

Nörofibromatozis Tip 1 Olgularında DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonunun Klinik Önemi

CLINICAL SIGNIFICANCE OF DNA REPAIR GENES EXPRESSIONS IN NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1 CASES

Duygu DURSUN¹, Safiye AKTAŞ¹, Ayşe Pınar ERÇETİN¹, Zekiye ALTUN¹, Kamer MUTAFOĞLU², Nur OLGUN²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

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. Bu çalışmada DNA onarım genlerinin ekspresyonunu ve onların NF1 hastalarındaki klinik önemini nörofibrom, hamartomatöz lezyon, diğer tümörler ya da ailesel NF1 varlığı ile karşılaştırarak analiz etmek ve gen ekspresyonları ile klinik bulgular arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amaçlandı.

Yöntemler: 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 içermektedir: 36 NF1 hastası (30 çocuk; 6 ebeveyn), hiç bir hastalığı olmayan 8 kontrol olgusu, rabdomiyosarkomlu NF1 olmayan 2 kontrol olgusu çalışmaya alındı. 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 değişiklikleri 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. 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 lezyonlu idi. 1 hastada rabdomiyosarkom (RMS) gözlenmiş, 1 hasta meme kanseri ve 4 hasta da optik gliomlu idi. 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

Safiye AKTAŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji AD
35340 İnciraltı, İZMİR

ekspresyonu azalmış ve istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı. Malign tümör olgularında NF1'li ya da NF1'siz gruplar karşılaştırıldığında gen ekspresyonunda kat değişiklikleri vardı. Maligniteli olgularda DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG ve XPA ekspresyonları arttı. NF1'li RMS olgusu ile NF1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG ve XPA olmak üzere 6 genin ekspresyonu 10 kattan fazla artmış saptandı.

Sonuç: Bulgularımız NF1 olgularındaki klinik bulgulardan tümör gelişimini öngörmek için DNA onarım sistemi ilişkili gen ekspresyon değişikliklerinin rolü olabileceğini göstermiştir. POLB nörofibrom varlığı belirteci, DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG, XPA malign tümör gözlenme belirteci olmaya aday genler olarak saptandı. Bu genlerin ekspresyonlarının daha geniş seri NF1'li ve maligniteli olgularda çalışılması uygundur.

Anahtar sözcükler: Nörofibromatozis Tip 1, DNA onarım genleri, klinik ilişki

SUMMARY

Objective: Neurofibromatosis Type 1 (NF1) is 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 existence of neurofibroma or hamartomatous lesions or other tumours or existence of NF1 in the family. The other aim of this study was to determine whether any relationship between gene expressions and clinical findings.

Methods: NF1 patients and malignancy with NF1 patients were included in this study. In the control group children that they are in the similar age group and they have no disease and no malignancy 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 ± 7.03 (10-30 age) (median 13 age). In the NF1 patients group 17 of them are female, and 19 are male. The mean age at diagnosis is 10.08 ± 8.86 (9 months- 38 age)(median age 8) for children and 40.50 ± 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 over expressed; 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

Nörofibromatozis Tip 1 (NF1), çeşitli fenotiplere sahip, sık görülen otozomal dominant genetik bir hastalıktır (1,2). 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 nörokanoz sendromdur ve 17.

kromozomda meydana gelen bir mutasyonla oluşur (3-5). NF tip 2 (NF2) 22. kromozomda meydana gelen mutasyonla oluşur (6).

NF1 olgularında nörofibromların yanı sıra lösemi, yumuşak doku tümörleri, beyin tümörleri, nöroblastom gibi malign tümörler de gelişebilmektedir (7-10). Kanserin oluşmasında en önemli nedenlerden biri de DNA'da meydana gelmiş olan hatanın düzeltilmemesidir (11-15). Bu durum DNA tamir genlerinin doğru çalışmamasından kaynaklanır (16,17).

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.

GEREÇ VE YÖNTEM

Etik kurul onayı alındıktan sonra NF-1 tanısında geçerli olan klinik kriterlere göre NF-1 tanısı almış ve izlenmekte olan olgular bu çalışmaya alındı. 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 alındı. Kontrol olgular benzer yaş ve cinsiyet dağılımında sağlam bireylerden alındı. Kan örnekleri hastalar zaten rutin incelemeler için kan verdiği sırada alınmış

olup ayrıca bir girişim uygulanmamıştır. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu (PBMC) taze tam kan örneklerinden bekletilmeden histopaque ayırma solusyonu ile yoğunluk gradient santrifügasyonu yöntemiyle izole edildi. İzole edilen PBMC'ler hemen azotta -196°C 5 dakika kadar kısa bir süre şoklandı. Buradaki temel amaç; hücre duvarlarının parçalanmasını sağlayarak elde edilecek olan RNA'nın verimliliğini arttırmaktır. Şoklama işleminin ardından hücreler -80°C de saklandı. Daha sonra bu hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak RNA miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ardından cDNA çevrimi gerçekleştirilerek insan PAHS-042 array kullanılarak ABI cihazı ile *Real Time PCR* dizi analizi ile 84 tane DNA tamir geninin ekspresyonlarındaki artış ve azalışlar değerlendirildi (Tablo).

İstatistiksel Analiz

Analizler SA Bioscience'in data analysis expression sayfasında yapıldı. Bu sitenin kullanımı ücretsizdir. Heat map ve clustergramlar ile gen ekspresyon analizleri desteklendi. T test tabanlı *p* değerli bu sitede değerlendirildi. 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 yapılmıştır. Δ CT değerleri için cut-of olarak 40 alındı.

Tablo. DNA tamir genleri

Sınıfı	Genler
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

BULGULAR

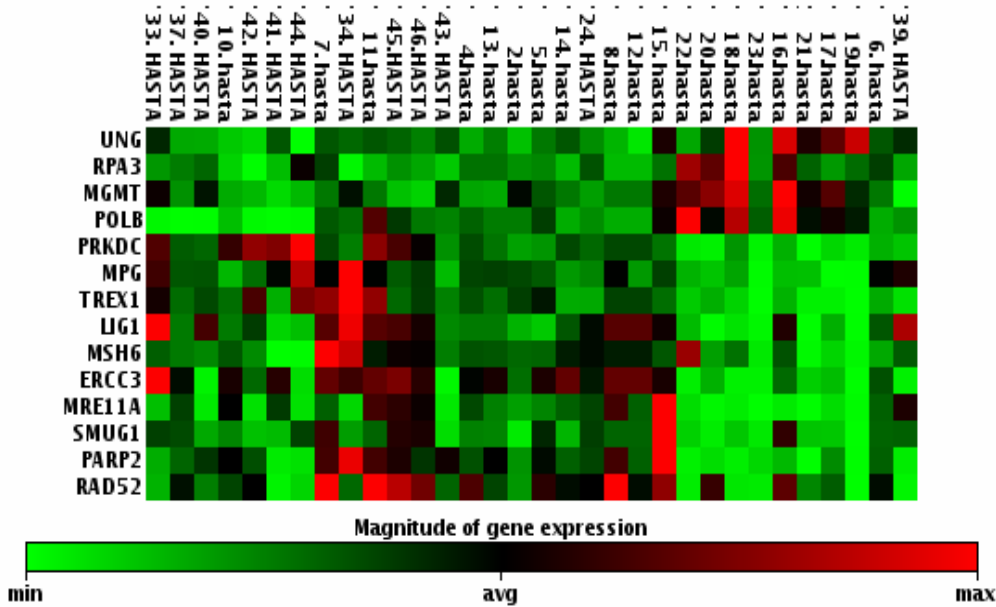
Çalışma toplam 46 olgu içermektedir: 36 NF1 hastası (30 çocuk; 6 ebeveyn), hiç bir hastalığı olmayan 8 kontrol olgusu, rabdomiyosarkomlu NF1 olmayan 2 kontrol olgusuydu. 8 kontrol olgusunun yaş ortalaması $17 \pm 7,03$ (10-30 yaş) (ortanca 13 yaş) idi. NF1 olgularının 17'si kadın 19' u erkekti. NF1'li 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 lezyonlu idi. 1 hastada rabdomiyosarkom gözlenmiş, 1 hasta meme kanseri ve 4 hasta da optik gliomlu idi.

Nörofibromu olan NF1 hastaları ile nörofibromu olmayan NF1 hastaları karşılaştırıldığında (Resim1); nörofibromu olan Nörofibromatozis tip 1 hastaları POLB ekspresyonu artarken; ERCC3, LIG1, MGMT, MRE11A, MPG, MSH6, PARP2, PRKDC, RAD51B, RAD52, RPA3, SMUG1, TREX1 ve UNG ekspresyonu azaldı ($p < 0,05$, T test) (Resim

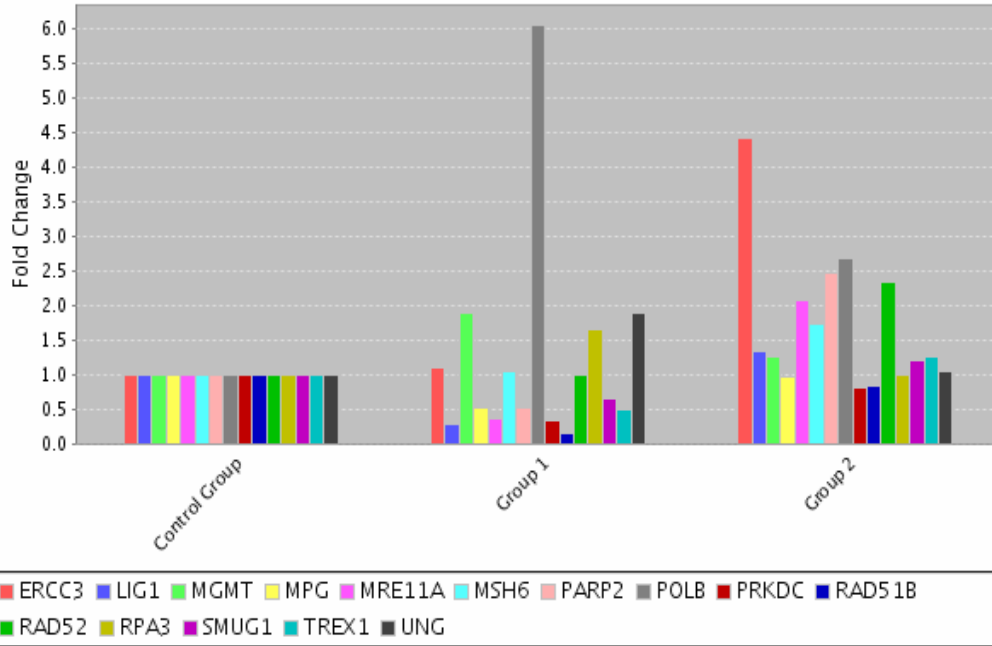
2). Bu değerlendirme için optik gliomlu, meme kanserli ve rabdomiyosarkomlu hastalar çalışma dışı bırakıldı.

LIG1, MPG, MRE11A, PARP2, PRKDC, RAD51B ve TREX1 genlerinin ekspresyonunda meydana gelen yarıdan fazla azalmalar nörofibrom varlığı ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$, T test) (Resim 3). Çalıştığımız 84 gende ERCC1 ($p:0,015$) ve TREX1 ($p:0,026$) genleri ebeveynlerde çocuklara göre istatistiksel anlamlı olarak ekspresyonunun azaldığı saptandı. (Mann-Whitney U Test).

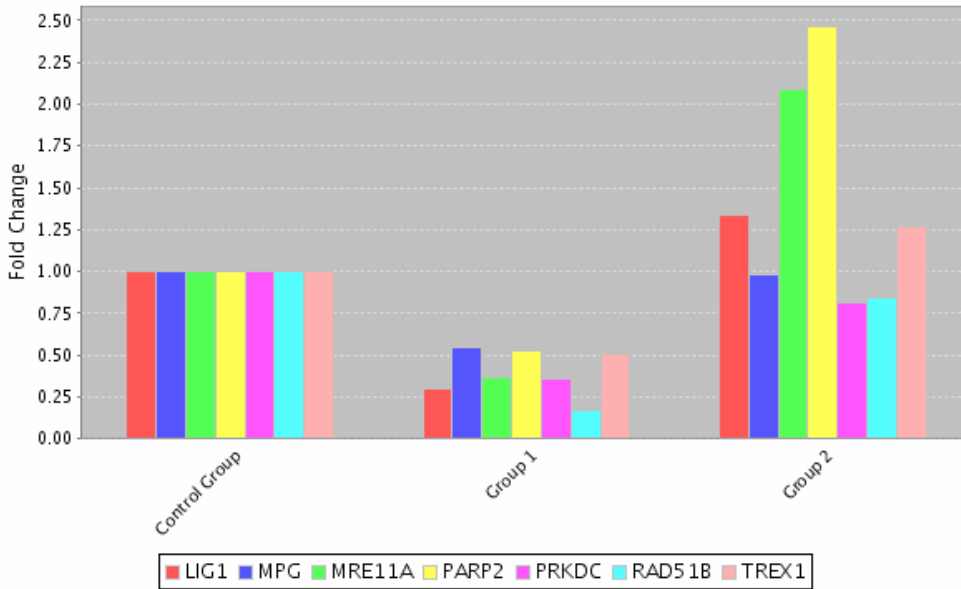
RMS ve meme kanseri gelişen NF1'li 2 olgu ile NF1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında; ATM, CDK7, DDB2, ERCC5, LIG3, MLH1, MUTYH, POLB, RAD52, RPA3, SLK ve XPA gen ekspresyonlarında artış gözlemlendi. BRCA1, BRCA2, ERCC2, ERCC8, MPG, NEIL2, NTHL1, PMS1, RAD50, XAB2, XRCC3 ve XRCC6 genlerinin ekspresyonunda azalma gözlemlendi ($p < 0,05$, T test) (Resim 4). NF 1'li RMS olgusu ile NF 1'siz RMS olguları karşılaştırıldığında DDB2, MGMT, MLH1, POLB, UNG ve XPA genlerinin ekspresyonunda artış gözlemlendi (Resim 5).



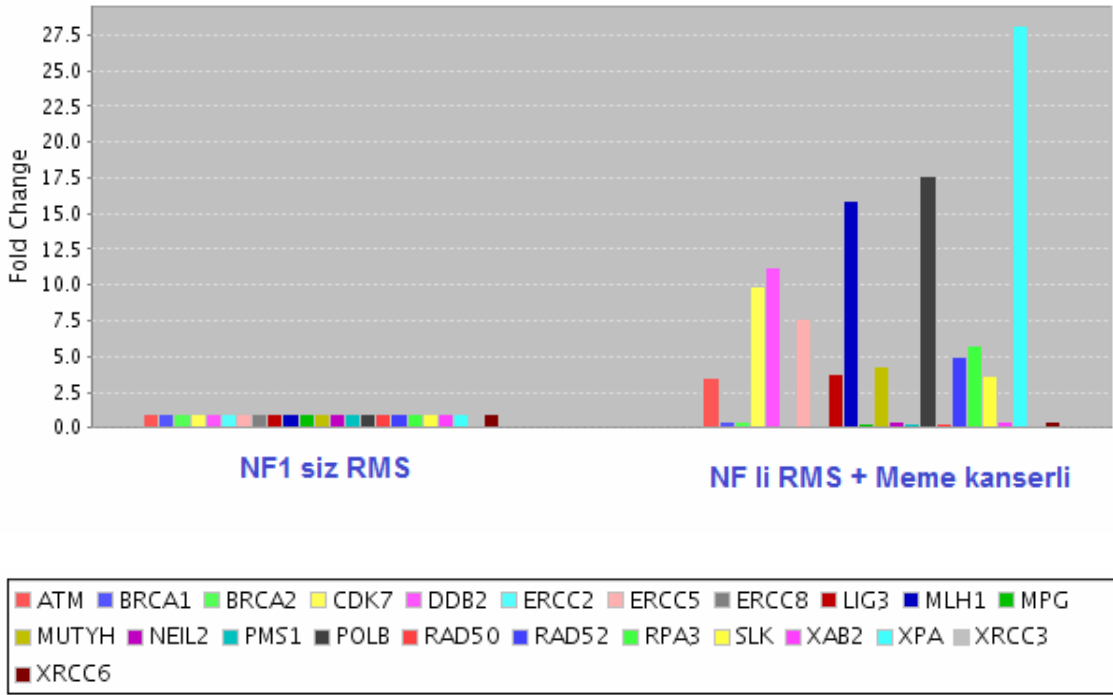
Resim 1. Nörofibromu olan NF1 hastaları ile nörofibromu olmayan NF1 hastaların DNA onarım gen ekspresyonlarının karşılaştırılması



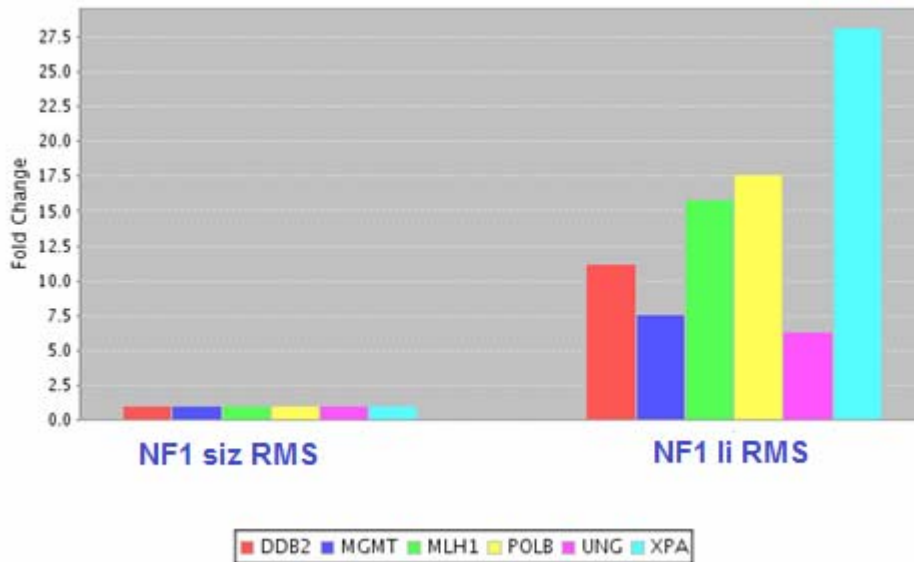
Resim 2. Nörofibrom varlığında (Grup 1: NF var) ekspresyonu değişen genler



Resim 3. Nörofibrom varlığında (Grup 1) ekspresyonu azalan genler



Resim 4. NF1' li rabdomiyosarkom/ meme kanserli olgular ile NF1' siz rabdomiyosarkom olgularının karşılaştırılması



Resim 5. NF1'siz rabdomiyosarkom olguları ile NF1' li rabdomiyosarkom olgularının karşılaştırılması

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 oluşturarak 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 (4,5,18).

Genetik temelli bir hastalıkta izlemde farklı klinik gidişinin nedeninin açıklanmaya çalışılması temeline dayanarak bu çalışmada, öncelikle izlemde malign tümör gelişme riskini öngörücü bir ya da birkaç prediktif gen ekspresyonu saptamak hedef alınmıştır. 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 ve 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 ve TOP3B genlerinin ekspresyonu izlemde öngörülüdür şeklinde istatistiksel olarak *p* değeri ile desteklenen bir sonuca ulaşamadık. Bunun nedeni malign tümör gelişen kontrol olgu sayısındaki azlıktır.

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

riskinin artmasına sebep olduğu düşünüldü. RAD 52 ve MSH 6 gen ekspresyonlarının fazla olduğu durumlarda ise NF1 hastalarında nörofibrom gelişmediği gözlemlendi.

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, XRCC6 ve BP1 gen ekspresyonlarında azalma görüldü. Ailesinde NF1 hastası bulunmayan grupta ise; MGMT, POLB, PRKDC, RAD51C, RAD51B, XAP2, XPA ve XRCC5 gen ekspresyonlarında değişiklik gözlemlenmiştir. Bu genlerden MGMT, POLB ve XPA gen ekspresyonları artarken; PRKDC, RAD51C, RAD51B, XAB2 ve XRCC5 genlerinin ekspresyonlarında azalma oldu. 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 bulunmadı. Bu yüzden saptanan bu ekspresyon azalmaları hamartomatöz lezyona sahip hastalar ile hamartomatözleştürmüş 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 saptandı. 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 belirlendi. Optik gliom gözlenen hastalarda nörofibromlu hastalar gibi benzer ekspresyon paterni gösterdi. 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 saptandı. 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 (19,20). Kanserin oluşmasında en önemli nedenlerden biri de DNA'da meydana gelmiş olan hatanın düzeltilememesidir (21,22). Bu durum DNA tamir genlerinin doğru çalışmamasından kaynaklanır. Eşlik eden tümörlerde çeşitlilik, tümör içi heterojenite, mutasyonlardaki çeşitlilik bu hastalık ve tümör ilişkisini güncel kılmaktadır (23).

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.

Bulgularımız NF 1 olgularındaki klinik bulgulardan tümör gelişimini öngörmek için DNA onarım sistemi ilişkili gen ekspresyon değişikliklerinin rolü olabileceğini gösterdi. POLB nörofibrom varlığı belirteci, DDB2, MGMT, MLH1, POLB UNG ve XPA malign tümör gözlenme belirteci olmaya aday genler olarak saptandı. Bu genlerin ekspresyonlarının daha geniş seri NF1'li ve maligniteli olgularda çalışılması uygundur.

Bu çalışma; Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2012 KB SAG 019 no.lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Cecen E, Ince D, Uysal KM, et al. Soft tissue sarcomas and central nervous system tumors in children with neurofibromatosis type 1. *Childs Nerv Syst* 2011;27: 1885-1893.
2. Ars E, Kruyer H, Gaona A, et al. A clinical variant of

- neurofibromatosis type 1: familial spinal neurofibromatosis with a frameshift mutation in the NF1 gene. *Am J Hum Genet* 1998; 62:834-841.
3. Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, et al. Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum Mutat* 2011;32:213-219.
4. Jentoft M, Giannini C, Cen L, et al. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;12:4:43-57.
5. Kaufmann D, Müller R, Bartelt B, et al. Spinal neurofibromatosis without café-au-lait macules in two families with null mutations of the NF1 gene. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1395-1400.
6. Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn* 2011;13:113.
7. Wang Q, Montmain G, Ruano E, et al. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum Genet* 2003; 112:117-123.
8. Wang Q, Lasset C, Desseigne F, et al. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res* 1999; 59: 294-297.
9. 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;139:96-105.
10. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol* 2010;12:104-113.
11. Whiteside D, McLeod R, Graham G, et al. A homozygous germ-line mutation in the human MSH2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple café-au-lait spots. *Cancer Res* 2002; 62:359-362.
12. Huttner AJ, Kieran MW, Yao X, et al. Clinicopathologic study of glioblastoma in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 890-896.
13. 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; 637:209-214.
14. Etzler J, Peyrl A, Zatkova A, et al. RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. *Hum Mutat*

- 2008; 29:299-305.
15. 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;17:159-164.
 16. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet* 2008;124:105-122.
 17. Win AK, Jenkins MA, Buchanan DD, et al. Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. *J Med Genet* 2011; 48:530-534.
 18. Titze S, Peters H, Währisch S, et al. Differential MSH2 promoter methylation in blood cells of Neurofibromatosis type 1 (NF1) patients. *Eur J Hum Genet* 2010;18:81-87. Epub. Erratum in: *Eur J Hum Genet* 2010;18:509.
 19. Toledano H, Goldberg Y, Kedar-Barnes I, et al. Homozygosity of MSH2 c.1906G-->C germline mutation is associated with childhood colon cancer, astrocytoma and signs of Neurofibromatosis type I. *Fam Cancer* 2009; 8:187-194.
 20. Ricciardone MD, Ozçelik T, Cevher B, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res* 1999; 59: 290-293.
 21. Lin AL, Gutmann DH. Advances in the treatment of neurofibromatosis-associated tumours. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;13. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.144. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23939548.
 22. Yeung JT, Pollack IF, Shah S, Jaffe R, Nikiforova M, Jakacki RI. Optic pathway glioma as part of a constitutional mismatch-repair deficiency syndrome in a patient meeting the criteria for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:137-139.
 23. Thomas L, Mautner VF, Cooper DN, Upadhyaya M. Molecular heterogeneity in malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1. *Hum Genomics* 2012;6:18.