmamıştır. Fakat sinir kök nörofibromları, pelvis ve vertebra kemik anomalileri veya feokromasitoma gibi nedenlerden dolayı sezaryen tercih edilmektedir (5). Günümüzde hastalığın bir tedavisi bulunmamaktadır.

NF1 geni 1990 yılında 17. kromozomun uzun kolundaki perisentrik bölgeye (17q11.2) pozisyonel

klonlama yöntemi ile lokalize edildi. NF1 geni, nörofibromin adlı sitoplazmik proteini kodlamaktadır. Gen 360 kb büyüklüğünde olup 60'ın üzerinde ekson içermektedir. Bu protein 2818 aminoasitten oluşmakta olup 369 aminoasitlik bir santral bölgesi bulunmaktadır [(ekson 21-ekson27): GAP (GTPase activating protein)-related domain (GRD)]. Bu bölge GAP'ın katalitik bölgesi ile homoloji göstermektedir ve RAS yolunun inhibisyonunda görev almaktadır. GAP, GTPaz'ı stimüle ederek p21/Ras'ın GTP bağlı aktif formunu inaktif forma çevirir. Bu nedenle tümör süpresör gen olarak kabul edilmektedir (6-8).

Genin çok büyük ve fazla sayıda homolog psödojeni olması gen üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarını zorlaştırmaktadır. 1992 yılında NF1 genindeki mutasyon ve polimorfizmlere ait bilgilerin merkezileştirilmesi amacıyla uluslararası bir konsorsiyum kurulmuştur (NFF International Consortium- <http://www.nf.org>). Mutasyonların parental kökeni araştırıldığında büyük delesyonların daha çok maternal orijinli, nokta mutasyonların ise %90 oranında paternal orijinli olduğu saptanmıştır (9).

Mutasyonların tayin edilmesinde çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. NF1 gen mutasyonlarının %70'i kısaltıcı mutasyonlar olduğu için bu tip mutasyonlara özel olarak bakmak amacıyla protein kısaltıcı test (PTT-protein truncating test) kullanılmaktadır (8). Bu testin mutasyon tespit oranı %47.1'dir. Bunun yanında TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), DGS (direct genomic sequencing), SSCP (single strand conformational polymorphism) gibi yöntemlerle de mutasyon tayinleri yapılabilmektedir. Aile analizleri için ise indirekt olarak linkaj analizleri yapılabilmektedir. Mevcut testlerin saptanan mutasyonları tespit etme oranları %30-70 arasında değişmektedir (9). Bugüne kadar NF1 mutasyonları ile fenotip arasında kısıtlı sayıda ilişki bulunmuştur. Sadece bütün genin delesyona uğradığı durumlarda dismorfik yüz, erken ortaya çıkan çok sayıda kutanöz nörofibromlar ile öğrenme güçlüğü ve/veya mental retardasyon gözlenmektedir (10).

Sonuç olarak, sinir sistemini en sık etkileyen tek gen hastalığı olan NF1 ile ilgili olarak yapılan yoğun araştırmalar devam etmektedir. NF1 geninin çok büyük olması nedeniyle her yapılan çalışmada yeni mutasyonlar saptanmaktadır.

Bu çalışmada; NF1'e neden olan gen üzerinde en çok mutasyonun saptandığı 3 eksonun (4b, 27a, 37) DNA dizi analizinin 16 NF1 hastasında yapılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

NF kriterlerine göre tanısı konan 16 hasta bireyin EDTA'lı tüpe alınan periferik kan lenfositlerinden DNA izole edilmiştir. İzolasyon işlemi "thermo lab systems" cihazında King Fisher'in genomik DNA pürifikasyon kiti ile yapılmıştır (ürün no: 630 00 41). Tüm bireyler bilgilendirilip onayları alınmıştır.

Elde edilen DNA' lardan Tablo 1' de belirtilen primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapılmış ve elde edilen PCR ürünlerine DNA dizi analizi işlemi yapılmıştır (11). DNA dizi analizi işlemleri ABI Prism 310 cihazı kullanılarak BigD'ye Terminator V3.1 kiti ile gerçekleştirilmiştir.

## TARTIŞMA

NF1 hastalarındaki germline mutasyonların analizi birçok laboratuvar için zorlayıcı bir çalışma alanıdır. NF1 geninin tanımlanmasından itibaren farklı yöntemlerle hastalığa ait mutasyonların taranmasına çalışılmaktadır. Genin çok büyük ve fazla sayıda homolog psödogeni gen üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarını zorlaştırmaktadır. NF1 geninin mutasyon hızı  $1 \times 10^{-4}$ /gamet/jenerasyondur ve mutasyon hızı en yüksek tümörlerden biridir. Olguların yaklaşık %50'si de novo mutasyondur ve hastalığa neden olan mutasyonlar çoğunlukla kişiye özgüdür. NF1 genine ait mutasyonların %22.4'ünü küçük delesyonlar, %17.5'ini nonsense mutasyonlar, % 15.5'ini birden fazla eksonun delesyona uğraması, %10.2' sini "splicing" mutasyonları, %11.8'ini "missense" mutasyonlar oluşturmaktadır. Olguların %7.2' sinde NF1 geninin tamamının delesyonu varken, hastalık %1.6 sıklıkla kromozomal anomaliler nedeniyle oluşmaktadır. NF1 tümorogenezi Knudson'ın çift vuruş hipotezine uymaktadır (12). NF1 hastalığının moleküler temelleri ile ilgili olarak mutasyon hızı dışında önemli olan bir diğer nokta da değişken ekspresyonudur. Aynı mutasyonu taşıyan aile bireylerinde dahi klinik farklı olabilmektedir (12-13).

**Tablo 1. Nörofibromin geninin DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri.**

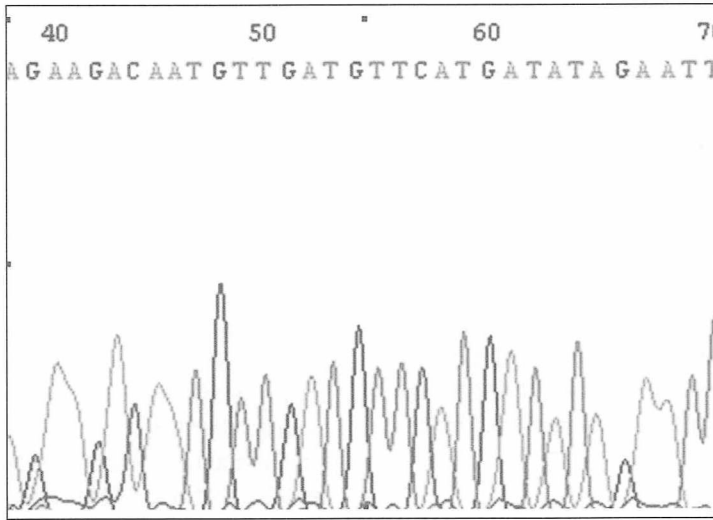
Exon4b-Forward	5'-CTG TCC CCT AAT ACT TAA TT -3'
Exon4b-Reverse	5'- AAT ACT AGT TTT TGA CCC AGT-3'
Exon27a-Forward	5'-TGT GTA GTG CTA AAT GTG -3'
Exon27a-Reverse	5'- AAG CAA ACT CTC CTT CTC AAC-3'
Exon37-Forward	5'-TCC GAG ATT CAG TTT AGG AGT-3'
Exon37-Reverse	5'-AAT GCA CTC ATT TTC TAT ACA GTA -3'

Sonlandırıcı mutasyonların yoğunluğu NF1'e ait karakteristik özelliklerdendir. Mutasyonların yarısı direkt ya da indirekt olarak "stop" kodon oluşturmaktadır (9). Mutasyonların tayin edilmesinde çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. NF1 gen mutasyonlarının %70'i kısaltıcı mutasyonlar olduğu için bu tip mutasyonlara özel olarak bakmak amacıyla PTT kullanılmaktadır (8). Bu testin mutasyon tespit oranı %47.1'dir (9). Bunun yanında TGGE, DGS, SSCP gibi yöntemlerle de mutasyon tayinleri yapılabilmektedir. Aile analizleri için ise indirekt olarak linkaj analizleri yapılabilmektedir. Mevcut testlerin saptanan mutasyonları tespit etme oranları %30-70 arasındadır. Messiaen ve arkadaşları 2001 yılında NF1 hastalarındaki mutasyon taramasını daha etkili yapabilmek için bir algoritim önermişlerdir (14). Buna göre:

1. Öncelikle PTT yapılmalıdır. Bazı laboratuvarlarda bu test tek başına %80 sonuç verebilmektedir.
2. Eğer sonlanmış protein saptanırsa buna neden olan sekans bozukluğu hem cDNA hem de genomik DNA düzeyinde dizi analizi ile gösterilmelidir.
3. Eğer mutasyon bulunamazsa tüm gen delesyonu için FISH analizi yapılmalıdır.
4. Sonuç alınamazsa PTT' den kaçan mutasyonlar ve missense mutasyonlar için kodlayıcı bölgenin tamamının direkt dizi analizi yapılmalıdır.
5. İntragenik delesyonlar için "southern blot" uygulanmalıdır.
6. Büyük düzeyde yeniden düzenlenmeler için sitogenetik çalışma yapılmalıdır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda mutasyonlar için herhangi bir sıcak noktaya rastlanılmamasına karşılık bazı bölgelerde mutasyonların daha sık olarak gözlemlendiği saptanmıştır. Bunlar arasında ekson 4b, ekson 27a ve ekson 37 öne çıkmaktadır (9). Toliat ve arkadaşları TGGE yöntemi ile NF1 genini taramışlar ve ekson 4b' deki mutasyon sıklığının yüksek olduğunu saptamışlardır (15). Fahsold ve arkadaşları NF1 geninin tamamını tarayarak yaptıkları çalışmada ekson 27a'daki R1513X mutasyonunu 7 hastada saptamışlardır. Aynı çalışmada ekson 37 mutasyonları 5 hastada tespit edilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda ekson 9b, 19b, 23a, 38, 48 ve 49'da mutasyona rastlanmamıştır. Fahsold ve arkadaşları elde ettikleri sonuçlar neticesinde ekson 4b, 27 a ve ekson 37' nin minör sıcak noktalar olabileceğini belirtmektedir (9).

Çalışmamızda NF1 genine ait ekson 4b, ekson 27a ve ekson 37 dizi analizi yöntemi ile NF1 hastalarında



Şekil 1. 1 nolu NF1 hastasına ait DNA dizi analizi sonucu.

araştırılmıştır. Bu amaçla 16 NF1 hastasına ait DNA'dan 3 eksone ait bölgeler PCR ile çoğaltılmış ve dizi analizi yapılmıştır (Şekil 1). Yapılan 48 bölgeye ait DNA dizi analizlerinde 16 Türk NF1 hastasında gene ait mutasyona rastlanmamıştır. Türk NF1 hastalarında diğer toplumlarda bu eksonlarda görülen mutasyonların olmadığı ya da çok nadir olduğu sonucuna varılmıştır.

NF1 mutasyonu farklılıkları kişiye özeldir. Batı Anadolu popülasyonunda NF ekson 27a, 37 ve 4b sekans çalışması ilk kez yapılmıştır ve literatürde en yoğun mutasyon bölgesi olarak tanımlanan 3 eksonda mutasyon saptanmamıştır. Bu aşamadan sonra çalışmanın devam edebileceği 2 yol vardır.

1. Mutasyonun yoğun olarak görüldüğü eksonlar sırayla DNA dizi analizi ile karşılaştırılabilir.

2. DNA hasarındaki düzeltmelerde görevli olan DNA tamir enzimlerindeki mutasyonlar araştırılabilir.

Bu projenin devamında; biz ikinci yol olan DNA tamir enzimlerindeki mutasyonları araştırarak bu hastalık üzerinde çalışmalarımıza devam etmeyi planlamaktayız.

#### KAYNAKLAR

1. North K. Neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 2000; 97:119-27.
2. [http://orphanet.infobiogen.fr/d"ata/patho/GB/uk-NF1.html](http://orphanet.infobiogen.fr/d)
3. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *AJMG* 1999;89:1-6.
4. Matsui I, Tanimura M, Kobayashi N, Sawada T, Nagahara N, Akatsuka J. Neurofibromatosis type 1 and childhood cancer. *Cancer* 1993;72:2746-54.
5. Dugoff L, Sujansky E. Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *Am J Med Genet* 1996;66:7-10.
6. White R, O'Connell P. Identification and characterization of the gene for neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Genet Dev* 1991;1:15-9.
7. Lee MJ, Stephenson DA. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 2007;20:135-41.
8. Hoffmayer S, Nürnberg P. Nearby stop codons in exon of the neurofibromatosis type 1 gene are disparate splice effectors. *Am J Hum Genet* 1998;62:269-77.
9. Fahsold R, Hoffmayer S, Mischung C, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-Related domain. *Am J Hum Genet* 2000;66:790-818.
10. Wu BL, Austin MA, Schneider GH, Boles RG, Korf BR. Deletion of the entire NF1 gene detected by FISH: Four deletion patients associated with severe manifestations. *Am J Med Genet* 1995;5:528-35.
11. Oguzkan S, Terzi YK, Cinbis M, Anlar B, Aysun S, Ayter S. Molecular genetic analyses in neurofibromatosis type 1 patients with tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;165:167-71.
12. Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 2000;66:393-401.
13. Upadhyaya M, Spurlock G, Monem B, et al. Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas. *Hum Mutat* 2008;29:112-22.
14. Messiaen LM, Callens T, Roux KJ, et al. A towards and efficient and sensitive molecular genetic test for neurofibromatosis type 1 (NF1). *Eur J Hum Genet* 2001;9:314.
15. Toliat MR, Erdogan F, Gewies A, et al. Analysis of the NF1 gene by temperature gradient gel electrophoresis reveals a high incidence of mutations in exon 4b. *Electrophoresis* 2000;21: 541-4.