

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**NÖROFİBROMATOZİS (NF1) TÜMÖRLERİNDE TELOMER UZUNLUĞU
VE TELOMERAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Zeynep KILIÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2023**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

NÖROFİBROMATOZİS (NF1) TÜMÖRLERİNDE TELOMER UZUNLUĞU VE TELOMERAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Zeynep KILIÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Eş Danışman: Prof. Dr. Şükriye AYTER

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), toplumda 1/2500 insidansı ile ortaya çıkan bir otozomal dominant hastalık olup ciltte sütlü kahve lekeler, çillenmeler, nörofibrom olarak isimlendirilen farklı boyutlarda iyi huylu tümörler ve malin periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST) gibi belirtiler verir. Bunun yanı sıra kafa sinirlerinde, omurilikte, beyinde tümörler gelişebilmekte ve omurga eğriliği gibi kemik şeklinde bozukluklar meydana gelebilmektedir. Klinik çalışmaları çok fazla değişkenlik gösterir. Bu klinik değişkenliğin ortaya çıkmasındaki görüşlerden biri NF1 geni üzerindeki modifiye edici faktörlerin varlığıdır. Bu modifiye edici faktörlerden biri telomerler, bir diğeri ise mikroRNA'lardır (miRNA). Telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi bugün birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Küçük kodlanmayan RNA'lardan olan miRNA'lar ise, gen ifadesinin post transkripsiyonel düzenleyicileri olarak fonksiyon gösteren RNA'lardır. miRNA'ların, NF1 ile ilişkili tümörler dahil olmak üzere kanserde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, NF1 hastalarından elde edilen kütanöz ve pleksiform nörofibrom tümör dokularındaki telomer uzunlukları, telomeraz aktiviteleri ve miRNA gen ifadelerinin kontrol dokuya göre değerlendirilmesi amaçlandı. Bunun için taze dondurulmuş 11 doku seçildi ve bu dokularda telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi ve seçilen 19 miRNA'nın gen ifadesi kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile değerlendirildi. Analiz sonuçlarına göre özellikle kontrol dokuya göre pleksiform nörofibrom tümör dokularında telomer uzunluğunda kısalma, telomeraz aktivitesinde düşüş, miRNA analizlerinde de yüksek oranda ekspresyon görülmüştür. Kütanöz nörofibrom tümör dokularında da kontrol dokularına göre telomer uzunluğunda, telomeraz aktivitesinde ve miRNA ekspresyon düzeylerinde de farklılıklar gözlenmiştir.

Telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesindeki herhangi bir değişiklik hastalığın ilerlemesini etkileyebilir. NF1 hastalarında telomeraz aktivitesinin ve TERT ekspresyon seviyesinin yüksek dereceli malignite için potansiyel belirteçler olduğunu gösterebilir.

Ekim 2023, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nörofibromatozis tip I, Telomer, Telomeraz , Mikro RNA

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EVALUATION OF TELOMERE LENGTH AND TELOMERASE ACTIVITY IN NEUROFIBROMATOSIS (NF1) TUMORS

Zeynep KILIÇ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Co-Supervisor: Prof. Dr. Şükriye AYTER

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disease that occurs with an incidence of 1/2500 in society and gives symptoms such as milk coffee spots on the skin, freckles, benign tumors of different sizes called neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). In addition, tumor development may happen in the spinal cord, cranial nerves, and brain, also bone deformities such as scoliosis. Clinical studies show a lot of variability. One of the views about these clinical variations is the existence of modifier factors in the NF1 gene. One of these modifying factors is telomeres, and another is microRNAs (miRNA). Telomere length and telomerase activity have been found to be associated with many diseases today. miRNAs, which are one of the small non-coding RNAs, are RNAs that function as post-transcriptional regulators of gene expression. miRNAs have been found to play an important role in cancer, including tumors associated with NF1.

In this thesis study, it was aimed to evaluate telomere lengths, telomerase activities and miRNA gene expressions in cutaneous and plexiform neurofibroma tumor tissues obtained from NF1 patients according to the control tissue. For this purpose, 11 freshly frozen tissues were selected and telomere length, telomerase activity and gene expression of 19 selected miRNAs were evaluated by quantitative real-time PCR method in these tissues.

According to the results of the analysis, shortening in telomere length, decrease in telomerase activity and high expression in miRNA analysis were observed in plexiform neurofibroma tumor tissues compared to control tissues. Differences in telomere length, telomerase activity and miRNA expression levels were also observed in cutaneous neurofibroma tumor tissues compared to control tissues. Any changes in telomere length and telomerase activity may affect disease progression. It may indicate that telomerase activity and TERT expression level are potential markers for high-grade malignancy in NF1 patients.

October 2023, 81 pages

Key Words: Neurofibromatosis type I, Telomere, Telomerase, Micro RNA

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bu uzun yolculukta düzgün ve ilkeli bir akademisyenin nasıl olması gerektiğini kendilerinden öğrenmeye çalıştığım ve hayatımın her döneminde göstermiş oldukları çaba ve emeği saygı ile hatırlayacağım değerli hocam danışmanım Sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'A ve eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şükriye AYTER'e

Doktora tez çalışmamın her aşamasında birebir maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, sonsuz destek ve bilgilerini sunan, her türlü konuda destek verip yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI'ye,

Tez izleme süresince sundukları değerleri fikirler sayesinde tezimin şekillenmesinde katkıları bulunan hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ'ye

Bilgi ve deneyimini esirgemeyerek tezimin istatistiksel analizlerini yapmamı sağlayan sayın Dr. Öğr. Üyesi Mesut AKYOL'a,

Her türlü konuda yardımcı olan TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Laboratuvarları personeline,

Bu süreçte, destekleriyle bana güç veren ve bunu sürekli hissettiren sevgili aileme ve arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep KILIÇ
Ankara, Ekim 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURUMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Nörofibromatozis Tip 1.....	4
2.1.1 Kutanöz nörofibromlar (cNF).....	6
2.1.2 Pleksiform nörofibromlar (pNF)	6
2.1.3 Malign periferik sinir kılıfı tümörü.....	7
2.1.4 Nörofibromatozis tip 1'in klinik özellikleri ve tanı kriterleri	8
2.1.5 NF1 geni ve nörofibromin	10
2.1.6 NF1 tedavisi	12
2.2 Nörofibromatozis Tip 1'de Modifiye Edici Genlerin Rolü.....	13
2.2.1 Telomerler.....	14
2.2.2 mikroRNA'lar	16
2.2.3 Prognostik ve tanısal biyobelirteçler olarak mirna'lar	17
2.2.4 miRNA ve NF1.....	18
2.2.5 mikroRNA biyogenezi.....	18
2.2.6 Telomer ve mikroRNA'lar	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1 Materyal	24
3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasal gereçler ve çözeltiler.....	24
3.2 Yöntem	26
3.2.1 Bireylerin klinik özelliklerine göre NF1 tümör dokularının elde edilmesi, alımı ve dondurulması.....	26
3.2.2 Sıvı azotta doku parçalanması	27

3.2.3 DNA izolasyonu	27
3.2.4 Telomer uzunluğu tespiti için kantitatif-PZR	28
3.2.5 Telomeraz aktivite analizi için örneklerin hazırlanması	30
3.2.6 Telomeraz aktivite analizi için kantitatif –PZR	30
3.2.7 mikroRNA izolasyonu.....	31
3.2.8 cDNA sentezi.....	32
3.2.9 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	33
3.2.10 İstatistiksel analizler	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1 Telomer Uzunluğu ve Aktivitesinin Doğrulanması.....	35
4.2 NF1 Tümör Dokularında Seçilen miRNA’ların Gen İfadesinin Kantitatif Analizi	39
4.3 NF1 Tümör Dokularında Seçilen miRNA’ların Gen İfadesinin İstatistiksel Analizi	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
5.1 Tartışma	56
5.2 Sonuç	69
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER DİZİNİ

dk	: Dakika
g	: Gravite
°C	: Celcius derece
Mb	: Megabayt
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
Nm	: Nanometre
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sn	: Saniye

Kısaltmalar

AGO	: Argonaute proteini
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
CALM	: Café-au-lait lekeleri
cDNA	: Komplementer DNA
CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
cNF	: Kutanöz nörofibrom
DGCR8	: DiGeorge Sendromu kritik bölge 8
DNMT3A	: DNA metil transferaz 3A
dsRNA	: Çift zincirli RNA
EVI	: Ekotropik Viral Entegrasyon
FDA	: ABD gıda ve ilaç dairesi
GAP	: GTPaz aktive edici protein
GTP	: Guanozin trifosfat
kRT-PZR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
LIG3	: DNA ligaz 3
LOH	: Heterozigotluk kaybı
MACS	: Manyetik hücre ayırma
miRNA	: mikroRNA
mitomiR	: mitokondriyel miRNA
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MOMP	: mitokondriyel dış zar geçiçenliği
MPNST	: Malign periferik sinir kılıfı tümörü
mRNA	: Mesajcı RNA
mtDNA	: Mitokondriyel DNA
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüleri
NF1	: Nörofibromatozis tip 1
NF2	: Nörofibromatozis tip 2

OMGP	: Oligodendrosit miyelin glikoproteini
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinom
PI3K	: Fosfoinositid 3 kinaz
pNF	: Pleksiform nörofibrom
pre-miRNA	: primer-miRNA
pri-miRNA	: prekürsör-miRNA
RAS	: Retiküler aktivasyon sistemi
RISC	: RNA ile uyarılan susturma kompleksi
RNAi	: RNA interferansı
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal RNA
shRNA	: Kısa saç tokası RNA
Sirt1	: Sirtuin 1
snoRNA	: Küçük çekirdekçik RNA
snRNA	: Küçük çekirdek RNA
STELA	: Tek telomer uzunluğu analizi
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
TESLA	: Telomer en kısa uzunluk testi
tRNA	: Transfer RNA
UTR	: Translasyona uğramayan bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 miRNA'nın işlenmesi (biyogenezi)	21
Şekil 4.1 Kontrol örneğine göre kalibre edilen NF1 hastalarında ölçülen telomer uzunlukları	36
Şekil 4.2 cNF ile pNF'in ortalama telomer uzunluklarının karşılaştırılması	36
Şekil 4.3 Gerçek zamanlı PZR analizinde kontrol hücre pelletine göre NF1 tümör dokularında telomeraz aktivite eğrisi	37
Şekil 4.4 Gerçek zamanlı PZR analizine göre NF1 tümör dokularında telomeraz aktivite grafiği	38
Şekil 4.5 Gerçek zamanlı PZR analizine göre, cNF ile pNF'in ortalama telomeraz aktivite karşılaştırılması	38
Şekil 4.6 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miRNA analiz grafiği. a: miR-541 dışındaki tüm miRNA'ların ekspresyon grafiği. b: miR-541'e ait ekspresyon grafiği	42
Şekil 4.7 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında her bir miRNA'ya göre ortalaması alınan cNF ve pNF tümör dokularının miRNA analiz grafiği. a: miR-541 dışındaki tüm miRNA'ların ekspresyon grafiği. b: miR-541'e ait ekspresyon grafiği	43
Şekil 4.8 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-128-3p ekspresyon analiz grafiği	44
Şekil 4.9 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-1182 ekspresyon analiz grafiği	44
Şekil 4.10 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-361-5p ekspresyon analiz grafiği	45
Şekil 4.11 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-23a-3p ekspresyon analiz grafiği (TERF: Telomerik tekrar bağlama	46
Şekil 4.12 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-138-5p ekspresyon analiz grafiği	46
Şekil 4.13 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-133a-3p ekspresyon analiz grafiği	47
Şekil 4.14 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-155-5p ekspresyon analiz grafiği	47
Şekil 4.15 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-122-5p ekspresyon analiz grafiği	48

Şekil 4.16 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-217 ekspresyon analiz grafiği	48
Şekil 4.17 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-21-5p ekspresyon analiz grafiği	49
Şekil 4.18 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-107 analiz grafiği	49
Şekil 4.19 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-29a-3p ekspresyon analiz grafiği	50
Şekil 4.20 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-1290 ekspresyon grafiği analiz grafiği (KGA: Kanseri gelişimi ile	50
Şekil 4.21 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-3934-5p ekspresyon analiz grafiği (DFA: Diğer fonksiyonlarla alakalı).....	51
Şekil 4.22 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-22-3p ekspresyon analiz grafiği	52
Şekil 4.23 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-34a-5p ekspresyon analiz grafiği	52
Şekil 4.24 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-484 ekspresyon analiz grafiği	53
Şekil 4.25 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-541-3p ekspresyon analiz grafiği.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Nörofibromatozların gruplandırılması	4
Çizelge 2.2 NF1 tanı kriterleri	10
Çizelge 2.3 Seçilen miRNA'lar ve fonksiyonları	22
Çizelge 3.1 Seçilen miRNA'lar.....	25
Çizelge 3.2 Primer listesi	29
Çizelge 3.3 Kantitatif PZR reaksiyon malzemeleri ve miktarları	29
Çizelge 3.4 Kantitatif PZR reaksiyon malzemeleri ve miktarları	31
Çizelge 4.1 İzole edilen DNA'ların konstrasyon ve saflık değerleri	35
Çizelge 4.2 İzole edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri.....	39
Çizelge 4.3 Kontrol ve tümör doku örneklerinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ verileri.....	41
Çizelge 4.4 Tüm miRNA ekspresyonlarının istatistiksel analizi	54
Çizelge 4.5 Kontrole göre cNF ve pNF gruplarında tüm miRNA değerlerinin istatistiksel analizi	55

1. GİRİŞ

Von Recklinghausen hastalığı veya diğer adıyla Nörofibromatozis tip 1 (NF1 (OMIM#162200)), insan sinir sistemiyle beraber çoklu organ sistemlerini etkileyen en sık gözlenen tek gen hastalığıdır (Sharafi ve Ayter 2018). NF1 deride pigmentasyon bozuklukları (“Café-au-lait” (CALMs)) lekeler, koltuk altı ve kasık bölgelerinde çillenme), iskelet ve kardiyovasküler sistem bozuklukları (skolyoz, hipertansiyon), Lisch nodülü, sinir sisteminde tümörleşmeye yatkınlıkla gibi çeşitli klinik özelliklere sahip, görülme sıklığı 1/2500 olan (Wilson vd. 2021), otozomal dominant bir hastalıktır (Brems vd. 2009, Le ve Parada 2007). Bununla birlikte NF1, merkezi sinir sistemi (optik gliom), periferik sinir sisteminde (nörofibrom), malign periferik sinir kılıf tümörü (MPNST), astrositom ve lösemi gibi farklı tümör ve kanserlere sebep olmaktadır (Le ve Parada 2007, Brems vd. 2009). NF1 hastalarının yumuşak doku sarkomlarını geliştirme riski 50 kat, juvenil miyelomonositik lösemi (JML) riski 200 kat, akut lenfoblastik lösemi (ALL) riski 5 kat, optik glioma geliştirme riski 1000 kat, beyin ve spinal tümör geliştirme riskleri ise normal topluma göre 40 kat daha fazladır (Cichowski ve Jacks 2001).

NF1 hastalığı, 17. kromozomun 17q11.2 bölgesinde NF1 genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar (Shen vd. 1996). Bu mutasyonlar NF1 gen ürünü olan nörofibromin protein sentezini etkileyerek NF1 hastalığını ortaya çıkarır (Brems vd. 2009, Le ve Parada 2007). Nörofibromin, en fazla sinir sisteminde bulunmaktadır. Aynı zamanda yetişkin bireylerde nöronlarda, oligodendrositlerde ve Schwann hücrelerinin yanı sıra keratinositler, adrenal medulla ve beyaz kan hücrelerinde bulunmuştur (Gottfried vd. 2006). Ayrıca, neurofibromin bir tümör baskılayıcı olarak RAS sinyal yolağını negatif regüle eder (Boyd vd. 2009, Trovó -Marqui ve Tajara 2006). NF1, tam penetrasyon gösteren basit bir Mendel bozukluğudur ancak oldukça değişken bir ekspresyon göstermektedir, NF1 hastalarının kliniği hastalar arasında, hatta aynı mutasyonu gösteren aile bireyleri arasında bile farklı olabilmektedir. Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup görüşlerden birisi de kişilerin epigenetik farklılıklarının NF1 genleri üzerine modifiye edici genlerin etkili olabilmesi dolayısıyla NF1 gen ifade düzeylerindeki değişiklikler olarak düşünülmektedir. Çeşitli aday genlerin klinik

varyasyonlar için modifiye edici etkisi çalışılmaktadır. Bu değişiklikler arasında telomer uzunluğunun da etkili olabileceği son yıllarda yapılan çalışmalarla vurgulanmaktadır.

Telomerler doğrusal kromozomların uçlarındaki tekrarlayan nükleotid dizileridir, kromozom replikasyonunun sonlanmasında kritik rol oynarlar. Telomerlerin yapısı ilk kez Hermann Muller (1938) ve Barbara McClintock (1941) tarafından drozofila ve mısır ile yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır. Muller kromozomların telomerlerindeki bu yapıların bütünlüğü korumak için var olduğunu vurgulamış, telomer terimini ilk kullanmış ve daha sonra McClintock bu yapıların kromozom stabilitesi için önemli olduğunu vurgulamıştır.

Telomer uzunluğu bugün birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur (Mayer vd. 2006). Miyeloid malignansilerde görülen sitogenetik anomaliler/ anöploidiler normalden kısa telomer uzunluğu ile ilişkili bulunmuştur (Hartmann vd. 2005). Telomer uzunluğu telomeraz enzimi ile korunur. Son yıllarda telomer uzunluğunun lösemi ve meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin prognozu için güçlü ve yeni bir hücrel belirteç olabileceği vurgulanmaktadır. Meena ve arkadaşları nörofibromatoziste MPNST'ler (Malin periferik sinir kılıfı tümörleri) için telomer uzunluğunun önemli olduğunu göstermişlerdir ancak pleksiform ve kutanöz nörofibromada durumun nasıl olduğu konusunda detaylı bir bilgi mevcut değildir. Aynı araştırmacı grubu daha önce de MPNST'lerde telomeraz enziminin durumunu çalışmışlar ve telomeraz enziminin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği olasılığını gündeme getirmişlerdir (Mantripragada vd. 2008).

Bir diğer belirteç olarak da NF1 ile ilgili literatürde bir çok aday modifiye edici gen bulunmaktadır (Sharafi ve Ayter 2018, Ratner ve Miller 2015). Bu aday modifiye edici genlerden birisi de mikroRNA (miRNA)'lardır (Ratner ve Miller 2015). miRNA'lar hastalıklarda potansiyel birer biyobelirteç görevi görmektedirler. miRNA'lar tümör gelişimi ve progresyonunda, gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptirler (Masliah-Planchon vd. 2013). miRNA'ların, yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmalarından bu yana nörofibromatoz tip 1 (NF1) ile ilişkili tümörler dahil olmak üzere kanserde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur.

NF1, en yaygın kalıtsal tümör yatkınlık sendromudur ve malign periferik sinir kılıfı tümörlerinin (MPNST'ler) gelişimi yoluyla maligniteye yol açabilir. Giderek daha açık hale geliyor ki miRNA'lar bu süreçte önemli bir rol oynar ve tümör oluşumunun hem tanısı hem de prognostik belirteçleri olarak kullanıma potansiyeline sahiptirler (Sedani vd. 2012).

Bu nedenle, bu tezde hem telomer uzunluğu durumunun hem de miRNA 'ların NF1 ile ilişkili tümörlerde nasıl bir etkisi olduğunun görülmesi amaçlanmıştır. NF1 kliniği için önemli olabilecek telomer uzunluklarının ve telomerase aktivitesinin miktarını saptamayı, farklılıklarını ortaya koymayı ve bu farklılıkları tümör türüne spesifik hücresel bir belirteç olarak kullanabilme olasılığını göstermek, miRNA'ların da bu süreçte prognostik ve gen ifadesi düzeyinde ne gibi etkilerinin olabileceğinin görülmesi amaçlanmıştır. Onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan miRNA'lar, NF1 tümörleri için hedefe yönelik tedavi adaylarıdır (Sedani vd. 2012). Bu nedenle, bu küçük RNA'ların incelenmesinin sonunda önemli bir fark yaratacağı umulmaktadır.

2. KURUMSAL TEMELLER

2.1 Nörofibromatozis Tip 1

NF1 hastalığı, kromozom NF1 (*OMIM# 613113*; kromozom 17q11.2) geninin kalıtsal otozomal dominant ya da *de novo* mutasyonlarla fonksiyonunu kaybetmesiyle meydana gelmektedir (Wegscheid vd. 2018). Nörofibromini kodlayan NF1 geni 1990 yılında tanımlanmıştır (Gutmann vd. 2017). Etnik farklılıklar hastalık penetransında ve ekspresivitede farklılıklar oluşturabilir (Wilson vd. 2021).

NF1 hastalığı nörofibromatozlar olarak adlandırılan NF1, nörofibromatozis tip 2 (NF2) ve schwannamatozu içeren bir grup nörogenetik bozukluktan biridir. Bu nörogenetik bozukluklar hem genetik hem de klinik anlamda birbirinden farklıdır ve hepsi otozomal dominant kalıtsal birer bozukluktur (Gutmann vd. 2017, Cimino ve Gutmann 2018). Bununla birlikte bu bozuklukların tamamının klinik fenotiplerinde periferik sinir kılıfı tümörleri ortaktır. Aynı zamanda NF1 bu 3 durumdan en yaygın olanıdır. NF1 otozomal dominant bir sendrom olmasına rağmen vakaların yarısında NF1 geninde *de novo* mutasyonlar meydana gelmektedir ve bu bireylerin ailesel öykülerinde NF1 geçmişi bulunmamaktadır (Cimino ve Gutmann 2018).

Çizelge 2.1 Nörofibromatozların gruplandırılması (Cimino ve Gutmann, 2018)

Hastalık	Gen	Neoplastik olmayan klinik fenotip	Kanser fenotipi
Nörofibromatozis Tip 1	NF1	Öğrenme, davranışsal ve dikkat eksiklikleri	Optik gliom
		Uzun kemik displazisi	Beyin sapı gliomu
		Pigment abnormaliteleri (CALMs, çillenme, Lisch nodülleri)	Kutanöz nörofibromlar
Nörofibromatozis Tip 2	NF2	Juvenil katarakt	Vestibüler schwannoma
		Retinal hamartomlar, epiretinal membranlar	Periferik ve kranial schwannoma
		Büyük CALM'lar (ancak NF1'den az)	Menenjiom
Schwannamatoz	LZTR1		Spinal tümör glioma
	SMARCB1		Schwannomatozlar

Tarihsel olarak bakıldığında 1300'lere hatta belki de Helen zamanlarına dayanan, NF1 belirtileri olan bireylerin belgelenmiş tanımları ve tasvirleri bulunmaktadır. Ancak NF1 ilk olarak 1881'de Friedrich von Recklinghausen tarafından tanındı ve hastalığa “nörofibroma” adını vermiştir (Cimino ve Gutmann 2018, Wilson vd. 2021). Yirminci yüzyılın sonunda bu bozukluk NF1 ve NF2 olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır (Wilson vd. 2021). İlk yayınlanan monograflar bu hastalığın kalıtsal doğasını vurgularken, 1988'de Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) Konsensus Geliştirme Konferansı “Consensus Development Conference” kullanımda olan NF1 tanı kriterlerini bir araya getirmiştir (Cimino ve Gutmann 2018, Wilson vd. 2021).

NF1'in tanımlayıcı özelliği nörofibromlardır. Nörofibromlar periferel sinir sisteminde gelişen iyi huylu sinir kılıfı tümörleridir. Nörofibromların çeşitli klinik görünümüleri bulunmaktadır. Ayrıca nörofibromlar farklı bireylerde önceden tahmin edilemeyen farklı sayılarda ve büyüklüklerde bulunabilir. Kutanöz (cNF) ve pleksiform pleksiform (pNF) nörofibromlar olmak üzere iki ana alt tipe ayrılmaktadırlar (Jiang vd. 2021). En yaygın NF1 ilişkili tümörler kutanöz ya da pleksiform olabilen benign tümörlerdir (Pasmant vd. 2011). Nörofibromlar, spinal, periferel ya da kranyal sinirlerle yakından ilişkili bir sinir kılıfı tümörüdür (Gutmann vd. 2017). Etkilenen bireylerde farklı klinik semptomlar gözlemlenebilmektedir. Klinik belirtiler pigment abnormaliteleri (CALM'lar, deri kıvrımları “skinfold freckling”, Lisch nodülleri), periferel (nörofibromlar, MPNST'ler) ve merkezi (optik gliomlar ve beyin sapı gliomları) sinir tümörleri, kemik abnormaliteleri, vaskülopati ve diğer kanserleri içeren belirtilerdir. Bunlara ek olarak NF1'li çocukların %80'inden fazlasında öğrenme güçlükleri, sosyal algı bozuklukları (otizm spektrum bozukluğu) veya dikkat eksikliği bulunmaktadır (Wegscheid vd. 2017).

Nörofibromlar neoplastik Schwann hücreleri, nöronlar, fibroblastlar, immün hücreler ve endotelial hücrelerle birlikte kollajen, fibronektin, laminin ve hyolüronik asit gibi ekstraselüler matriks bileşenlerini içeren heterojen tümörlerdir (Jiang vd. 2021).

Nörofibromları oluşturan en büyük faktör NF1+/- hücrelerin heterozigotluk kaybına (LOH, “loss of heterozygosity”) uğramasıdır. LOH'a uğrayan NF1+/- hücreler NF1-/-

hücrelere dönüşmektedirler (Le ve Parada 2007, Bottillo vd. 2009). Nörofibromların neoplastik hücreleri Schwann hücreleri olarak kabul edilmektedir ve nörofibromların türünde nörofibromlardaki Schwann hücrelerinin kökeni rol almaktadır.

Pleksiform nörofibromların nöral krest hücrelerinden gelişen Schwann hücrelerinden, nörofibromların ise “Skin-Derived Precursor” hücrelerinden köken aldığı hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Brossier ve Carroll 2012).

2.1.1 Kutanöz nörofibromlar (cNF)

cNF’ler dermal sinir dalları boyunca gelişen ve bu nedenle vücudun hemen hemen her bölgesinde ciddi şekilde rahatsızlık ve/veya şekil bozukluğu oluşturan çok sayıda yumuşak nodüllerdir. cNF’ler NF1 hastalarının çoğunda gelişmektedir ve NF1 hastalığının en yaygın özelliklerinden biridir.

cNF’ler tipik olarak erken adölesan dönemde başlamakta, sayıları ve büyüklükleri farklı bireylerde değişiklik göstermektedir. cNF’ler büyümediklerinden malign dönüşüme uğramazlar. Ancak, NF1 hastalığına sahip hamile kadınlar sıklıkla yeni cNF’ler geliştirmektedirler ve bu durum cNF’lerin östrojen hormonları tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir (Jiang vd. 2021).

2.1.2 Pleksiform nörofibromlar (pNF)

pNF’ler, cNF’lerden farklı klinik özellikler göstermektedir. pNF’ler doğumda çeşitli sinir pleksuslarında gelişirler ve yaşla birlikte büyümektedirler (Jiang vd. 2021). Genellikle konjenitaldir ya da NF1 hastalarının %30-%50’sinde erken çocukluk döneminde görülmektedir. pNF’lerin sayısı ve büyüklüğü aynı aile içerisinde bile hastadan hastaya farklılık göstermektedir (Pasmant vd. 2011). Bazı pNF tümörler küçüktür ve sadece klinik görüntüleme ile belirlenebilirler ancak bazıları büyüyerek kilolarca ağırlıkta olan tümörlere dönüşebilmektedir. Bu tür pNF’ler bulundukları

çevreyi sıkıştırarak fazla miktarda ağrı oluşumuna, nörolojik fonksiyon bozukluğuna ve kemik deformasyonuna neden olabilmektedir (Jiang vd. 2021).

pNF'ler hücresel düzeyde heterojen, esas olarak nörofibromların patojenik hücre tipi olan Schwann hücrelerinden, fibroblastlardan, mast hücrelerinden, nöronlardan, vasküler elemanlar ve perinöral hücrelerden oluşan tümörlerdir. pNF'ler iyi huylu tümörlerdir ancak iç organlara yakın olmaları nedeniyle yaşamsal tehdit oluşturabilirler ve yaşam kalitesini düşürmektedirler (Pasmant vd. 2011). Ayrıca pNF'lerin yaşam boyunca malign transformasyona uğrayıp, malign periferik sinir kılıfı tümörüne (MPSKT) dönüşme riski %8-13 arasındadır (Jiang vd. 2021). İnternal pNF'ler ile MPSKT'ler arasında oldukça güçlü bir ilişki bulunmaktadır ve internal pNF'e sahip hastaların, sahip olmayan hastalara göre MPSKT geliştirme ihtimalleri 20 kat daha fazladır (Pasmant vd. 2011).

2.1.3 Malign periferik sinir kılıfı tümörü

Periferik sinir kılıfı diferansiyasyonu gösteren sarkomlar malign periferik sinir kılıfı tümörü adını alır. Sporadik ya da NF1 üzerinde gelişir. MPSKT'ler tedavi edilmesi en zor sarkom maligniteleri arasında yer almaktadır ve NF1 hastaları arasında önde gelen ölüm sebebidir (Jiang vd. 2021).

MPSKT'ler yüksek oranda metastatiktir ve genellikle prognozu kötüdür (Pasmant vd. 2011). MPSKT daha çok büyük sinir traktüsleri üzerinde lokalize olur, en sık ekstremiteler ve gövde sinirlerinin proksimalinde yerleşir, daha az olarak baş-boyun bölgesinde yer alır. NF1 olgularındaki MPSKT'leri santralde lokalize olur, bu nedenle daha kötü prognoz gösterir. Nörofibromların sayısı ve deri altı nörofibrom yükü MPSKT gelişimi için önemli bir risk faktörüdür (Daras ve Kaley 2015).

Knudson'un iki vuruş hipotezine göre tümörögenез oluşabilmesi için NF1 geninin kalan fonksiyonel kopyasında oluşan bir somatik mutasyonun genin işlevselliğini bozması gerekmektedir (Masliah-Planchon vd. 2013, Pasmant vd. 2011). pNF'ler ve

MPSKT'lerden izole edilen Schwann hücrelerinde NF1 LOH bulunmaktadır (Pasmant vd. 2011). NF1 geninin iki kopyasının da mutasyonlarla inaktif hale gelmesi RAS sinyal yolağının indüklenmesine neden olmaktadır ve tümörögenез için gerekli görünmektedir ancak tümörögenез için yeterli değildir (Masliah -Planchon vd. 2013).

pNF'lerde, CDKN2A/B lokus delesyonları dahil olmak üzere ek mutasyonlar bildirilmiştir. MPSKT'lerde ise TP53, RB1, CDKN2A, TWIST1, BIRC5, TOP2A ve SOX9 gibi Schwann hücre farklılaşmasında yer alan genlerde farklı ekspresyon profili olduğu bildirilmiştir (Masliah-Planchon vd. 2013).

2.1.4 Nörofibromatozis tip 1'in klinik özellikleri ve tanı kriterleri

NF1 otozomal dominant bir hastalıktır ve eşey germ hücrelerinde "germline" oluşan NF1 mutasyonuna sahip tüm insanlar bu hastalığa sahiptir. Ancak, aynı mutasyona sahip ailelerdeki bireylerde dahil olmak üzere hastalar farklı klinik özellikler gösterebilmektedir. NF1'in yanı sıra bazı kişiler segmental ya da mozaik NF1 olarak adlandırılan sendroma sahiptir ve vücutlarının sadece bir kısmında hastalığın belirtilerini gösterebilmektedir. Segmental ya da mozaik NF1 muhtemelen fetal gelişim sırasındaki bir somatik NF1 mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Hem NF1 hem de mozaik NF1'de NF1 mutasyonu, mutasyona uğrayan aleldeki nörofibrominin kaybıyla sonuçlanmaktadır (Gutmann vd. 2017).

NF1 hastaları geniş bir spektrumda çeşitli klinik özellikler göstermektedirler. Ancak bu özellikler 3 ana kategori altında toplanabilir:

- i.** Malign olmayan klinik özellikler kutanöz ve pleksiform nörofibromlar, optik gliom ve beyin sapı gliomları, pigment abnormaliteleri, kemik deformiteleri, kardiyovasküler abnormaliteler ve öğrenme eksikliklerini kapsamaktadır.
- ii.** Sinir sisteminin malign tümörleri glioblastomlar ve MPNST içermektedir
- iii.** Sinir sistemi ile ilgili olmayan malign tümörler ise meme kanseri, lösemi, lenfoma, gastrointestinal stromal tümörler, feokromasitoma ve rabdomyosarkomdur. Tüm bu

klirik özelliklerin yanı sıra nörofibromlar NF1 hastalığı için ayırt edicidir (Jiang vd. 2021).

NF1 için henüz bir genotip-fenotip korelasyonu bulunmasa bile bazı istisnalar bulunmaktadır:

- i.** Tüm NF1 geninde 1,4 Mb delesyona sahip bireyler tipik olarak yüz dismorfizmi, zihinsel yeteneklerde azalma ve kanser insidansında artış göstermektedirler (Gutmann vd. 2017).
- ii.** NF1 hastalarının ~1'inde 1809. kodon etkilenmektedir ve bu hastalar tipik olarak CALM'lara, kısa boya ve pulmoner stenoza sahiplerdir ancak dışarıdan görülebilen pleksiform veya dermal nörofibromları bulunmamaktadır (Gutmann vd. 2017).
- iii.** 17. ekzonda 3 bp  er eve delesyonuna (c0.2970-2972 delAAT) sahip hastalar hafif bir fenotip gösterirler ve kutanöz nörofibromları veya klinik olarak belirlenebilen pleksiform nörofibromları bulunmamaktadır (Sharafi ve Ayter 2018).
- iv.** NF1 geninin 844-848 kodon bölgesinde meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar NF1 hastalarında daha şiddetli bir fenotiple ilişkilidir (Sharafi ve Ayter 2018).
- v.** Splays bölgesi germline mutasyonları MPNST ve santral sinir sistemi gliomları geliştirme eğiliminde artışla ilişkilidir (Wilson vd. 2021).
- vi.** 28. ekzon çerçevesinde duplikasyon "in-frame duplication", 80 bp delesyon mutasyoları, Watson sendromu olarak da bilinen çoklu caf -au-lait lekeleri, pulmonik stenoz ve mental retardasyon ile ilişkilidir ancak Lisch nodülleri ve nörofibrom geliştirme sıklığı düşüktür (Wilson vd. 2021).
- vii.** Kromozom 15'teki SPRED1 mutasyonları. Leguis sendromu olarak da bilinmektedir. Caf -au-lait varlığı ve çillenme vardır fakat periferik sinir tümörleri veya göz ile ilgili bulgular yoktur. Makrosefali ve lipomlar daha yaygındır (Wilson vd. 2021).

NF1 kliniğinin altında yatan mekanizmalar değişebilmektedir. Bazı belirtiler NF1 haployetmezliğinden "haploinsufficiency" kaynaklanırken bazı semptomlar için

bialellik NF1 inaktivasyonundan ya da hormonlar veya diğer genetik değişiklikler gibi modifiye edici faktörlerin eklenmesini gerektirebilir. Örneğin CALM'ların ve nörofibromların gelişimi için bialellik NF1 inaktivasyonu gerekirken, MPNST gelişimi için TP53 mutasyonu gereklidir (Gutmann vd. 2017). Çizelge 2.2'de NIH tarafından belirlenmiş NF1 hastalığının tanı kriterleri verilmiştir. Çizelgedeki kriterlerden en az iki tanesine sahip olmak NF1 tanısı almak için yeterlidir (Cimino ve Gutmann 2018).

Çizelge 2.2 NF1 tanı kriterleri (Cimino ve Gutmann 2018).

NF1 teşhisi için aşağıdaki kriterlerden 2 veya daha fazlası gereklidir:

- 6 veya daha fazla CALM (ergenlikten önce >0,5 cm; ergenlikten >1,5 cm)
- 2 veya daha fazla Lisch nodülü
- Kemik deformiteleri
- Aksiller veya inguinal çillenme
- Optik gliomlar
- Nörofibromlar (herhangi bir türde 2 veya daha fazla ya da 1 pleksiform nörofibrom)
- NF1 tanısı almış 1. derece akraba

Fakat çizelge 2.2'deki kriterlerin yanı sıra NF1 genindeki mutasyonu gösteren mutasyon analizinin de tanı kriterlerine eklenmesi önerilmektedir (Wilson vd. 2021).

2.1.5 NF1 geni ve nörofibromin

NF1 geni 17q11.2 bölgesinde yer almakta ve RAS-GTPaz aktive edici (RAS-GAP) bir protein olan nörofibromini kodlamaktadır. Nörofibromin RAS sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. RAS sinyal yolağı (yani MAPK ve PI3K/AKT/mTOR) hücre

proliferasyonu, hayatta kalma ve farklılaşma ile ilgili bir yoldur (Masliah-Planchon vd. 2013).

Nörofibromin nöronlar, glial hücreler, immün hücreler, endotelial hücreler ve adrenal medullanın içindeki hücreler gibi birçok hücre tipinde eksprese edilmektedir ancak farklı hücrelerdeki fonksiyonları muhtemelen farklıdır (Gutmann vd. 2017).

NF1 geni 350 kb'lık DNA üzerine dağılmış 61 ekzondan oluşmaktadır. Başlangıçta NF1 geni 57 ekzon olarak tanımlanmıştır ancak ilerleyen yıllarda geçici olarak 9a, 10a-2, 23a ve 48a olarak adlandırılan 4 tane "alternatif splicing" ekzonu keşfedilmiştir. Fakat bu numaralandırma sisteminin yol açtığı kafa karışıklığı ve tutarsızlıkların giderilmesi adına NF1 geninin ekzonları bulundukları yere göre tekrar isimlendirilmiştir. Dolayısıyla bu ekzonlar 11alt12 (önceden 9a), 12alt13 (önceden 10a-2), 30alt31 (önceden 23a) ve 56alt57 (önceden 48a) olarak isimlendirilmişlerdir (Anastasaki vd. 2017, Sharafi ve Ayter 2018).

NF1'deki mutasyonların moleküler anlamda tanımlanması zor olmaktadır (Gutmann vd. 2017). Bu durum genin büyüklüğü, mutasyona yatkın bölgelerin "hotspot" olmaması ve mutasyon çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Gutmann vd. 2017, Sharafi ve Ayter 2018). Fakat, Koczkowska ve arkadaşları (2018) yılında NF1'de meydana gelen bir yanlış anlamlı mutasyon için bir mutasyona yatkın bölge göstermişlerdir. Bu yanlış anlamlı mutasyonlar akrabalığı olmayan probandların ~ 0,8'ini etkilemektedir (Koczkowska vd. 2018).

NF1 geninin büyük boyutu nedeniyle %85-90 nokta mutasyonu, %5-10 mikrolelesyonlar ve %2 ekzon duplikasyonları veya delesyonları olmak üzere çeşitli mutasyonlara eğilimlidir.

1485 tanımlanmış mutasyonun %80'i erken sonlanma kodonu oluşması veya "truncated" nörofibromin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Örneğin NF1 geninin 5'

ucunda meydana gelen mutasyon kümesi hasta bireyleri optik sinir gliomlarına yatkın hale getirebilmektedir (Wilson vd. 2021).

Nörofibrominin 360 amino asitlik bir bölgesi memeli GTPaz aktive edici proteininin (GAP) katalitik bölgesiyle homoloji göstermektedir. Proteinin bu bölgesi NF1-GAP ilişkili domain olarak bilinmektedir ve NF1 geninin merkezi kısmından kodlanmaktadır. GAP proteini, intrinsik GTPaz aktivitesini stimüle ederek Ras onkoproteininin aktivitesini “downregüle” etmektedir. Bu nedenle nörofibromin Ras aracılı sinyal iletim mekanizmasının parçasıdır (Upadhyaya vd. 2003, Sharafi ve Ayter 2018).

2.1.6 NF1 tedavisi

NF1 belirtileri, belirtilerin şiddeti ve prognoz büyük ölçüde değişkenlik gösterse de bireylerin yaşamı boyunca kademeli olarak ilerlemektedir. Şu an için kesin bir tedavi bulunmamasıyla birlikte klinik yönetim hastaların gözlemlenmesi, genellikle cerrahi yöntemler olmak üzere semptomatik tedavilerle sınırlıdır (Gutmann vd. 2017).

Cerrahi yöntemler nörofibromların başlıca tedavi şekli olsa da büyük pleksiform nörofibromlar kısmen çıkartıldıktan sonra nüksetme oranları yüksektir. NF1 ile ilişkili tümörlerin büyümesinde çok sayıda hücreyel yolak yer almaktadır bu nedenle bir fikir birliğine varılamamıştır. Bununla birlikte hedefe yönelik tedaviler etki gösterebilmektedir. Nörofibromlarda Ras-GTP ifadesi arttığından anti-Ras tedaviler idealdir. Pleksiform nörofibromlarda Ras sinyal yolağını ve diğer yolakları hedefleyen Tipifarnib, Pirfenidon, Sirolimus, Pegile interferon alfa-2b ve İmatinib gibi ajanlar faz II klinik çalışmalarda kullanılmıştır. MEK ve fosfoinositid 3 kinazı (PI3K) inhibe eden ajanlar gibi Ras sinyal yolağının “downstream” efektörlerini etkileyen terapötik stratejiler umut vericidir. Bir MEK inhibitörü olan Selumetinib (Koselugo, AstraZeneca), ameliyat edilemeyen pleksiform nörofibromları olan en az 2 yaşındaki pediyatrik NF1 hastalar için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Nisan 2020’de onaylanmıştır. Bunun yanı sıra mTOR yolağının bir inhibitörü olan Rapamisin, AKT aktivasyonunu indüklediğinden terapötik kullanımı sınırlıdır (Tamura 2021).

2.2 Nörofibromatozis Tip 1’de Modifiye Edici Genlerin Rolü

Nörofibromatozis tip 1 hastalarının kliniği hastalar arasında, hatta aynı mutasyonu gösteren aile bireyleri arasında bile farklı olabilmektedir. Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup görüşlerden birisi de modifiye edici genlerin etkili olabileceğidir. Çeşitli semptomlar için farklı modifiye edici genler çalışılmaktadır. (Wallace ve Chalkia, 2013).

NF1 ile ilgili literatürde bir çok aday modifiye edici gen bulunmaktadır (Sharafi ve Ayter, 2018, Ratner ve Miller, 2015). Bu modifiye edici faktörlerden biri telomerler, bir diğeri ise mikroRNA’lardır (miRNA). Telomer uzunluğu ve aktivitesi bugün birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Küçük kodlanmayan RNA’lardan olan miRNA’lar ise, gen ifadesinin post transkripsiyonel düzenleyicileri olarak fonksiyon gösteren RNA’lardır. miRNA’ların, yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmalarından bu yana nörofibromatoz tip 1 (NF1) ile ilişkili tümörler dahil olmak üzere kanserde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur.

Ayrıca son yıllarda mitokondrilerle yapılan çalışmalarda mitokondrilerin fonksiyonundaki farklılıkların da bir modifiye edici faktör olarak, NF1 hastalarının farklı fenotipler göstermesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşünülmektedir (Sharafi ve Ayter, 2018).

miR-10b, miR-29c, miR-34a, miR-204, miR-21, miR-107, miR-214, gibi miRNA’ların yanı sıra, vitamin D ve vitamin D reseptörü, NF1, geninde gömülü olan OMGP, EVI2A ve EVI2B genleri, Ras ve Spred1, süksinat dehidrojenaz ve TRAP1 proteinleri, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ve telomeraz enzimi (telomeraz ters transkriptaz (TERT) mRNA’sı ve telomeraz aktivitesi) NF1 hastalarında önemli olabilecek modifiye edici genlerden bazılarıdır (Sharafi ve Ayter 2018, Ratner ve Miller 2015).

2.2.1 Telomerler

Telomerler doğrusal kromozomların uçlarındaki tekrarlayan nükleotid dizileridir ve kromozom replikasyonunun sonlanmasında kritik rol oynarlar. Telomerlerin yapısı ilk kez Hermann Muller (1938) ve Barbara McClintock (1941) tarafından drozofila ve mısır ile yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır. Muller kromozomların telomerlerindeki bu yapıların bütünlüğü korumak için var olduğunu vurgulamış, telomer terimini ilk kullanmış ve daha sonra McClintock bu yapıların kromozom stabilitesi için önemli olduğunu vurgulamıştır. Elizabeth Blackburn, Carol Greider, ve Jack Szostak (2006) 2006 yılında da kromozomların telomer ve telomerazlar sayesinde korunduğunu konu alan çalışmaları ile Nobel ödülü almışlardır. Bundan sonra gerçekleşen yoğun çalışmalar sayesinde telomerler hakkında çok fazla bilgi edinilmiştir.

Telomerler kromozomların uç kısımlarında yer alan kodlamayan “TTAGGG” tekrarlarıdır (Moyzis vd.1988). Üç üstü uçda G den zengin tek zincir DNA kendi üzerinde kıvrılarak bir ilmek yapısı oluşturur ve bu ilmek “T-loop” olarak adlandırılır. Telomer yapısında 6 proteinin yer aldığı , “shelterin” kompleksi tarafından korunur ve stabilize edilir (De Lange 2005, Palm and de Lange 2008). DNA replikasyonunun özelliği nedeni ile telomer her hücre bölünmesinde kısalır ve kritik uzunluğa eriştiği zaman hücreler bölünmelerini durdururlar (Greider 1998, Hayflick 1998).

Telomer uzunluğu bu gün birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur (Mayer vd. 2006). Miyeloid malignansilerde görülen sitogenetik anomaliler/ anöploidiler normalden kısa telomer uzunluğu ile ilişkili bulunmuştur (Hartmann 2005). Telomer uzunluğu telomeraz enzimi ile korunur.

Son yıllarda telomer uzunluğunun lösemiler ve meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin prognozu için güçlü ve yeni bir hücrel belirteç olabileceği vurgulanmaktadır. Meena ve arkadaşları nörofibromatoziste MPSKT’ler (Malin periferik sinir kılıfı tümörleri) için telomer uzunluğunun önemli olduğunu göstermişlerdir ancak pleksiform ve kutanöz nörofibromlarda durumun nasıl olduğu konusunda bir bilgi mevcut değildir. Aynı araştırmacı grubu daha önce de

MPSKT’lerde telomeraz enziminin durumunu çalışmışlar ve telomeraz enziminin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği olasılığını gündeme getirmişlerdir (Mantripragada vd. 2008).

Telomer uzunluğunu ölçen farklı metotlar bulunmaktadır. Bunlardan en yeni olanlar STELA ve TESLA yöntemlerdir. STELA (Single Telomere Length Analysis) yönteminde sadece tek kromozomun telomer uzunluğuna bakılmaktadır. Uzunluğu kritik bir dereceye kadar kısalmış tek veya birkaç telomerin, hücrel senesens veya apoptoza neden olan bir sinyal olarak düşünüldüğünü farz ederek tek bir özgül telomerin uzunluğunu ölçmek daha yararlı olabileceği düşünülerek bu yeni yöntemler tasarlanmıştır (Abdallah vd. 2009, Hemann vd. 2001).

Bu yöntem ligasyon temelli olup kantitatif PZR yönteminden uyarlanmıştır. Telomer kısmı, tek bir kromozomun subtelomerik bölgesine özgül tasarlanmış primerler yardımıyla çoğaltılmaktadır. Ancak bu yöntemde sadece belirli kromozomların telomerleri (XpYp, 2p, 11q, 12q ve 17p) ölçülebilmektedir (Britt-Compton vd. 2006).

Bir diğer yeni yöntemin adı ise TESLA (Telomere Shortest Length Assay) dır. Bu teknikte uzunluğu <1 kb dan 18 kb kadar olan tüm kromozomların sonunda bulunan telomerler ölçülebilmektedir. Bu yöntemde özgüllük ve verimi arttırmak için kullanımı kolay olan görüntü-işleme yazılımları kullanılır ve bu sayede bant boyutları otomatik olarak teşhis edilip açıklama yapılır, ortalama telomer uzunluğu ve en kısa telomerin yüzdesi hesaplanır. Diğer metotlarla karşılaştırıldığında, TESLA yeni bir metot olmasına rağmen telomerler ile ilgili daha sağlam ve güçlü bilgiler vermektedir (Lai vd. 2017).

Telomer uzunluğunun ölçümü için en çok kullanılan metot kantitatif-PZR yöntemidir. Bu yöntem ilk defa 2002 de Cawthon ve arkadaşları tarafından Telomer uzunluğuyla ilgili araştırmalarda kullanılmıştır (Cawthon 2002). Bu yöntem eski olmasına rağmen hala çok doğru bilgiler vermektedir. Telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi hakkında yapılan çalışmalarda hala altın standart olarak kabul edilmektedir (Bijnens vd. 2017, Montpetit vd. 2014, Park vd. 2017). Bu yöntem sadece tüm telomerlerin ortalama

uzunluğunu vermesine rağmen dokular ve bireylerin arasındaki farklılıkları daha net bir şekilde ortaya koymaktadır ve bu yöntemle telomeraz enzim aktivitesi de ölçülebilmektedir.

2.2.2 mikroRNA'lar

mikroRNA'lar (miRNA'lar) uzunlukları 19-25 bp arasında değişen, endojen saç tokası şeklindeki transkriptlerden üretilen küçük RNA'lardır. Hedefledikleri mRNA bölgelerinin 3' UTR bölgelerine hibridize olarak mRNA'nın baskılanmasına veya parçalanmasına yol açarlar ve bu şekilde gen ekspresyonunun post transkripsiyonel düzenleyicileri olarak fonksiyon göstermektedirler (Sedani vd. 2012). Tek bir miRNA tüm fonksiyonel ağları düzenleyerek kompleks fizyolojik ya da hastalık fenotiplerini modüle edebilmektedir (Wang vd. 2012).

miRNA'lar ilk kez 1990 yılının başlarında *C. elegans* adı verilen bir nematodda Victor Ambros ve meslektaşları nematoddaki gelişimsel süreci değiştiren mutasyonları araştırırken keşfedilmiştir. Bu mutasyon mRNA translasyonunu arttırmaktadır. Araştırmalar sonucunda meydana gelen mutasyonun protein kodlayan gende değil küçük bir RNA molekülünü kodlayan bir gende olduğu görülmüştür (Allison 2014).

Daha sonraki yıllarda let-7 keşfedilmiş ve böylece düzenleyici sistemin tek olmadığı görülmüştür. Ancak RNA interferansın (RNAi) keşfinden sonra bu RNA'lar ilgi odağı haline gelmiştir.

İncelenen bütün çok hücreli ökaryotlar ve bütün hayvan sistemlerinde miRNA'lar belirlenmiş ve bazı miRNA'lar türler arasında oldukça korunmuştur (Allison 2014, O'Brien vd. 2018).

Tanımlanan insan miRNA'ları arasında *C.elegans*'da korunan birkaç tane miRNA'da yer almaktadır (Allison 2014). Günümüzde hala yeni miRNA'lar keşfedilmekte ve gen düzenlemeleri tanımlanmaktadır (O'Brien vd. 2018).

miRNA'ların post transkripsiyonel düzenleyici rolleri genellikle mRNA'nın 3' UTR bölgesinde yer alan mikroRNA yanıt elemanına bağlanmasıyla gerçekleşmektedir ancak miRNA'ların 5' UTR bölgeleri, kodlayan sekanslar ve gen promotörleri gibi bölgelerle de etkileşime girdiği bildirilmiştir (Ortega vd. 2020, O'Brien vd. 2018). Bazı çalışmalar miRNA'ların eksprese edilmiş bir proteine bağlanarak işlevini değiştirebildiğini de göstermiştir. Tek bir miRNA yaklaşık 200 farklı transkripti düzenleyebilmekte ve tek bir mRNA'da birkaç farklı miRNA tarafından regüle edilebilmektedir. miRNA'lar insan genomunun yaklaşık %2-3'ü kadardır ve bunların yarısı kadarı kümeler halinde gruplanmakta olup polisistronlar gibi transkriptleri vardır. Genellikle her kümede iki olgun miRNA'dan oluşmaktadırlar. miRNA aracılı düzenleme çok korunmuş bir süreç olup insan proteinlerini kodlayan genlerin %60'tan fazlası bu tür düzenlemeye açıktır (Ortega vd. 2020).

miRNA'lar normal hayvan gelişimi için ve çeşitli biyolojik süreçler için kritik öneme sahiptir. miRNA'ların anormal ifadesi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (O'Brien vd. 2018).

2.2.3 Prognostik ve tanısal biyobelirteçler olarak mirna'lar

miRNA'ların düzensizliği, birçok kanserin patogenezinde temel oluşturmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin ve onkojenlerin ekspresyonunu düzenleyen miRNA'lar, hedefe yönelik tedavilerde kullanım için adaydır (Nana-Sinkam ve Croce 2011).

Altta yatan molekülün daha iyi anlaşılması, etkili ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini mümkün kılmak için birçok kanser mekanizmalarında hala gereklidir (Sedani vd. 2012).

miRNA'ları tamamlayan, spesifik miRNA'ları in vivo susturmanın yararlı bir yolunu sağlayan moleküller olan kimyasal olarak modifiye edilmiş bir antagonist oluşturulmuştur. Bir miRNA'nın birden fazla hedefi düzenleyebildiği gibi, bir hedef de bir dizi farklı miRNA tarafından düzenlenebilir. Bu nedenle, özgüllük, terapötik bir

yaklaşım tasarlarırken dikkate alınması gereken önemli bir faktördür (Krutzfeldt vd. 2006).

2.2.4 miRNA ve NF1

miRNA'lar son zamanlarda gen ekspresyonu ile ilgili olarak çok çeşitli düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğu gösterilen kodlamayan bir RNA sınıfıdır. Yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmalarından bu yana, mirna'ların NF1 ile ilişkili tümörler de dahil olmak üzere kanserde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. NF1 en sık kalıtsal tümör yatkınlık sendromudur ve MPSKT'lerin gelişmesiyle maligniteye yol açabilir (Sedani vd. 2012).

İyi huylu nörofibromların MPSKT'lere dönüştüğü mekanizmalar hala aydınlatılmaya devam etse de, mirna'ların bu süreçte kilit bir rol oynadığı ve tümörjenezin hem tanısı hem de prognostik belirteçleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu giderek daha açık hale gelmektedir (Sedani vd. 2012).

2.2.5 mikroRNA biyogenezi

miRNA'ların biyogenezi üç ardışık adımı takip eder: (i) birincil bir transkriptin (pri miRNA) genellikle RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu; ardından (ii) çekirdekte bir öncü miRNA'ya kısmi işlenmesi ve (iii) son olarak sitoplazmada fonksiyonel bir miRNA'ya olgunlaşması aşamasıdır (Beezhold 2010).

Birincil transkript (pri-miRNA) nispeten uzun olabilir ve kök döngü yapılarının oluşumu ile karakterize edilir. Çekirdekte, mikroişlemci olarak bilinen makromoleküler bir makine, daha sonra pri-miRNA öncüsünü Drosha adı verilen bir enzimin aktivitesi yoluyla düzeltir. Bu, genellikle 60-100 nükleotit uzunluğunda bir miRNA öncesi ile sonuçlanır. Pre-miRNA, exportin-5 ile bağlandıktan sonra rangtp'ye bağlı bir işlemde çekirdekten dışa aktarılır. Sitoplazmada, pre-miRNA, Dicer enzimi tarafından bir 22 nükleotid mirna'ya daha da kesilir.

Aynısı, uzun dsRNA moleküllerinin sitoplazmada Dicer tarafından 20-22 nükleotid siRNA'ya (kısa müdahale eden rna'lar) kesildiği RNA girişiminde de olur.

Bununla birlikte, bitkilerde mirna'ların işlenmesi, birkaç Dicer benzeri enzimin varlığıyla daha da karmaşıktır; Bu nedenle Dicer benzeri 1 (DCL1), çekirdekdeki mikrorna'ları spesifik olarak işler.

miRNA'lar yerel saç toka yapıları oluşturan gen transkriplerinden oluşmaktadırlar. Çoğu insan miRNA'sı genoma dağılmış haldedir ancak bazıları miRNA kümeleri halinde bulunmaktadır ve birlikte transkripsiyona uğramaktadırlar. Bazı miRNA'lar, protein kodlayan mRNA intronlarının içine yerleşmiş durumdadırlar fakat diğer miRNA'lar kodlanmayan RNA'ların intron veya ekzonlarında yer almaktadırlar. İntronik miRNA'lar, bazı küçük nükleolar RNA'larla (snoRNA) benzer olarak intron halkaları dışından oluşturulmaktadır. Bunların ifadesi, büyük ihtimalle komşu mRNA'ların ekspresyonu ile düzenlenmektedir. Fakat bazı intronik miRNA'lar, komşu mRNA'lara göre antisensi durumda yerleşmişlerdir. Bu nedenle bazı miRNA kendi promotöründen transkribe edilebilir (Allison, 2014).

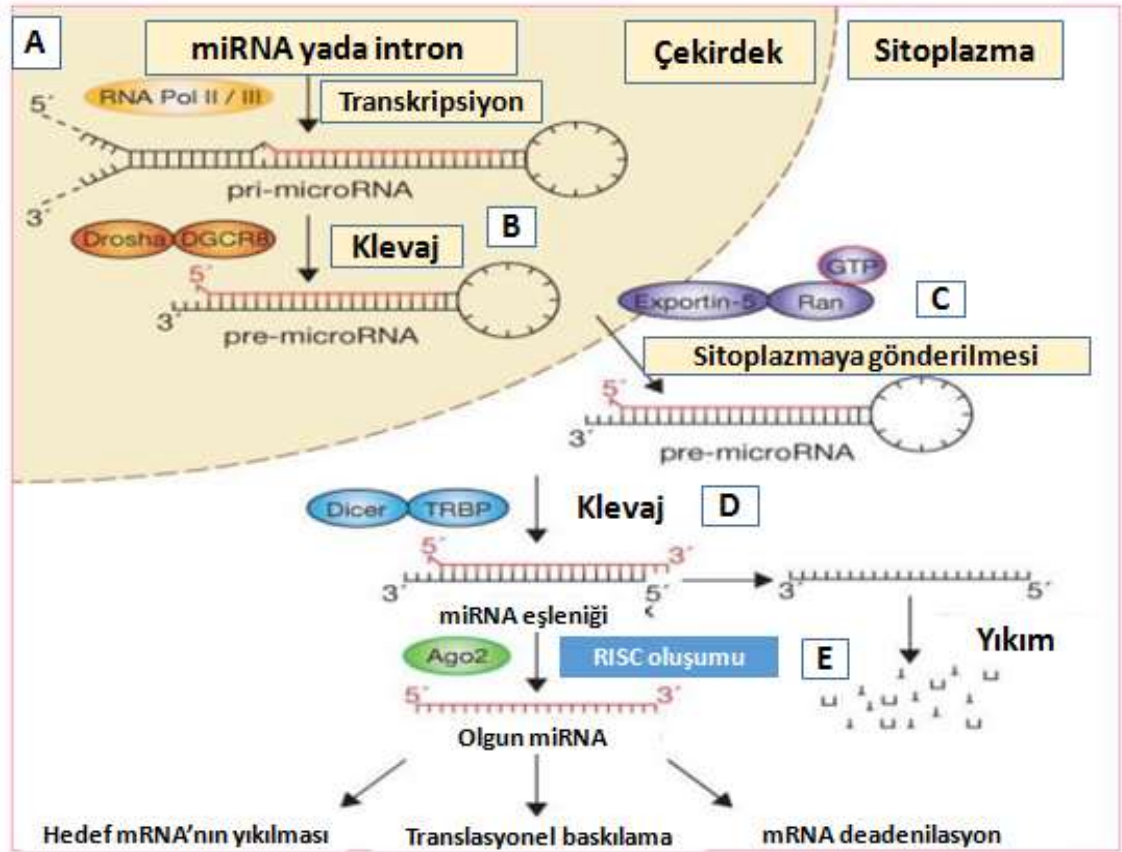
miRNA'lar ilk olarak, ~80 nükleotitlik bir RNA halka-gövde (stem-loop) yapısının bir kolunun parçası olarak transkribe olmaktadır. Daha sonra primer-miRNA (pre-miRNA) denilen, birkaç yüz nükleotit uzunluğundaki bir miRNA öncüsünün bir parçasını oluşturmaktadırlar. Pre-miRNA'nın 5' 7-metilguanozin şapkası ve 3' poli (A) kuyruğu bulunmaktadır. Bu durum miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından transkribe edildiğini göstermektedir. Pre-miRNA'lar, Drosha ve Dicer olarak adlandırılan ribonükleaz III enzimi tarafından işlenmektedir. Drosha, halka-gövde yapısını kestiğinde ~60-70 nükleotitlik, saç tokası yapısında serbest parçalar oluşmaktadır. pre-miRNA olarak isimlendirilen bu yapının ve iki nükleotitlik serbest 3' uzantısı bulunmaktadır. Exportin 5 (nükleositoplazmik taşıma faktörü proteinlerinden karyoferin ailesinin üyelerindendir), pre-miRNA'ların çekirdek dışına taşınmasını sağlamaktadır. Her bir saç tokası öncülünden, tek bir miRNA çifti oluşturulmaktadır (Allison 2014).

Bazı miRNA'lar, protein kodlayan mRNA intronlarının içine yerleşmiş durumdadırlar fakat diğer miRNA'lar kodlanmayan RNA'ların intron veya ekzonlarında yer almaktadırlar. İntronik miRNA'lar, bazı küçük nükleolar RNA'larla (snoRNA) benzer olarak intron halkaları dışından oluşturulmaktadır.

Bunların ifadesi, büyük ihtimalle komşu mRNA'ların ekspresyonu ile düzenlenmektedir. Fakat bazı intronik miRNA'lar, komşu mRNA'lara göre antisensi durumda yerleşmişlerdir. Bu nedenle bazı miRNA kendi promotöründen transkribe edilebilir (Allison 2014).

miRNA biyogenezinin başka yolları da bulunmaktadır. Genel olarak Drosha/DGCR8'den (DiGeorge Sendromu kritik bölge 8) bağımsız olan ve Dicer'dan bağımsız olan yollar olarak gruplandırılabilir.

Drosha/DGCR8'den bağımsız olan yoldan üretilen pre-miRNA'lar Dicer substratlarına benzemektedirler. mRNA intronlarından üretilen mirtronlar ve 7-metilguanozin (m7G) ucu olan pre-miRNA'lar bu grubun bir örneği olarak verilebilir. Bunlar Drosha tarafından kesilmeye ihtiyaç duymadan exportin 1 aracılığıyla sitoplazmaya taşınmaktadırlar. Dicer'dan bağımsız olarak işlenenler ise Drosha tarafından kısa saç tokası RNA (shRNA) transkriptlerinden işlenmektedir. Bu tür pre-miRNA'lar Dicer'ın substratı olmak için yeterli uzunlukta olmadıklarından olgun miRNA'ların oluşabilmesi için AGO2'ye ihtiyaç duymaktadırlar. Böylece AGO2 aracılı olarak 3p zinciri kesilir. 5p zincirinin 3'-5' yönünde kesilmesiyle olgun miRNA'lar oluşur (O'Brien vd. 2018).



Şekil 2.1 miRNA'nın işlenmesi (biyogenez)

Öncelikli olarak RNA polimeraz II/III yardımıyla pri-miRNA sentezlenir (A). Ardından, Drosha-DGCR8 kompleksi aracılığıyla kesilerek pre-miRNA saç tokası yapısı oluşur (B). Exportin-5-Ran-GTP ile pre-miRNA sitoplazmaya gönderilir (C). Sitoplazmada Dicer-TRBP kompleksiyle kesilir ve çift zincirli miRNA eşleniği oluşur (D). Çift zincirli yapının olgun miRNA'yı oluşturacak zincir, RISC yapısı içinde Ago2 ile yüklenip olgun miRNA'yı oluştururken diğer zincir yıkıma uğrar (E). (Winter vd. 2009)

2.2.6 Telomer ve mikroRNA'lar

Kromozomların uçlarında tekrarlayan ve TTAGGG dizisinden oluşan telomerik yapılar mevcuttur. Bu yapılar hücresel bölünme ile birlikte telomerik uçlardan bir miktar DNA kaybetmektedir. Telomeraz ise, kendi RNA'sını kalıp olarak kullanan, kendini sentezleme yeteneği olan ve heksomerik parçaları kromozomal uçlara ekleyerek telomerik DNA'nın uzatılmasını, kromozomal uçların korunmasını ve kaybın dengelemesi gibi görevi olan ribonükleoprotein yapıda olan bir enzimdir (Tiryakioğlu vd. 2016).

Telomerler, ligazlara ve eksonükleazlara dirençleri olan kromozom stabilitesinde, gen ekspresyonunda, tümör oluşumunda, yaşlanmada ve hücre bölünmesinde, nükleer yapılaşmada, kromozom uçlarının replikasyonlarının tamamlanmasında ve bu uçların birbirleriyle karışmasını, kromozomların iç kısımlarıyla reaksiyon vermelerini önlemekte rol aldığı bilinmektedir (Sun vd. 1999).

Telomeraz aktivitesi de birçok malign tümörde gösterilmiştir. Bu bağlamda tanısal ve prognozu tahmin etmede faydalı olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar telomeraz aktivitesi ve malignite arasında güçlü bir ilişki olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmaların sonucu olarak da telomeraz enzimi yaygın kullanıma aday bir tümör belirleyici haline gelmiştir (Mantripragada vd. 2008, Greider 1998). Telomeraz aktivitesi ile “telomeraz reverse transkriptaz” (TERT) ekspresyonu arasında da korelasyon olduğu bildirilmiştir (Liu 2000, Tomoda 2002).

Bu çalışmada ilk basamakta NF1 tümör dokularının telomer uzunlukları ve aktivitelerinden elde edilen sonuçları, telomeraz-NF1 ile ilgili olan genlerdeki miRNA ile ekspresyon düzeyindeki değişimleri karşılaştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla elde edilen sonuçların birbiri ile ne kadar ilgili ve anlamlı olup olmadığının tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Çizelge 2.3 Seçilen miRNA’lar ve fonksiyonları

miRNA Adı	Fonksiyonu	Referans
miR-128	Tümör baskılayıcı miRNA görevi görür ve htert mRNA ile etkileşim yoluyla hTERT ekspresyonunu negatif olarak düzenler	Sharma et al. (2021)
miR-1182	Tümör baskılayıcı miRNA görevi görür ve hTERT, mRNA ile etkileşim yoluyla hTERT ekspresyonunu negatif olarak düzenler	Schrank et al. (2018)
miR-361-5p	TERF1 ve TERF2 genini hedefleyebilir.	Ma et al. (2017)
miR-23a	TRF2’NİN 3 ’UTR ’sini doğrudan hedefleyebilir ve TRF2 ekspresyonunu inhibe edebilir, insan fibroblast hücrelerinde telomer disfonksiyonunu ve hücrel yaşlanmayı indükleyebilir	Luo et al. (2015)

Çizelge 2.3 Seçilen miRNA'lar ve fonksiyonları (devam)

miRNA Adı	Fonksiyonu	Referans
miR-138-5p	- Doğrudan hTERT'i hedefler, telemeraz enzimin etkisini inibe eder - SIRTt1'i hedefleyerek pankreas kanserinde otofajiyi inibe eder	Hrdličková et al. (2014) Tian et al. (2017)
miR-541-3p	hTERT geninin doğrudan düzenlenmesi	Hrdličková et al. (2014)
miR-133a	hTERT geninin doğrudan düzenlenmesi	Hrdličková et al. (2014)
miR-155	TRF1'in 3'UTR'sinde korunmuş bir dizi motifini hedefler ve bu da onun öteleme baskısına neden olur	Dinami et al. (2014)
miR-122-5p	Lipid metabolizmasının ve trikarboksilik asit döngüsü (TCA) düzenlenmesinde rol oynar	Geiger and Dalgaard (2017)
miR-217	K-RAS'ı hedef alarak potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olarak görevi görür	Zhao et al. (2010)
miR-21-5p	Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik hastalıkların patogeneğinde de rol oynayıp nörodejeneratif hastalıklarda ifade edildiği gösterilmiştir	Zhang et al. (2017)
miR-107	Mide kanserinde NF1'i hedefler ve inhibisyonu hücre göçünü, çoğalmasını ve istilasını artırır	Wang et al. (2016)
miR-29-3p	ROS oluşumunu, mitokondriyal disfonksiyonu ve hücre yaşlanmanın ilk aşamasını düzenler	Jung et al. (2020)
miR-1290	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri ilerlemesinde, tümörün oluşumunda ve apoptozda rol oynar	Zhang et al. (2016)
miR-3934-5p	Nöroblastom hücrelerinin canlılığının azaldığını ve apoptozu desteklediği görülmüştür	Ye et al. (2019)
miR-22-3p	Bir tümör baskılayıcı görevi görür	Caracciolo et al. (2019)
miR-34a	Mitokondriyal disfonksiyona neden olarak hücre apoptozuna neden olur	Fan et al. (2017)
miR-484	Onkogen ve proto-onkogen olarak hareket edebilir. Kanser, kalp hastalıkları, diyabet ve nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar	Wang et al. (2012)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasal gereçler ve çözeltiler

i. Doku kesiti malzemeleri

Bistüri ucu no:20

RPMI1640 taşıma besi yeri (Gibco)

90X15mm Tek Kullanımlık Şeffaf Plastik Petri

Sıvı azot

Sıvı azota dayanıklı seramik havan

15 ml'lik tek kullanımlık tüp

ii. Telomer uzunluğu analizi için

Thermo, GeneJET Genomic DNA Purification Kit Katalog No: K0721

Qiagen, QuantiTect SYBR Green PCR Kit Katalog No: 204143

Sentebiolab, Primerler (TELO ve SCG)

iii. Telomeraz aktivasyonu tarama kiti

TRAPeze Telomerase Detection Kit Katalog No: S7700

iv. mikroRNA izolasyonu kiti

miRNeasy mini kit (50) Katalog No: 217004, Lot No: 169014193

Qiazol lysis reagent 50 ml Mat. No: 1023537, Lot No: 56901226

v. Komplementer DNA (cDNA) sentezi kiti

miRCURY LNA RT Kit Katalog No: 339345, Lot No: 7690968

Nükleaz içermeyen distile su

vi. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

PZR çaişması Qiagen Rotor-Gene Q cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit ve Çizelge 3.1 'de seçilen miRNA'lar kullanılarak reaksiyon kurulmuştur.

Çizelge 3.1 Seçilen miRNA'lar

Marka	Katalog No	Açıklama
Qiagen	339306-YP00205995	hsa-miR-128-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204466	hsa-miR-1182 miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204788	hsa-miR-133a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204230	hsa-miR-21-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00206078	hsa-miR-138-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00206054	hsa-miR-361-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204308	hsa-miR-155-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204772	hsa-miR-23a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00205664	hsa-miR-122-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204486	hsa-miR-34a-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204010	hsa-miR-217 miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP02109655	hsa-miR-3934-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204468	hsa-miR-107 miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00205636	hsa-miR-484 miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204698	hsa-miR-29a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP02118634	hsa-miR-1290 miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204606	hsa-miR-22-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00204276	hsa-miR-541-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay
Qiagen	339306-YP00203907	U6 snRNA(hsa, mmu) miRCURY LNA miRNA PCR Assay

3.2 Yöntem

3.2.1 Bireylerin klinik özelliklerine göre NF1 tümör dokularının elde edilmesi, alımı ve dondurulması

Tez çalışmasında Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatrik Nöroloji Ünitesi'ne başvurup NF1 tanısı almış hastalardan kendi istekleri ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda cerrahi operasyonla çıkartılmış cNF ve pNF tümör dokuları kullanıldı.

Doku örneklerinin bir kısmı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilirken kalan kısmı RPMI 1640 taşıma besiyerleri (Gibco) içerisinde kısa bir süre içerisinde TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Laboratuvarları'na ulaştırıldı. Bu dokular 90x15 mm'lik petri kaplarına aktarıldıktan sonra 20 no'lu bistüriler yardımı ile 1 cm³'lük parçalara bölündü. Bu parçaların bir kısmı sıvı azotta taze dondurulmuş "fresh frozen" dondurulup daha sonra kullanılmak üzere -80°C derecede saklandı.

Dokuların kalan diğer parçaları doku dondurma ortamı içerisinde daha sonra kesit almak amacıyla donduruldu ve -80°C'de saklandı. Kalan parçalar ise trizol içerisinde uzun süreli saklama amaçlı alınarak -80°C'de saklandı.

Çalışmada 1'i kontrol, 5 cNF ve 5 pNF doku örneği olmak üzere toplam 11 örnekle çalışıldı. Hasta bireylerin kişisel bilgilerinin gizlemek adına hastalar K (Kontrol, CALM doku örneği), cNF (kutanöz tümör örneği) ve pNF (pleksiform tümör örneği) olacak şekilde isimlendirildi ve numaralandı.

Kontroller, NF1 hastalarında en yaygın neoplastik olmayan pigment abnormalitesidir. Biallelik NF1 gen inaktivasyonuna sahip melanosit hücrelerinin yoğun bir şekilde birikmesiyle oluşmaktadırlar (Gutmann vd. 2017).

Tüm çalışmalar TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınarak (KA EK-118/088) gerçekleştirilmiştir (EK-1).

3.2.2 Sıvı azotta doku parçalanması

Dokulardan DNA ve protein izolasyonu (telomeraz) yapmadan önce dokular parçalanmak zorundadır. Bu amaç için ilk olarak kullanacak havan, tüpler ve kullanılacak malzemeler sıvı azot dökülerek soğutuldu. Daha sonra doku parçacıkları tek kullanımlık petrilere alındı. Tümör dokularının beyaz renkli ve sert kısımlarından~100 mg alındı ve doku 1 ml %0,9 sodyum klorür yardımıyla yıkandı. Sodyum klorür uzaklaştırıldıktan sonra dokular bisturi yardımıyla olabildiğince küçük parçalara ayrıldı. Doku parçaları havan içerisine alınıp, üzerine sıvı azot eklenerek toz haline gelene kadar ezildi. Toz haline gelmiş doku parçaları 50 ml'lik tüplere aktarıldı.

3.2.3 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için Thermo markasının “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” izolasyon kiti üreticinin talimatlarına göre optimize edilerek kullanıldı (Katalog No: K0721).

DNA izolasyonu için yaklaşık 10-20 mg arasında dondurulmuş dokular kullanıldı. Öncelikle sıvı azotta parçalanmış dokular 1,5 ml'lik tüpe alındıktan sonra üzerilerine 180 µl kit içeriğindeki Digestion tamponu eklenerek “Qiagen Tissue Ruptor II” cihazı ile tekrar homojenize edildi. Homojenizasyon buz üzerinde cihazın orta hız ayarı kullanılarak gerçekleştirildi.

Daha sonra örneklerin üzerine 30 µl proteinaz K solüsyonu eklenerek homojenatın karışması için kısa süreli (5-6 sn) bir vorteks işlemi uygulandı. Dokular sonrasında 56°C'de, 2 saat çalkalamalı su banyosunda tamamen parçalanmış ve partikül kalmayana kadar inkübe edildi. İnkübe edilen örnekler üzerine 20 µl RNase çözelitisi eklenerek

karıştırma amaçlı olarak 2-3 sn vorteks işlemi uygulandı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinden sonra, 200 µl lizis buffer eklenerek 15 sn iyice homejenize karışım elde edene kadar vorteks yapıldı. Sonrasında, 400 µl %50'lik etanol eklenerek pipetaj ile karıştırma işlemi gerçekleştirildi.

Hazırlanan lizat, kit içeriğindeki “ GeneJET Genomik DNA Saflaştırma” kolonlarına transfer edilerek, 6000xg de 1 dk santrifüj edildi. Alt sıvı uzaklaştırıldı ve filtreler 2ml'lik yeni toplama tüplerine aktarıldı. Sonrasında etanol eklenerek hazırlanmış olan Yıkama Tamponu I 'den 500 µl tüplere eklendi ve 8000xg de 1 dk santrifüj edildi. Alt sıvı uzaklaştırılarak tekrar filtreler 2 ml'lik tüplere yerleştirildi. Yine etanol eklenerek hazırlanmış olan Yıkama Tamponu II 'den 500 µl eklenerek, 12.000Xg de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 2 ml'lik toplama tüpü atılarak, filtreler yeni 1,5 ml'lik kapaklı tüplere aktarıldı.

Genomik DNA'yı elüt etmek için üzerine 200 µl elisyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. En son olarak da 8000xg de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst filtre atılarak, saflaştırılmış DNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırılarak saklandı.

3.2.4 Telomer uzunluğu tespiti için kantitatif-PZR

Tüm primerler kullanılmak üzere 100 pmoles/µl şeklinde sulandırılıp -20 °C stoklandı. Çalışma için kullanılacak primerler (Çalışma stoku) taze olarak 10 pmoles/µl şeklinde hazırlandı ve çalışma süresince buzdolabında saklandı. Bu çalışmada kullanılmış olan primerlerin dizisi Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Telomerlerin PZR reaksiyonu için standart primerler ile beraber O'Callaghan ve grubu tarafından anlatıldığı gibi “housekeeping” gen olarak β -Globin genine ait (tek gen kopyası; SCG) primerleri kullanıldı. (O'Callaghan ve Fenech 2011).

Çizelge 3.2 Primer listesi

TELO 1	5'-CGGTTTGTTCGGTTTGGGTTTGGGTT-TGGGTTTGGGTT-3'
TELO 2	5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
SCG 1	5'-GCTTCTGACACAACCTGTGTTCCTAGC-3'
SCG 2	5'-CACCAACTTCATCCACGTTTACC-3'

DNA konsantrasyonları spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. PZR için kullanılacak DNA’ların konsantrasyonları yüksek olan örneklerde 10 ng/μl olarak sulandırılarak ayarlanmıştır. DNA miktarları 10 ng/μl az olan örnekler ise sulandırılmadan kullanılmıştır.

Reaksiyonda kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.3’te gösterilmiştir. Her iki primer ile hazırlanan reaksiyonlar aynı zamanda işleme konulmuştur. Ayrıca kesinlik ve duyarlılığını arttırmak amacıyla kontrol grupları ve örnekler triplik olarak çalışılmıştır.

Çizelge 3.3 Kantitatif PZR reaksiyon malzemeleri ve miktarları

SYBR Green Rxn mix	5 μl		SYBR Green Rxn mix	5 μl
Telo 1	0.1 μl		SCG 1	0.3 μl
Telo 2	0,9 μl		SCG 2	0,7 μl
H ₂ O	2 μl		H ₂ O	2 μl
DNA	2 μl		DNA	2 μl

PZR / Reaksiyon şartları;

Başlangıç ısı aktivasyonu	95°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	10 sn	} X 40 döngü
Bağlanma	60°C	5 sn	
Uzama	72°C	11 sn	
Soğuma	25 °C		

3.2.5 Telomeraz aktivite analizi için örneklerin hazırlanması

Bu kısımda protein izolasyonu için Millipore firmasının “TRAPeze Telomerase Detection Kit”i kullanılmıştır. Üreticinin kit protokolüne göre yapılan işlemler aşağıdaki gibidir.

40-100 mg doku örnekleri öncelikle sıvı azot ile havanda parçalandı, sonrasında PBS ile yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra parçalanan bu örnekler steril 1,5 ml’lik tüplere aktarılarak üzerine kit içeriğinde bulunan 1xCHAPS lizis tamponundan 200 µl eklendi ve yaklaşık 5-6 sn homojenize olana kadar “Qiagen Tissue Ruptor II” cihazı ile tekrar homojenize edildi. Homojenizasyon, ısı birikimini önlemek için buz üzerinde, cihazın orta hız ayarı kullanılarak gerçekleştirildi. Homojenizasyondan sonra süspanse örnekler 30 dk buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonrasında örnekler 12.000xg de 4°C’de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen (yaklaşık 160 µl) süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Süpernatantlar daha sonra kullanılmak üzere küçük hacimler olarak porsiyonlara ayrıldı ve sonrasında kullanılmak üzere -86 °C’de saklandı.

3.2.6 Telomeraz aktivite analizi için kantitatif –PZR

Telomeraz aktivite analizi için kantitatif PZR çalışması yapıldı. Buna göre Çizelge 3.4’de gerekli olan reaksiyon malzemeleri verilmiştir.

Çizelge 3.4 Kantitatif PZR reaksiyon malzemeleri ve miktarları

TRAP Buffer	1 µl
50xdNTP	0,2 µl
TS Primer	0,2 µl
Primer Mix	0,2 µl
Taq Polimeraz	0,1 µl
SYBR Green Master Miks	5 µl
dH₂O	2,3 µl
Örnek	1

PZR / Reaksiyon şartları;

Telomeraz reaksiyonu: 30°C 30 dk
 Denatürasyon: 95°C 2 dk
 Sikluslar: 94°C 15 sn
 59°C 30 sn } X 35 döngü
 72°C 1 dk }

3.2.7 mikroRNA izolasyonu

mikroRNA izolasyonu için Qiagen miRNeasy Mini kiti üreticinin talimatlarına göre optimize edilerek kullanıldı (Katalog No: 217004). Total RNA izolasyonu yapıldı.

-86 °C de trizolde saklanan örnekler petride küçük parçalara ayrıldı. Parçalanan dokular 15 ml’lik falkonlara alınarak üzerine 750 µl trizol eklendi. “Qiagen Tissue Ruptor II” ile homojenize edildi. Homojenizasyon buz üzerinde cihazın orta hız ayarı kullanılarak gerçekleştirildi. 15 ml’lik falkonlarda bulunan örnekler 1000xg 10 dk 4°C’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Üst katman 2 ml’lik steril tüplere aktarıldı. Üzerine 140 µl kloroform eklendi. Tüpler iyice kapatıldı. 15 saniye el ile alt üst yapılarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Sonrasında 12000xg 15

dk 4 °C de santrifüj edildi. Bu aşamadan sonraki her basamak oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Santrifüj işleminden sonra oluşan 3 fazdan, RNA içeren en üst faz çekilerek 2 ml'lik yeni steril tüplere aktarıldı. Üzerine 1,5 hacim (~ 525 µl) %100'lük etanol eklendi. Etanol eklenip pipetaj yapılan örnekler kit içeriğinde tek tek paketli bulunan spin kolonlara aktarılır (Maksimum 700 µl kadar aktarılabildi). 8000xg 15 sn 25 0C'de santrifüj edildi (örnekler fazla olduğu için yukarıda basamak tekrar edildi). Alt sıvı atıldı. Kit içeriğinde bulunan 700 µl RWT Tamponu kolanlar üzerine eklendi. Tekrar 8000xg 15 sn 25 0C'de santrifüj edildi ve alt sıvı atıldı. Spin kolona yine kit içeriğinde bulunan 500 µl RPE Buffer eklenerek, 8000xg 2 dk 25 0C'de santrifüj edildi (Uzun santrifüjleme işlemi, spin kolon zarını kurutarak RNA elüsyonu sırasında etanolün taşınmamasını sağlamaktadır). Alt sıvı atıldı. Bundan önceki basamak tekrar edildi (RPE Buffer kısmı). Filtreye birşey eklemeyen tam hızda 1 dk 25 0C'de tekrar santrifüj edildi. Amaç filtreyi tamamen kurutarak, RPE Buffer'ın uzaklaşmasını sağlamaktır. Sonrasında kolonlar 1,5 ml'lik kit ile verilen toplama tüplerine yerleştirildi, üzerine 30µl RNase-free su eklendi. Tüplerin kapağı kapatılarak 8000xg 1 dk 25 0C'de santrifüj edildi ve kolondan geçerek altta toplanan total RNA ürünü elde edildi. Örnekler -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.8 cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu yapılan 11 örnekten cDNA sentezi yapmak için miRCURY LNA RT Kit (Katalog No: 339345, Lot No: 7690968) kullanıldı. Bu amaç için üreticinin talimatları uygulandı. Reaksiyon biter bitmez örnekler gerçek zamanlı PZR analizi için -20 °C'de saklandı.

Başlamadan önce üreticinin talimatlarına uygun olarak kit içersinde bulunan UniSp6 RNA spike-in'e (cDNA sentezinin kontrolü için) 80 µl nükleaz içermeyen su eklenip vorteks yardımıyla karıştırıldı. 30 dk buzda bekletildi. Tekrar vorteks ile karıştırıldı ve porsiyonlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

cDNA sentezi için PZR reaksiyon şartları:

5X miRCURY RT reaction buffer	: 2 µl
Nuclease-free water	: 4,5 µl
10X miRCURY RT enzyme mix	: 1 µl
RNA spike-in	: 0,5 µl
Template RNA (5 ng/uL)	: 2 µl

10 µl

Tepkime koşulları:

Reaksiyon revers transkripsiyon : 42 °C'de 60 dk

Reaksiyonun inaktivasyonu : 95 °C'de 5 dk

3.2.9 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

cDNA sentezi yapılan total RNA'ların ifadesini analiz etmek için Qiagen miRCURY LNA SYBR Green PZR kit ile kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanıldı. Bu amaç için PZR miRNA primerleri önce hafifçe vorteks ile karıştırıldı ve santrifüj edildikten sonra üzerine 220 µl nükleaz içermeyen su eklenip oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi., Daha sonra tekrar vorteks ile karıştırılıp ve santrifüj edildikten sonra, porsiyonlandı ve -20 °C'de muhafaza edildi. cDNA'lar reaksiyondan önce 1:30 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Gerçek zamanlı PZR reaksiyon şartları:

2X miRCURY SYBR Green Mix	: 5 µl
PZR Primer Karışımı	: 1 µl
Kalıp cDNA (1:30)	: 4 µl

10 µl

Tepkime koşulları:

Başlangıç ısı aktivasyonu	: 95 ⁰ C’de 2 dk	
Denatürasyon	: 95 ⁰ C’de 10 sn	} X 40 döngü
Bağlanma ve uzama aşamaları	: 56 ⁰ C’de 60 sn	
Erime eğrisi analizi	: 60-95 ⁰ C	

3.2.10 İstatistiksel analizler

Çalışma gruplarından elde edilen verilerin normal dağılıma uygunlukları grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. İncelenen tüm değişkenlerin normal dağılıma uymadıkları (skewed) görüldü. Tanımlayıcı istatistiklerin gösteriminde ortanca (IQR: InterQuartile Range) değerleri verildi. Diğer çalışmalarla karşılaştırılabilir olmak ve anlaşılabilirliği arttırabilmek için ayrıca ortalama $\pm$ standart sapma değerleri de gösterildi. miRNA ortancalarını cNF ve pNF grupları arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney testi kullanıldı. cNF ve pNF grup ortalamalarını kontrol değerleri ile karşılaştırmak için “one sample t” testi uygulandı. İstatistiksel analiz, hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY, IBM Corp.) programı kullanıldı. İstatistiksel kararlarda $p<0.05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

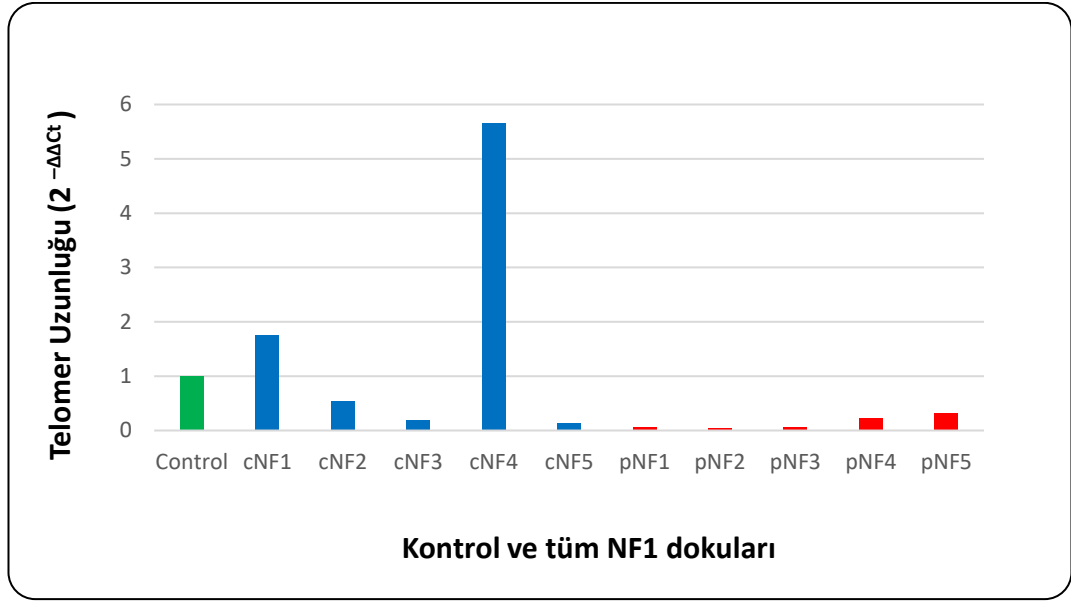
4.1 Telomer Uzunluğu ve Aktivitesinin Doğrulanması

Hastalardan alınan dokulardan DNA izolasyonu için Thermo markasının “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonları yapıldı. DNA konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometre cihazı ile ölçüldü (Çizelge 4.1). PZR için kullanılacak DNA’ların konsantrasyonları yüksek olan örneklerde 10 ng/μl olarak sulandırılarak ayarlanmıştır. DNA miktarları 10 ng/μl az olan örnekler ise sulandırılmadan kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 İzole edilen DNA’ların konsantrasyon ve saflık değerleri

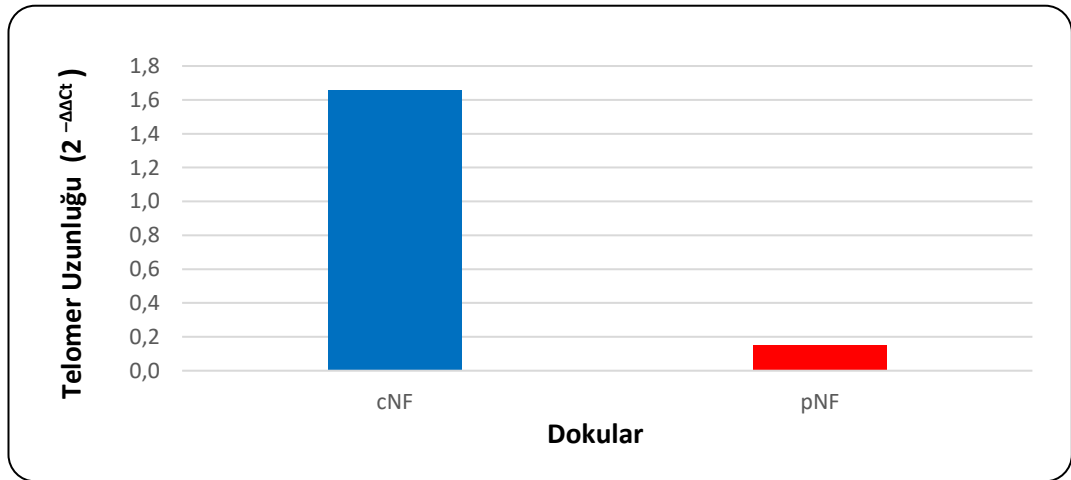
Örnekler	Konsantrasyon (ng/uL)	A260/A280	A260/230
Kontrol	9.6	1.67	0.49
cNF1	8.4	2.02	0.47
cNF2	16.8	1.72	0.54
cNF3	19.2	1.81	0.69
cNF4	5.7	2.42	0.40
cNF5	19.2	1.90	0.91
pNF1	22.8	1.81	1.06
pNF2	42.4	1.81	1.33
pNF3	23.1	1.81	1.00
pNF4	17.4	1.77	0.77
pNF5	11.1	1.83	0.68

Bu DNA örneklerinden ilk aşamada telomer uzunluğu tespiti için Gerçek Zamanlı PZR analizleri gerçekleştirildi. Telomer uzunluğu tespiti için Sentebiolab firmasından tedarik edilen TELO ve SCG (Referans gen) primerleri ile Qiagen, QuantiTect SYBR Green PZR Kit’i kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kontrol örneğine göre kalibre edilen NF1 hastalarında ölçülen telomer uzunlukları

Şekil 4.1’de kontrole göre özellikle pNF doku örneklerinde ciddi seviyede telomer uzunluğunun kısaldığı, cNF dokularda ise kontrole göre farklı telomer uzunlukları gözlenmiştir.

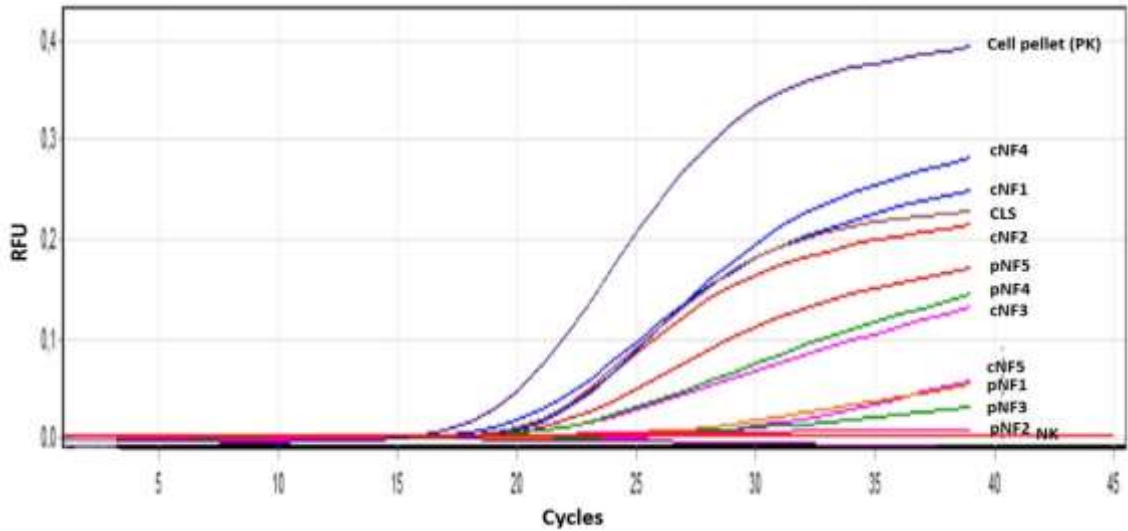


Şekil 4.2 cNF ile pNF’in ortalama telomer uzunluklarının karşılaştırılması

Şekil 4.2’de cNF ve pNF tümör dokularının ortalama telomer uzunluğuna bakılmıştır ve pNF tümör dokularında telomer uzunluğunun cNF tümör dokularında göre daha fazla kısaldığı gözlenmiştir.

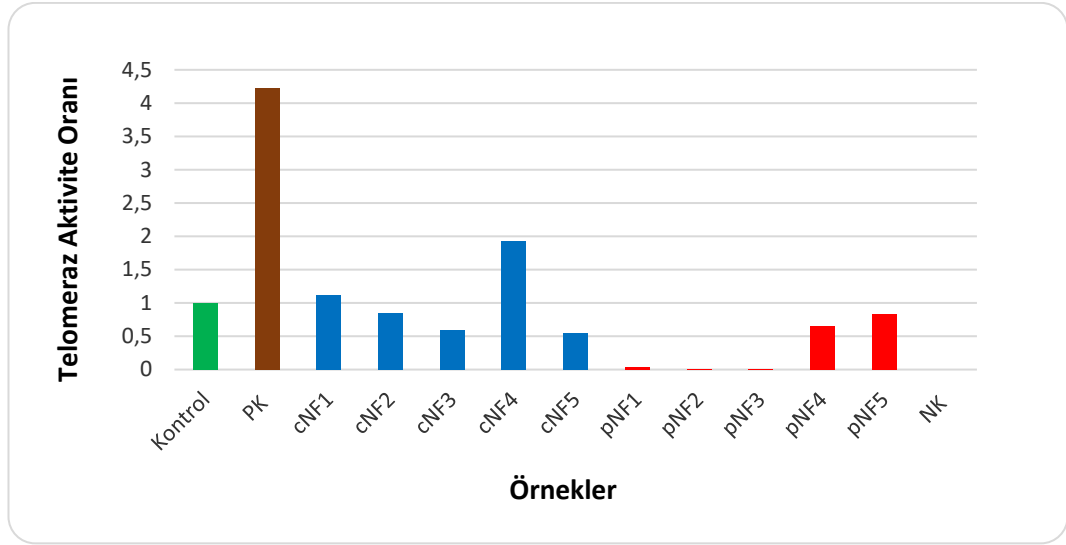
Telomer aktivitesinin belirlenmesinde ise, hasta örneklerinden protein izolasyonu için Millipore firmasının “TRAPeze Telomerase Detection Kit”i ve Gerçek Zamanlı PZR analizinin kantitatif olarak değerlendirilebilmesi için gerekli olan Qiagen, QuantiTect SYBR Green PCR Kit’i kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlara ait görüntüler Şekil 4.3 de verilmiştir.

Telomeraz Aktivite Eğrisi



Şekil 4.3 Gerçek zamanlı PZR analizinde kontrol hücre pelletine göre NF1 tümör dokularında telomeraz aktivite eğrisi

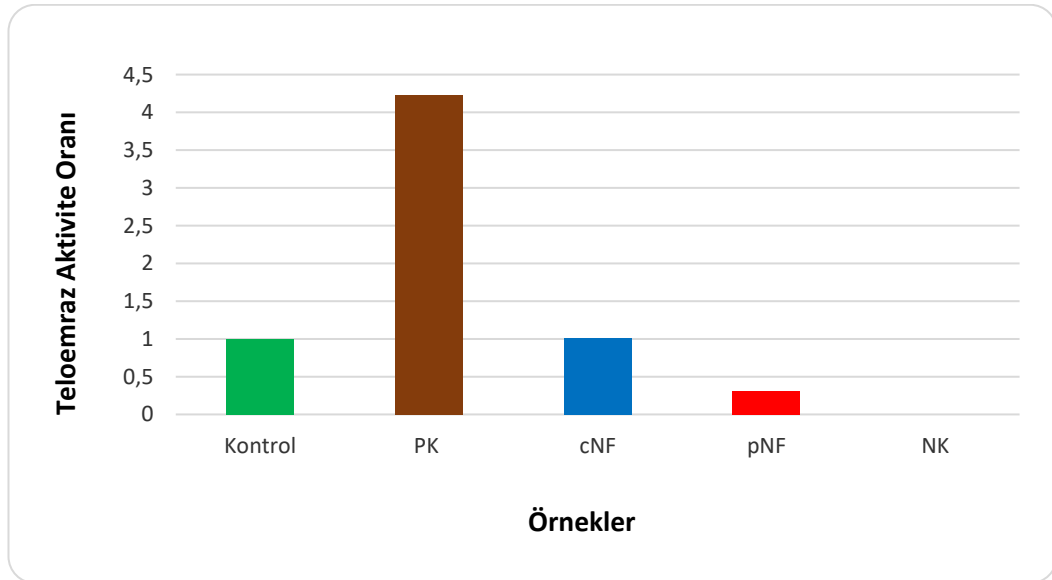
Şekil 4.3’da gerçek zamanlı PZR analizine göre yapılan çalışmanın aktivite eğrisine göre cNF’lerin, pNF’larına göre daha önceden reaksiyona girdiği görülmüştür. Ct değerlerine göre de tüm örneklerin aktivite grafikleri Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4 Gerçek zamanlı PZR analizine göre NF1 tümör dokularında telomeraz aktivite grafiği

(PK: hücre pelleti, NK: ısı ile inaktive edilmiş örnek)

Şekil 4.4'e bakıldığında en belirgin telomeraz aktivite azalması pNF dokularında görülmüştür. cNF tümör dokularında da kontrole göre telomeraz aktivite azalması belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Gerçek zamanlı PZR analizine göre, cNF ile pNF'in ortalama telomeraz aktivite karşılaştırılması

(PK: hücre pelleti, NK: inaktive edilmiş örnek)

Şekil 4.5’de cNF ve pNF olarak gruplandırmış olduğumuz tümör dokularına baktığımızda pNF dokularının kontrol ve diğer örneklerle göre telomeraz aktivitesinin daha çok azaltığı görüşmüştür.

4.2 NF1 Tümör Dokularında Seçilen miRNA’ların Gen İfadesinin Kantitatif Analizi

Tümör doku örneklerindeki miRNA verilerinin analizi için tümör dokularından total RNA izolasyonu miRNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanarak gerçekleştirildi. Elde edilen total RNA’ların derişimleri Thermo Scientific NanoDrop Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. NanoDrop cihazında elde edilen absorbans değerleri ve RNA miktarı Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Tümör dokulardan elde edilen RNA örnekleri miRCURY LNA RT kiti (Qiagen) ile cDNA’ya çevrildi. Daha sonra Qiagen miRCURY LNA SYBR Green PCR kiti ile sentezlenen cDNA’lardan ilk olarak miRNA’ların kantitatif gerçek zamanlı PZR analizleri gerçekleştirildi. U6 (RNU6-1) snRNA ifadesi iç kontrol geni olarak kullanıldı. Dondurulmuş dokulardan izole edilen total RNA miktarı az olduğundan U6 primerleri kullanarak, kullanılması gereken cDNA miktarı için optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışma sonucunda sentezlenen cDNA’ların 1/30 olarak sulandırılmasına karar verildi.

Çizelge 4.2 İzole edilen total RNA’ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek	Konsantrasyon (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
Kontrol	7.108	1.480	0.505
cNF1	158.047	1.568	0.320
cNF2	203.155	1.689	0.204
cNF3	15.801	1.423	0.496
cNF4	297.752	1.903	0.289
cNF5	92.845	1.536	0.509
pNF1	9.925	1.644	0.937
pNF2	32.282	1.577	0.962
pNF3	43.108	1.476	0.268
pNF4	18.778	1.422	0.147
pNF5	108.642	1.534	0.207

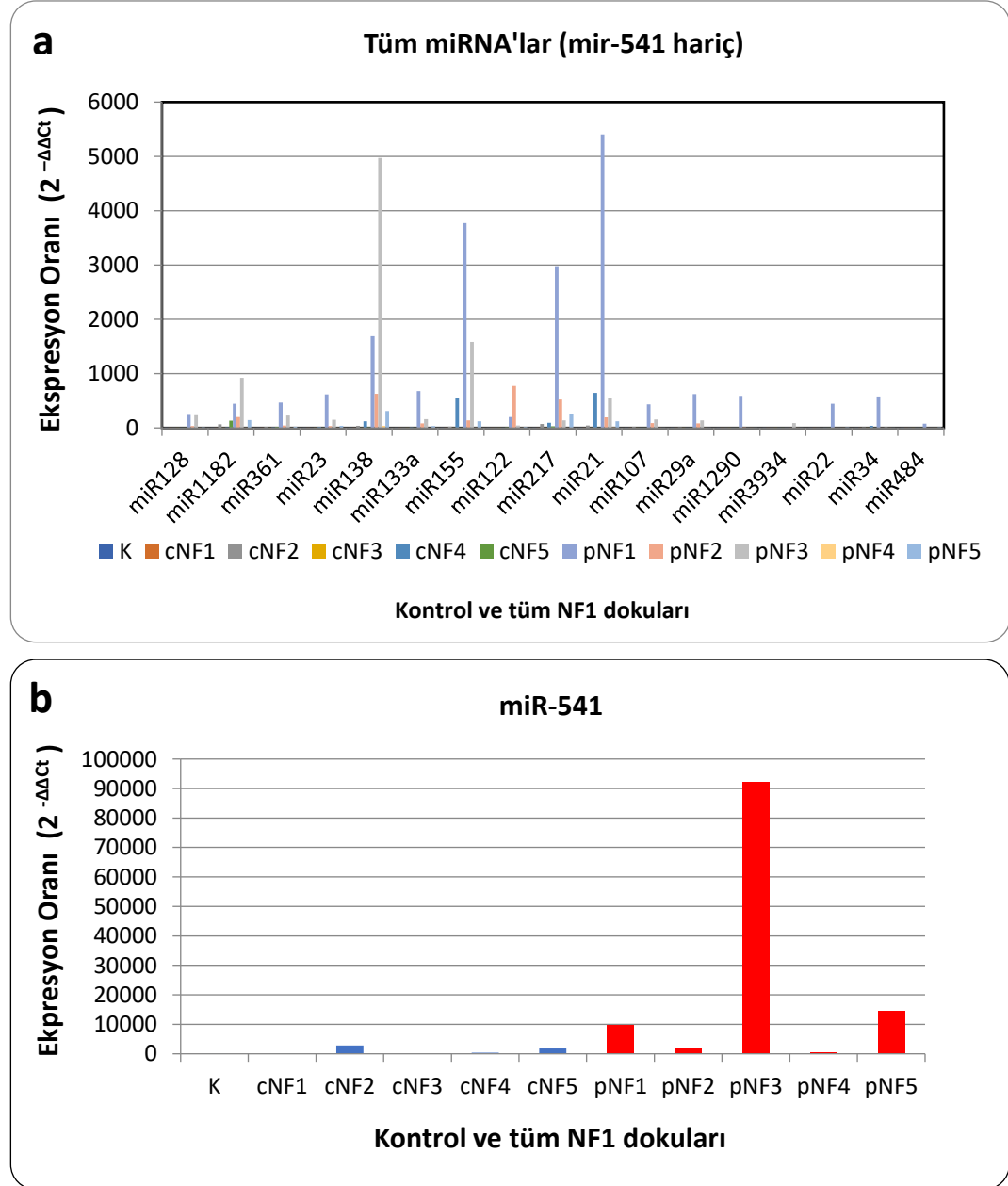
Bu örneklerde normalizatör gen olarak U6 snRNA primeri ile beraber 18 farklı miRNA gen ifadesi kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak analiz edildi.

Kantitatif analize başlamadan önce eşik değeri (treshold) 0,02 - 0,03 olarak belirlendi ve ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metoduyla analizler gerçekleştirildi. Bu amaç için her örneğin miRNA'ları kendi iç kontrolü olan U6 snRNA' s ı ile kendi içerisinde normalize edildi. Daha sonra bu sonuçlar kontrol birey sonuçlarına göre tekrar normalize edilerek $\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerler $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülünde kullanılarak incelenen miRNA örneklerinin kontrol örneğine göre ekspresyon miktarları bulundu. Çizelge 4.3'te kontrol ve tümör doku örneklerinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ verileri verilmiştir.

Çizelge 4.3 Kontrol ve tümör doku örneklerinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ verileri

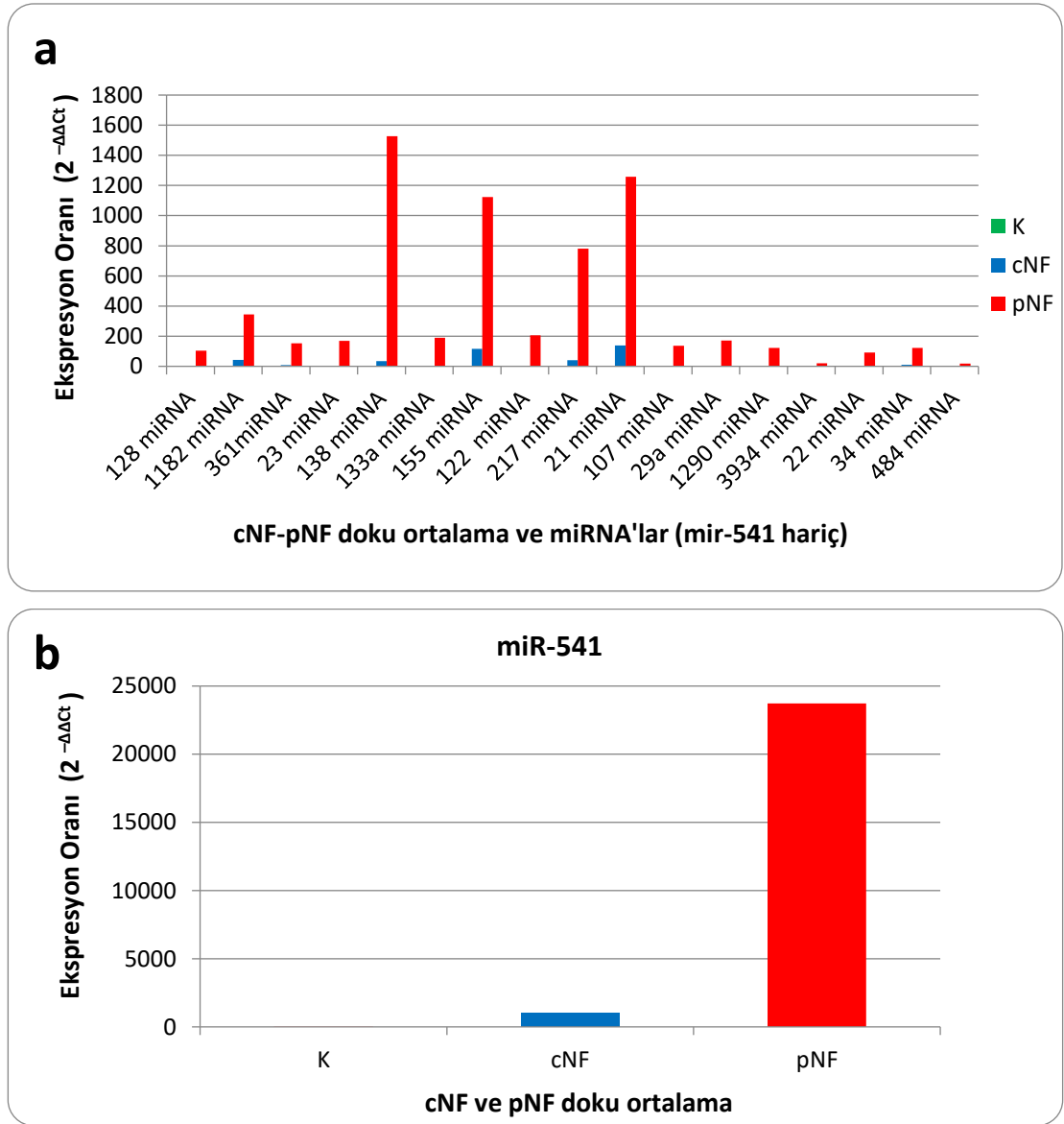
	miR128	miR1182	miR361	miR23	miR138	miR133a	miR155	miR122	miR217	miR21	miR107	miR29a	miR1290	miR3934	miR22	miR34	miR484	miR541
K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
cN1	0,08	2,0	0,206	0,325	5,9	0,077	0,620	0,082	2,7	1,2	0,490	0,578	0,004	0,06	0,047	0,275	0,163	65,8
cN2	2,6	68,6	13,9	0,000	39,1	4,4	23,6	4,4	71,5	45,6	14,7	11,4	0,312	1,06	0,503	9,063	3,340	2836,7
cN3	0,06	2,908	0,008	0,003	0,131	0,005	0,071	0,270	0,074	0,004	0,002	0,003	0,047	0,90	0,001	0,999	0,003	0,000
cN4	0,58	8,5	10,9	19,2	120,3	8,5	556,4	4,2	95,7	643,6	7,7	2,8	2,1	0,49	0,812	40,786	1,625	330,8
cN5	0,13	134,4	17,9	0,426	11,1	2,4	1,3	13,3	28,6	0,177	0,463	0,435	0,758	0,30	0,356	1,320	2,042	1807,8
pN1	238,9	445,7	467,9	617,4	1686,7	675,6	3769,1	200,9	2977,7	5404,7	430,5	621,7	588,1	8,0	442,643	580,037	75,584	9809,7
pN2	35,0	200,9	42,5	36,0	626,0	83,3	139,1	770,7	522,8	195,4	88,6	82,7	11,5	6,6	0,228	0,651	0,156	1710,3
pN3	232,3	922,9	226,0	151,2	4973,3	159,8	1584,7	44,6	138,1	556,4	156,5	140,1	5,0	89,9	4,823	13,454	7,160	92041,7
pN4	1,8	4,4	5,3	4,7	36,8	0,0	6,5	0,252	2,6	8,5	6,2	6,1	0,018	0,31	0,507	6,589	0,493	410,1
pN5	13,7	146,0	19,8	39,9	308,7	32,9	120,3	15,0	257,8	120,3	4,3	2,5	1,892	1,33	12,381	6,021	11,236	14664,1

Şekil 4.6 'ya bakıldığında tüm miRNA'ların en yüksek ekspresyon seviyesinin pNF doku örneklerinde olduğu gözlenmiştir. cNF doku örneklerinde pNF'lere göre daha az seviyede ekspresyon olduğu gözlenmiştir (a). miR541 ait ekspresyon seviyesi diğer miRNA'lara göre daha yüksek olduğundan ayrı bir grafikte gösterilmiştir (b).



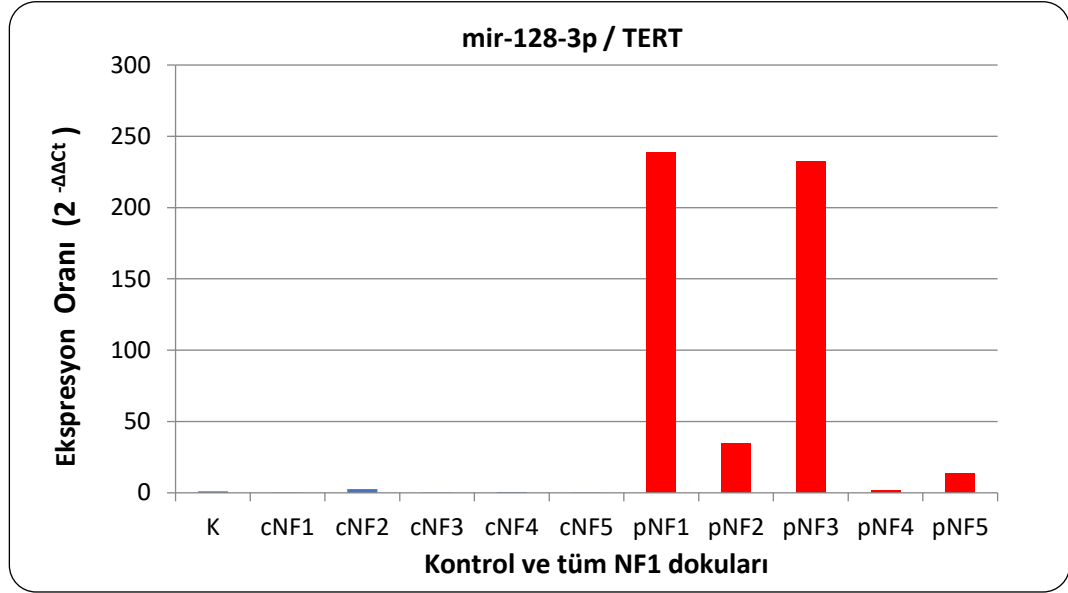
Şekil 4.6 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miRNA analiz grafiği. a: miR-541 dışındaki tüm miRNA'ların ekspresyon grafiği. b: miR-541'e ait ekspresyon grafiği

Şekil 4.7'ye baktığımızda yukarıdaki grafiklerde de açıkladığımız gibi en yüksek ekspresyon seviyesinin pNF örneklerinde yüksek olduğu görülmüştür (a).miR541 ait ekspresyon seviyesi diğer miRNA'lara göre daha yüksek olduğundan ayrı bir grafikte gösterilmiştir (b).

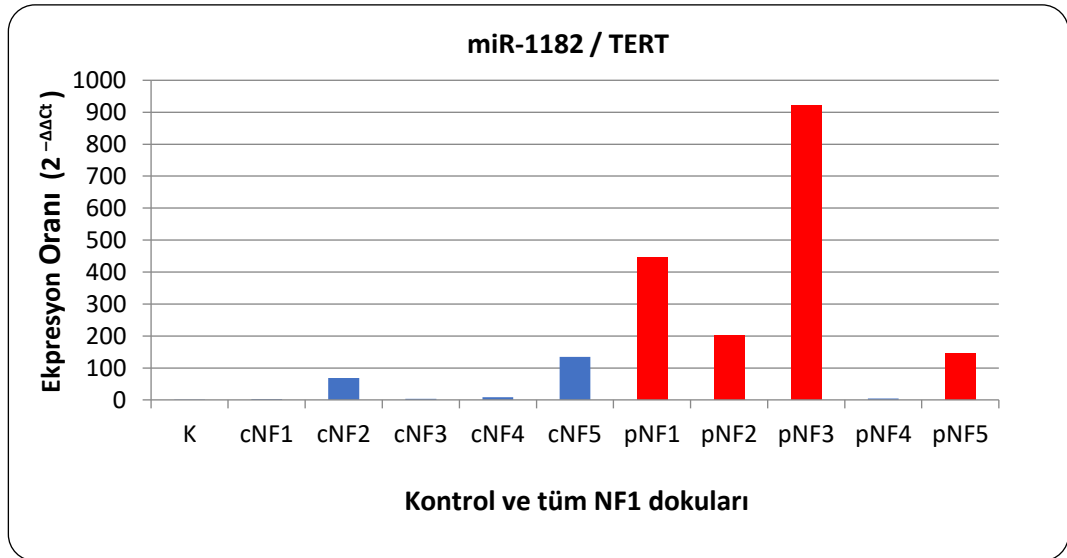


Şekil 4.7 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında her bir miRNA'ya göre ortalaması alınan cNF ve pNF tümör dokularının miRNA analiz grafiği. a: miR- 541 dışındaki tüm miRNA'ların ekspresyon grafiği. b: miR-541'e ait ekspresyon grafiği

Şekil 4.8'e baktığımızda miR-128-3p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF3) yüksek ekspresyon gözlenmiş olup, cNF dokularında pNF'ya göre düşük bir ekspresyon görülmüştür.

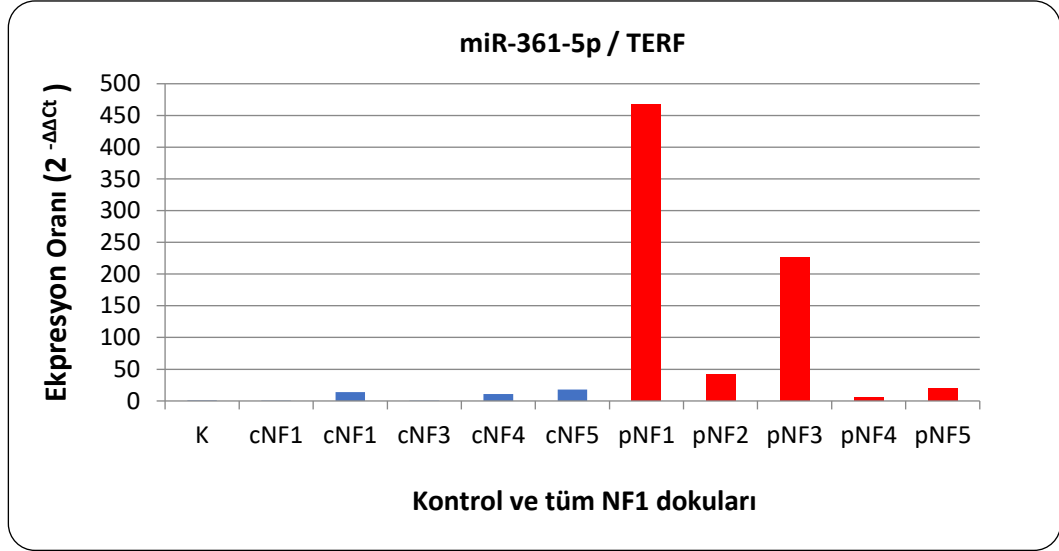


Şekil 4.8 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-128-3p ekspresyon analiz grafiği (TERT: Telomeraz reverse transkriptaz)



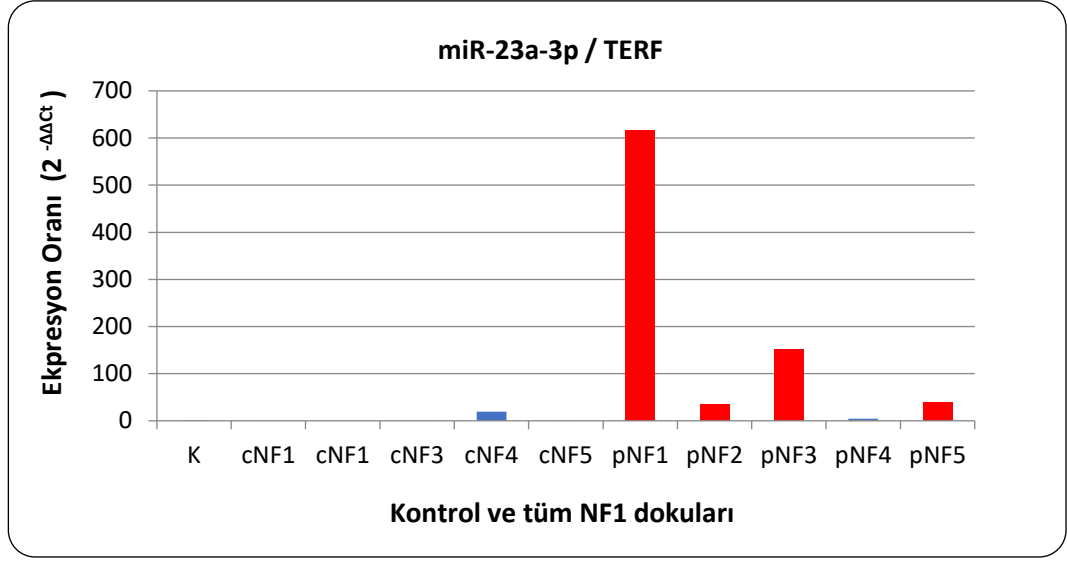
Şekil 4.9 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-1182 ekspresyon analiz grafiği (TERT: Telomeraz reverse transkriptaz)

Şekil 4.9'a baktığımızda mir-1182 geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise genel olarak düşük bir ekspresyon görülmüş olup cNF2 ve cNF5 tümör dokularında diğer cNF dokularına göre daha belirgin bir ekspresyon seviyesi gözlenmiştir.



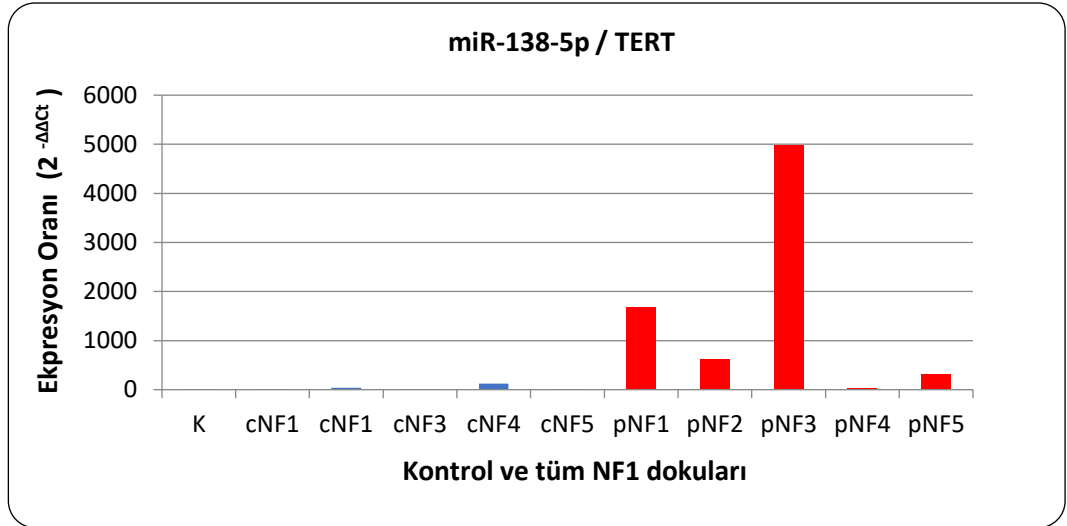
Şekil 4.10 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-361-5p ekspresyon analiz grafiği (TERF: Telomerik tekrar bağlama faktörü)

Şekil 4.10'a baktığımızda mir-361-5p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise genel olarak düşük bir ekspresyon oranı görülmüştür.



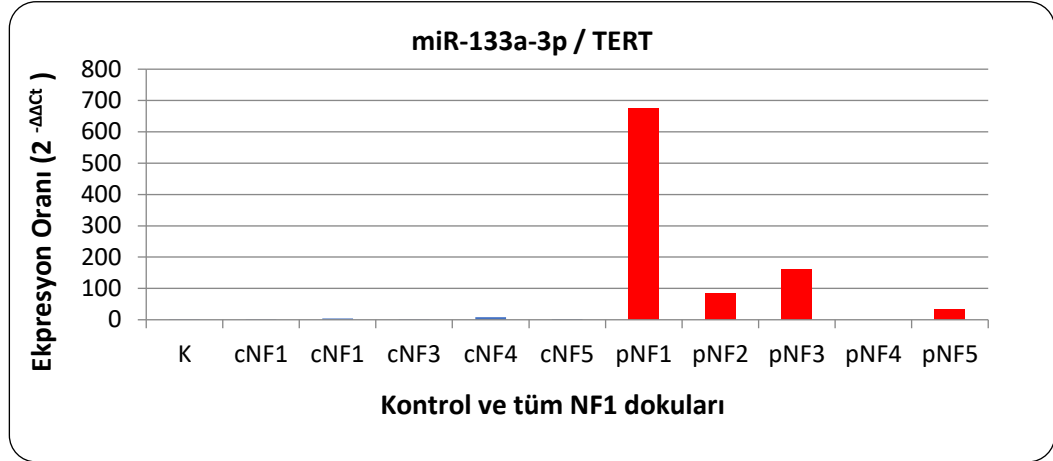
Şekil 4.11 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-23a-3p ekspresyon analiz grafiği (TERF: Telomerik tekrar bağlama faktörü)

Şekil 4.11'e baktığımızda mir-23a-3p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF4 hariç, cNF dokularda ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



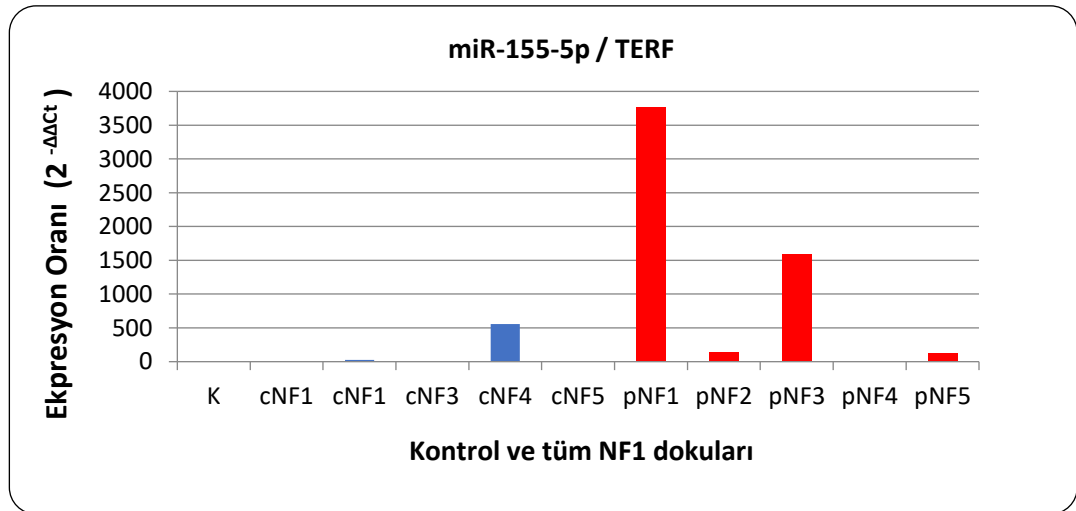
Şekil 4.12 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-138-5p ekspresyon analiz grafiği (TERT: Telomeraz reverse transkriptaz)

Şekil 4.12'ye baktığımızda mir-138-5p geni için pNF dokularında (özellikle pN1 ve pN3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF4 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



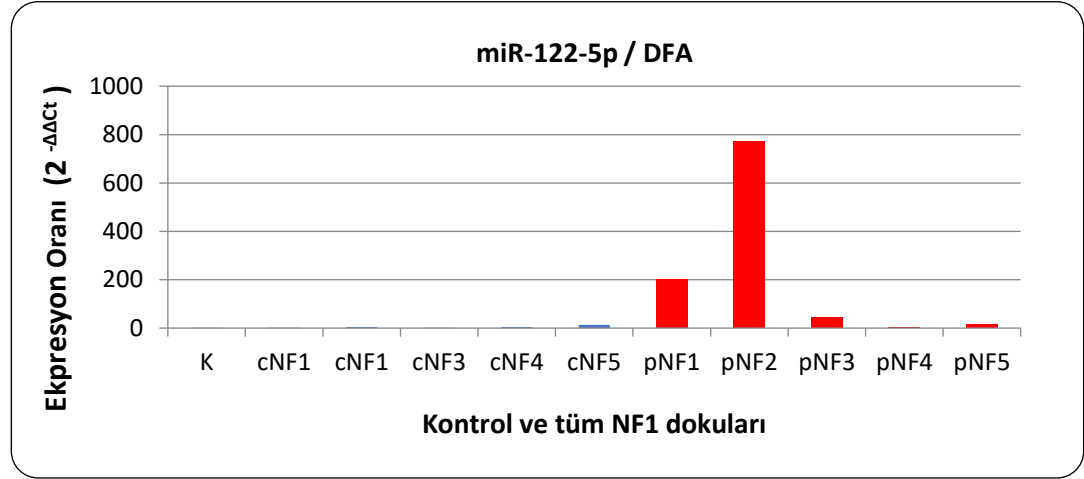
Şekil 4.13 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-133a-3p ekspresyon analiz grafiği (TERT: Telomeraz reverse transkriptaz)

Şekil 4.13'e baktığımızda miR-133a-3p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF4 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



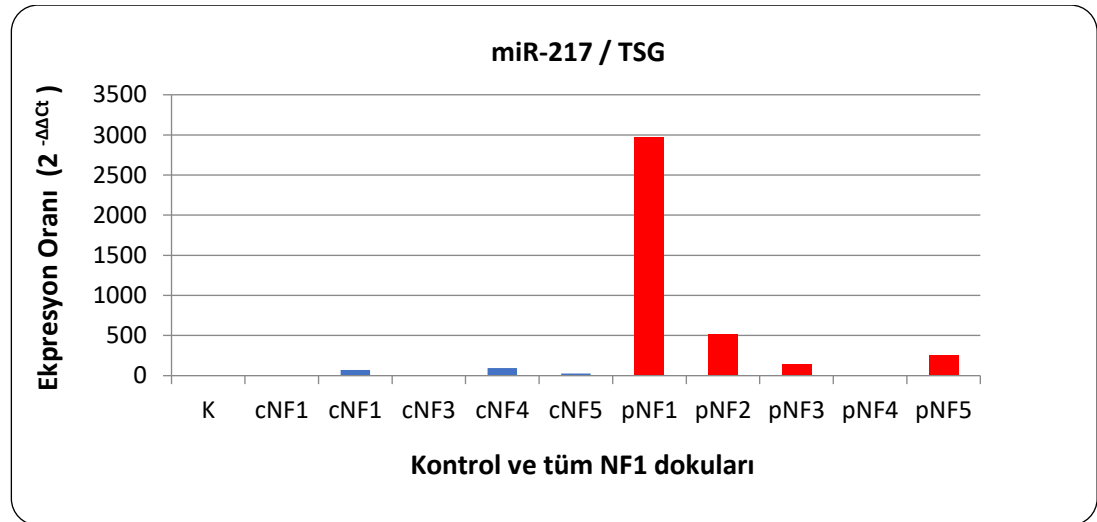
Şekil 4.14 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-155-5p ekspresyon analiz grafiği (TERF: Telomerik tekrar bağlama faktörü)

Şekil 4.14'e baktığımızda miR-155-5p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF4 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



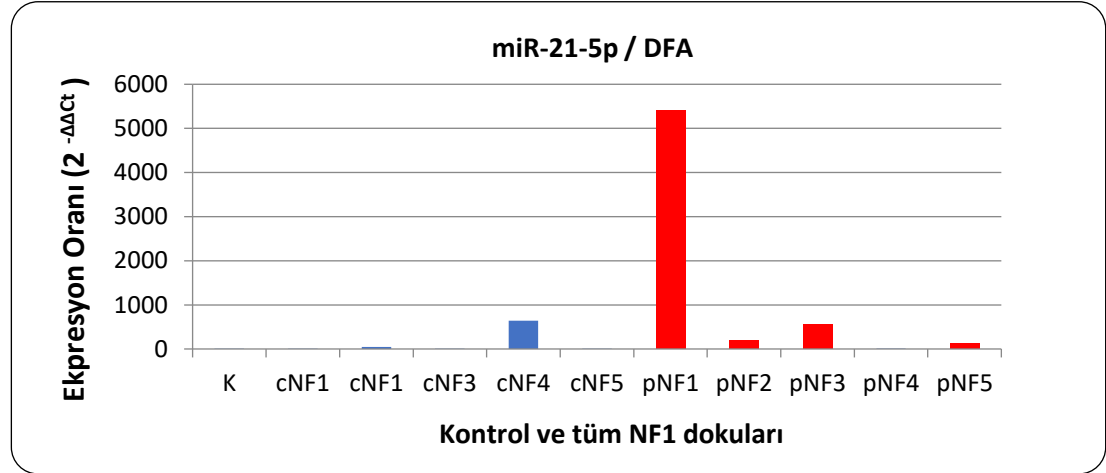
Şekil 4.15 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-122-5p ekspresyon analiz grafiği (DFA: Diğer fonksiyonlarla alakalı)

Şekil 4.15'e baktığımızda miR-122-5p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF2) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF5 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



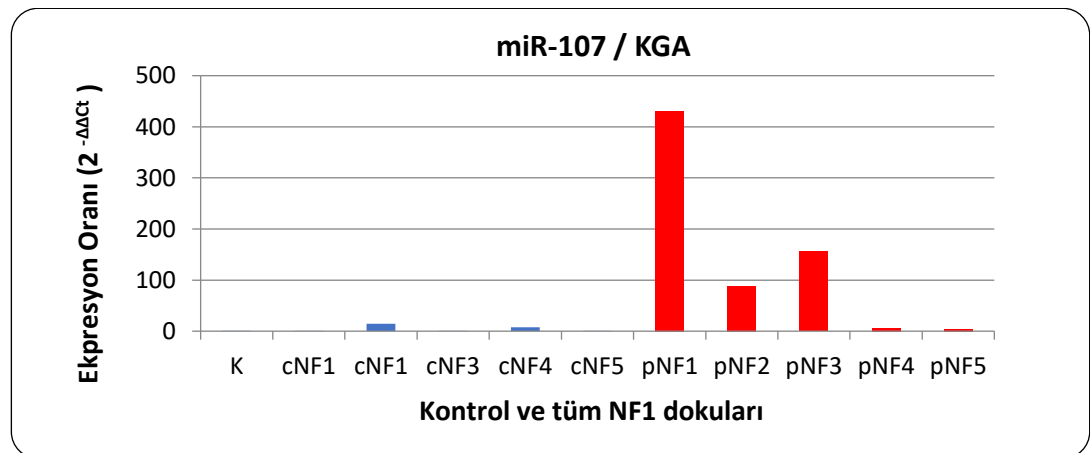
Şekil 4.16 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-217 ekspresyon analiz grafiği (TSG: Tümör Supresör Gen)

Şekil 4.16'ya baktığımızda mir-217 geni için pNF dokularında (özellikle pNF1 ve pNF2) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF4 ve cNF2 hariç, cNF dokularda ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



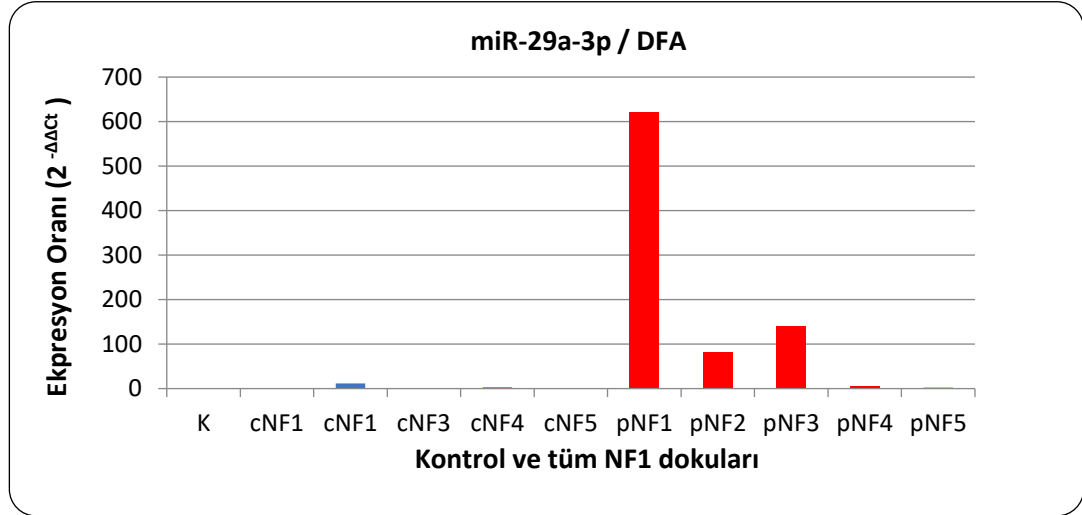
Şekil 4.17 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-21-5p ekspresyon analiz grafiği (DFA: Diğer fonksiyonlarla alakalı)

Şekil 4.17'ye baktığımızda mir-21-5p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1) en yüksek ekspresyon düzeyi pNF1'de gözlenmiştir, diğer pNF dokuları düşük seviyede ekspresyon göstermiş olup, cNF dokularda ise cNF4 hariç, ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



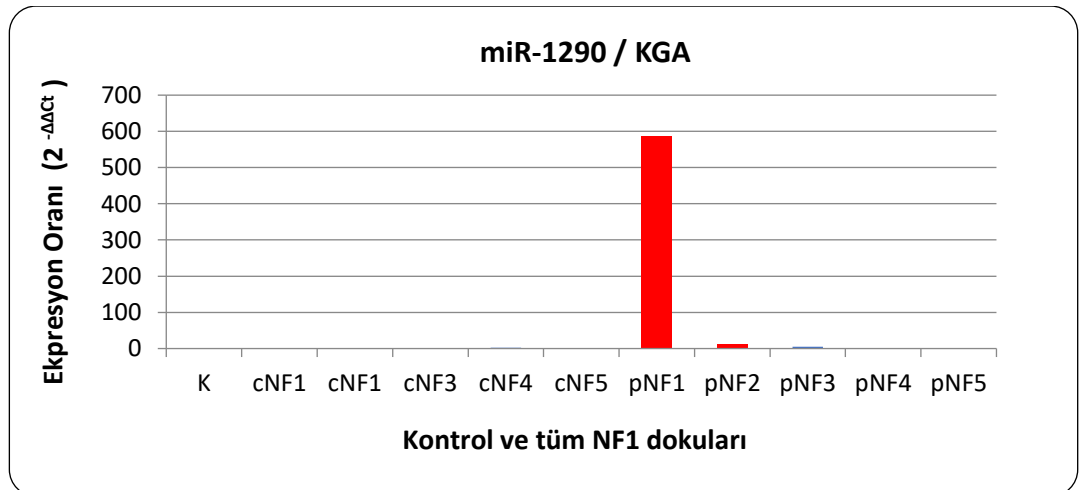
Şekil 4.18 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-107 analiz grafiği (KGA: Kanser gelişimi ile alakalı)

Şekil 4.18'e baktığımızda mir-107 geni için pNF dokularında (özellikle pNF1, pNF2 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise cNF2 ve cNF4 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



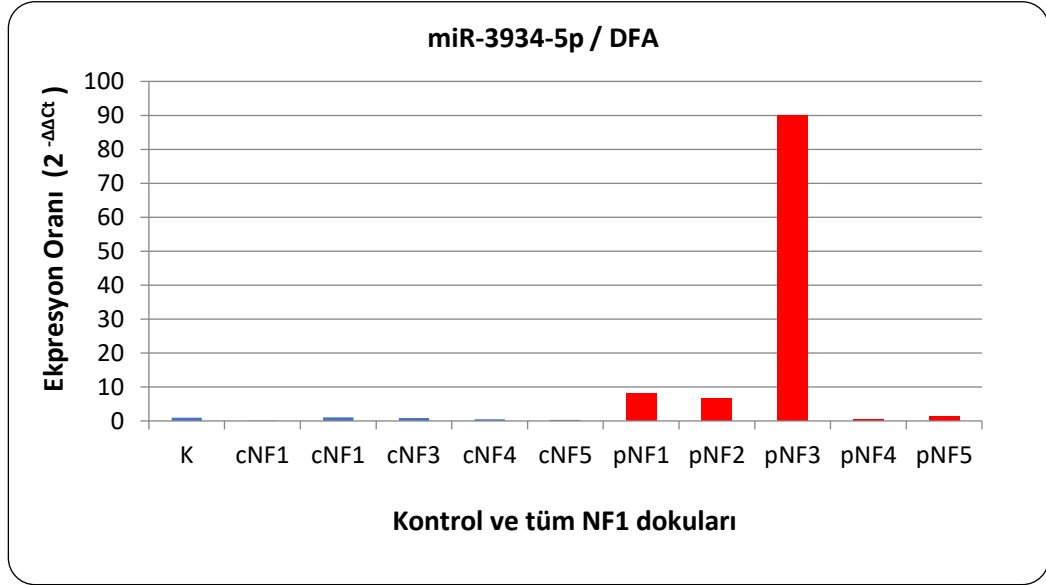
Şekil 4.19 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-29a-3p ekspresyon analiz grafiği (DFA: Diğer fonksiyonlarla alakalı)

Şekil 4.19'a baktığımızda mir-29a-3p geni için pNF dokularında (özellikle pNF1, pNF2 ve pNF3) yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiştir, cNF dokularında ise ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



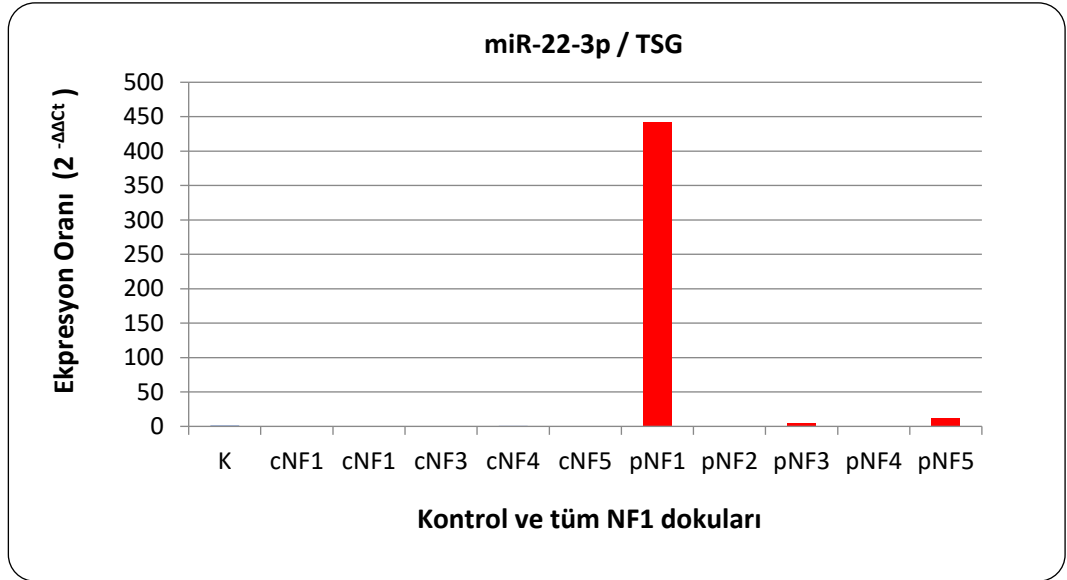
Şekil 4.20 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-1290 ekspresyon grafiği analiz grafiği (KGA: Kanseri gelişimi ile alakalı)

Şekil 4.20'ye baktığımızda mir-1290 geni için pNF dokularından özellikle pNF1'de yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş diğer pNF dokularında ciddi bir ekspresyon seviyesi görülmemiştir. cNF dokularında ise belirgin bir ekspresyon gözlenmemiştir.



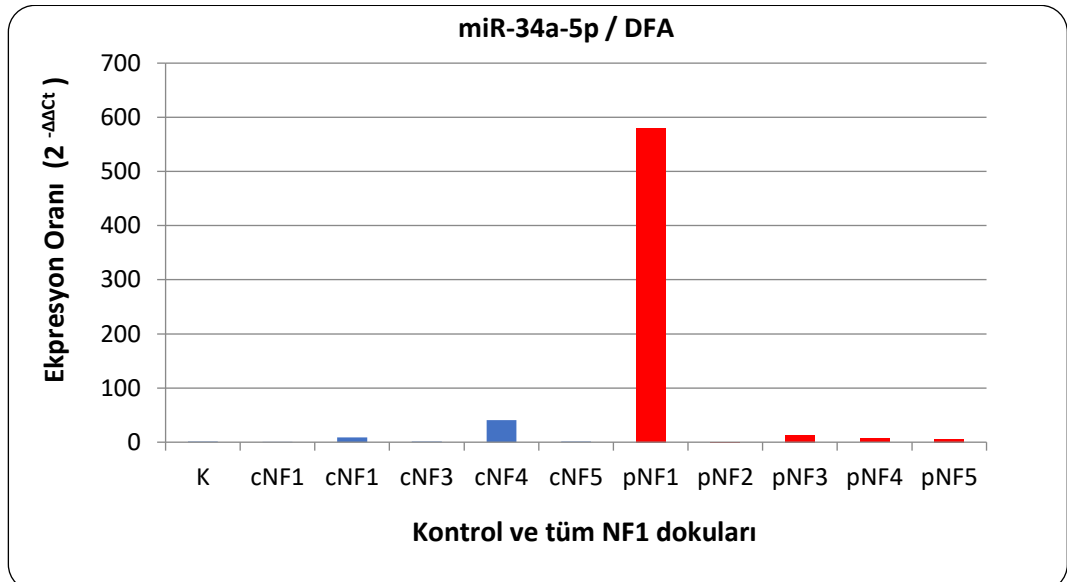
Şekil 4.21 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-3934-5p ekspresyon analiz grafiği (DFA: Diğer fonksiyonlarla alakalı)

Şekil 4.21'e baktığımızda mir-3934-5p geni için pNF nörofibroma dokularından özellikle pNF3'de yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş, onu sırasıyla pNF1 ve pNF2 nörofibroma dokularının ekspresyonu izlemiştir. cNF dokularında ise ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir.



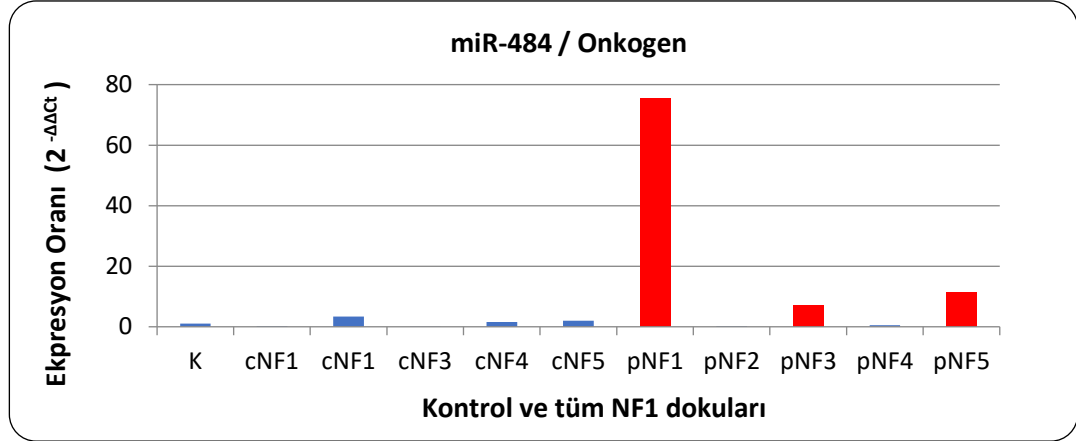
Şekil 4.22 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-22-3p ekspresyon analiz grafiği (TSG: Tümör Supresör Gen)

Şekil 4.22'ye baktığımızda mir-22-3p geni için özellikle pNF1 nörofibroma dokusunda yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş diğer pNF dokularından pNF5'de bir miktar ekspresyon görülmüş olup, cNF dokularında ise bir ekspresyon gözlenmemiştir.



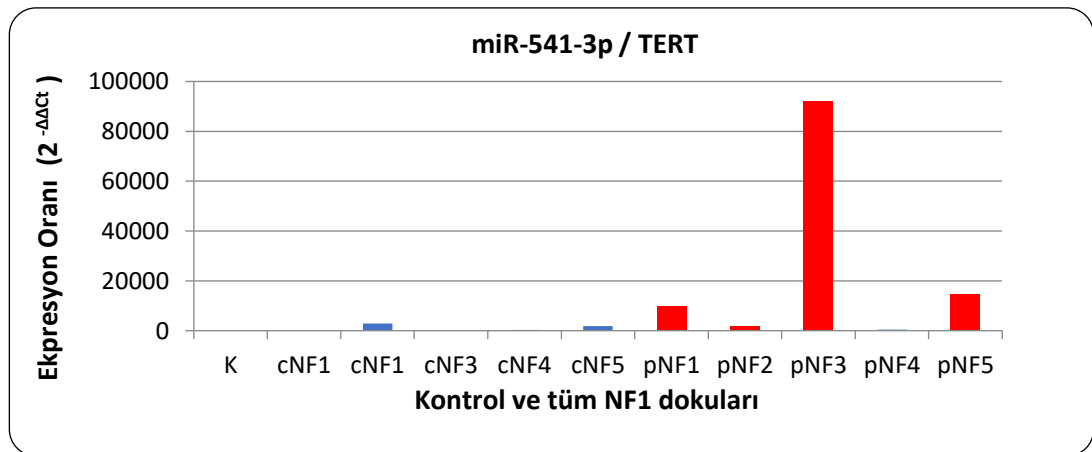
Şekil 4.23 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-34a-5p ekspresyon analiz grafiği (DFA: Diğer fonksiyonlarla alakalı)

Şekil 4.23'e baktığımızda miR-34a-5p geni için özellikle pNF1 nörofibroma dokusunda yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş diğer pNF dokularından pNF3'de bir miktar ekspresyon görülmüş olup, cNF dokularından en belirgin ekspresyon oranı cNF4'de görülmüştür.



Şekil 4.24 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-484 ekspresyon analiz grafiği

Şekil 4.24'e baktığımızda mir-484 geni için özellikle pNF1 nörofibroma dokusunda yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş diğer pNF nörofibroma dokularından pNF3 ve pNF5'de bir miktar ekspresyon görülmüş olup, cNF nörofibroma dokularında da (cNF2, cNF4 ve cNF5) düşük seviyede ekspresyon görülmüştür.



Şekil 4.25 Gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının miR-541-3p ekspresyon analiz grafiği (TERT: Telomeraz reverse transkriptaz)

Şekil 4.25'e baktığımızda mir-541-3p geni için özellikle pNF3 nörofibroma dokusunda yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş diğer pNF dokularından pNF1 ve pNF5'de bir miktar ekspresyon görülmüş olup, cNF dokularından cNF2 ve cNF5'de düşük seviyede ekspresyon görülmüştür

4.3 NF1 Tümör Dokularında Seçilen miRNA'ların Gen İfadesinin İstatiksel Analizi

Gruplara göre miRNA karşılaştırmaları Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Tüm miRNA ekspresyonlarının istatistiksel analizi

	Test Statistics ^a	
	Z	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
miR128	2.402	0.016
miR1182	1.984	0.056
miR361	1.984	0.056
miR23	2.402	0.016
miR138	2.193	0.032
miR133a	1.567	0.151
miR155	1.776	0.095
miR122	1.776	0.095
miR217	1.776	0.095
miR21	1.567	0.151
miR107	1.776	0.095
miR29a	1.984	0.056
miR1290	1.567	0.151
miR3934	1.984	0.056
miR541	1.776	0.095

Sadece koyu renk ile işaretli olanlar miRNA'lar arasında fark görülmüş olup, diğer miRNA'ların ortancaları cNF ile pNF gruplarında istatistiksel olarak benzer, farksızdır.

Çizelge 4.5 Kontrole göre cNF ve pNF gruplarında tüm miRNA değerlerinin istatistiksel analizi

One-Sample Test				
	Grup			
	cNF		pNF	
	Test Value = 1		Test Value = 1	
	t	p	t	p
miR128	0.660	0.546	1.919	0.127
miR1182	1.627	0.179	2.126	0.101
miR361	2.086	0.105	1.712	0.162
miR23	0.786	0.476	1.473	0.215
miR138	1.541	0.198	1.683	0.168
miR133a	1.307	0.261	1.523	0.202
miR155	1.048	0.354	1.555	0.195
miR122	1.443	0.222	1.410	0.231
miR217	2.040	0.111	1.400	0.234
miR21	1.082	0.340	1.207	0.294
miR107	1.270	0.273	1.733	0.158
miR29a	0.957	0.393	1.467	0.216
miR1290	0.918	0.411	1.031	0.361
miR3934	2.364	0.077	1.174	0.305
miR541	1.788	0.148	1.373	0.242

cNF ve pNF gruplarında tüm miRNA değerleri kontrol grubundan istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Tartışma

Bu tez çalışmasında, NF1 hastalarından elde edilen cNF ve pNF tümör dokularındaki telomer uzunlukları, telomer aktiviteleri ve miRNA gen ifadelerinin sağlıklı kontrol dokuya göre değerlendirilmesi amaçlandı. Bunun için 11 uygun doku seçildi (Bir kontrol (K), beş cNF ve beş pNF tümör dokusu) ve bu dokularda telomer uzunluğunun kısalıp kısalmadığı, telomeraz aktivitesinin ne yönde değiştiği ve seçilen 19 miRNA'nın gen ifadesinin kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile nasıl değişkenlik gösterdiği değerlendirilmiştir.

Nörofibromatozis tip 1 (NF1) 1/2500 (Wilson vd. 2021) görülme sıklığı olan multisistemik, otozomal dominant ve kansere yatkınlık ile giden bir nörokutanöz hastalıktır. Ciltte çok sayıda kahverengi lekeler, çiller ve nörofibrom adı verilen iyi huylu tümörlerle kendini göstermektedir. Tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gösteren NF1 gen protein ürünü olan nörofibromin kaybı, proliferasyon ve tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Hastaların % 15-20'si pleksiform nörofibrom, MPSKT ve diğer malignansileri geliştirebilir. NF1 klinik olarak birinci derecede periferik sinir sistemi olmak üzere, vücudun çeşitli organ ve sistemlerini tutan bir hastalıktır. Temel karakteristik bulguları nörofibrom oluşumu, aksiller ve inguinal çillenme, CALM'lar, Lisch nodülleri, kemik deformiteleri, öğrenme güçlüğü ve tümör gelişimine yatkınlıktır (von Deimling vd.1995). Bu sayılan kriterlerden en az ikisini gösteren hastalara NF1 tanısı konmaktadır. NF1 hastalığı için bir takım genotip-fenotip korelasyonları belirlenmiş olsa da henüz kesin bir ilişki belirlenebilmiş değildir. Aynı zamanda aynı aile içinde NF1 tanısı almış bireylerde bile farklı klinik özellikler görülebilmektedir (Gutmann vd. 2017, Pasmant vd. 2011). Ayrıca hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamakla birlikte tedaviler semptomatiktir (Gutmann vd. 2017). Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup görüşlerden birisi de modifiye edici genlerin etkili olabileceğidir. Çeşitli ve farklı semptomlar için farklı modifiye edici genler çalışılmaktadır.

Birçok aday genlerin klinik varyasyonlar için modifiye edici etkisi çalışılmakta ve bu değişiklikler arasında telomer uzunluğunun ve aktivitesinin de etkili olabileceği son yıllarda yapılan çalışmalarla vurgulanmaktadır. Ayrıca birçok kanser tipinde telomeraz bazlı terapötik ajanların kullanımı açısından yararlı olabilir. Telomerler, dokuların mitotik aktivitesine ve yaşam şekline bağlı olarak yılda ortalama 15-28 baz çifti kadar kısalmaktadır. Kısa telomer uzunluğunun bu nedenle kümülatif hücresel yaşlanmanın, artmış kanser riskinin ve kanser sonrası artmış erken ölüm riskinin bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir (Weischer vd. 2013). Birçok kanser türünde ve normal popülasyonda telomer uzunlukları çalışılmış ve bazı çalışmalarda kısa telomer uzunluğunun artmış kanser riski ve kısa sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wentzensen vd. 2011). Telomer uzunluğu, stres, yaşlanma, kanser, obezite ve diğer birçok hastalığın mekanizmasını incelemek için biyobelirteç olarak kullanılabilir (Trybek vd. 2020) Son yıllarda da yapılan araştırmalar, telomer ve telomeraz aktivitesinin önemini ve hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak NF1 hastaları için bu kavramla ilgili araştırmalar son yıllarda başlamış olup sayısı çok azdır (Sharafi vd. 2023). Bu çalışma NF1 ve telomerler arasındaki ilişkiyi gösteren tek çalışmadır ve daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Diğer bir biyobelirteç olarak miRNA'lar ise son yıllarda kanserdeki rollerinin ve işlevlerinin anlaşılmasına başlanması ile kanserin moleküler patolojisinin anlaşılmasında, hücre tipinin belirlenmesi ve farklılaşmasında, patolojik vakalarda önemli düzenleyici roller almasıyla ve moleküler hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesinde öncü olmaya başlamıştır.

NF1 bir tümör predispozisyon bozukluğudur ve NF1 hastaları birçok kanser türü için daha yüksek riske sahiptir (Kresak ve Walsh 2016). miRNA'ların hücrelerdeki regülatör rollerinin yanı sıra kanser başlatıcı rolleri göz önüne alındığında miRNA'lar NF1 hastalığı için ideal moleküller olabilirler. NF1 hastalığının belirlenmesinde ve tespitinde öncü molekül olarak işlev görebilirler (Wallace, 2018).

Bu nedenle NF1 hastalığında rol oynayabilecek regülatör moleküllerin varlığının ve rollerinin araştırılması günümüzde son derece önemlidir ve literatürlere büyük bir

katkı sağlayabilir. Bu bağlamda NF1 hastalığında miRNA'ların NF1 kanser türünde rollerini araştırmak önemlidir ve bu tür araştırmalar NF1 hastalığının mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir, genotip-fenotip korelasyonunun belirlenmesine yardımcı olabilir ve hastalığın kendisinin tedavisinin bulunmasına katkı sağlayabilir (Wallace, 2018). Bu tez çalışmasında, bu biyobelirteçlere dayanarak NF1 hastalarından elde edilen sonuçları değerlendiren, literatürlere ve olası teşhis ve tedavi yöntemlerine ışık tutabilmek amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında ilk olarak taze dondurulmuş NF1 tümör dokularının telomer uzunluklarının ve aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı. İlk aşamada telomer uzunluklarının belirlenebilmesi için tümör dokulardan DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü ve uygun konsantrasyonlar belirlendi. Telomerlerin PZR reaksiyonu için standart primerler ile beraber O'Callaghan ve grubu tarafından anlatıldığı gibi "housekeeping" gen olarak β -Globin genine ait (tek gen kopyası; SCG) primerleri kullanıldı (O'Callaghan ve Fenech 2011). Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile reaksiyonları gerçekleştirildi. Bu reaksiyona göre elde edilen grafik Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu grafikte, kontrole göre özellikle pNF doku örneklerinde ciddi seviyede telomer uzunluğunun kısaldığı gözlenmiştir. cNF dokularda ise kontrole göre farklı telomer uzunlukları tespit edilmiştir. Bir diğer biyobelirteç olarak ise telomeraz aktivitesinin ölçülmesidir. NF1 tümör dokularından protein izolasyonu yapılarak telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi için gerçek zamanlı PZR ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'de telomeraz aktive eğrisi, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de Ct değerlerine göre de tüm örneklerin telomeraz aktivite grafikleri verilmiştir. Buna göre ilk olarak Şekil 4.3'de Ct değerlerine göre telomeraz aktivite eğrisine baktığımızda, kontrolün ilk önce, daha sonra cNF'lerin ve sonrasında pNF'ların reaksiyona girdiği görüşmüştür. Daha sonrasında bu aktivite eğrisinin Ct değerlerine göre çizilmiş olan grafiklerden Şekil 4.4'e bakıldığında en belirgin telomeraz aktivite azalması yine pNF dokularında görülmüştür. cNF tümör dokularında da kontrole göre aktivite azalması belirlenmiştir.

Aynı zamanda Şekil 4.5’de cNF ve pNF olarak gruplandığımız NF1 tümörlerinin kontrol, hücre pelleti ve inaktive edilmiş örneğe göre grafiği bulunmaktadır. Bu grafiğe göre de yine pNF dokularının kontrol ve diğer örneklerle göre telomeraz aktivitesinin daha çok azaltığı görüşmüştür. Bu sonuçlara göre pNF tümör doku örneklerinde hem telomer uzunluğunun hem de telomeraz aktivitesinin, diğer tümör örneklerine kıyasla en fazla azalmaya sahip olduğu görülmüştür. Bildiğimiz gibi pleksiform nörofibromlar, premalign olarak kabul edilen malignitenin erken evresidir ve premalign tümörlerde telomeraz aktivitesi düşüktür (Engelhardt vd. 1997). Bu çalışmada örnek sayısının az olmasına rağmen literatür çalışmalarına göre paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tezin ikinci aşamasında diğer bir biyobelirteç olarak miRNA analizleri gerçekleştirilmiştir. Burada tercih edilen miRNA’ların büyük bir çoğunluğu özellikle telomeraz enzimi ile bağlantılı miRNA’lardan seçilmiştir. Diğer seçilen miRNA’lar ise NF1’in nörodejeneratif etkisi ile ilgili olan miRNA’lardır.

Telomerazlar, RNA'ya bağımlı polimerazların ayrı bir alt grubunun parçasıdır. Telomeraz, DNA iplikçiklerindeki telomerleri uzatır, böylece normalde postmitotik hale gelecek ve apoptoz geçirecek yaşlanmış hücrelerin Hayflick sınırını aşmasına ve kanserli hücrelerde sıklıkla olduğu gibi potansiyel olarak ölümsüz hale gelmesine olanak tanımaktadır. Spesifik olarak TERT, bir TTAGGG dizisindeki nükleotidlerin bir kromozomun telomerlerinin uçlarına eklenmesini katalize etmekten sorumludur (Shampay ve Blackburn 1988). Tekrarlayan DNA dizilerinin bu şekilde eklenmesi, çoklu replikasyon turlarının ardından kromozomal uçların bozulmasını önler (Poole vd. 2001). Bu tez konusunda amaçlarımızdan birisi de TERT/ hTERT telomeraz enziminin sorumlu olduğu ve NF1 ile ilgili miRNA’ların ekspresyon düzeyinin tespiti ve elde edilecek sonuçların telomer uzunluğu/aktivitesi ile de karşılaştırılmasıdır.

Çalışmanın miRNA analizi kısmında, trizol içerisinde saklanan NF1 tümör dokularından total RNA izolasyonu (Qiagen Marka miRNeasy Mini Kit) yapılmıştır.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları ölçülmüş ve sonra cDNA sentez işlemi Qiagen-miRCURY LNA RT Kit ile gerçekleştirilmiştir.

Buradan elde edilen örneklerin reaksiyon içerisinde çalışıp çalışmadığını kontrol amaçlı üretici firmanın önermiş olduğu U6 snRNA primeri kullanılmıştır (Qiagen-U6 snRNA(hsa, mmu) miRCURY LNA miRNA PCR Assay). Tüm örneklerde U6 snRNA' nın başarılı bir şekilde ifade edildiği tespit edilmiştir. Daha sonrasında tüm NF1 dokularının, kontrol dahil seçilen 19 adet miRNA primeri ile gerçek zamanlı PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre elde edilen analiz grafiklerinin değerlendirmeleri aşağıda açıklanmıştır.

Şekil 4.6'ya baktığımızda gerçek zamanlı PZR çalışmasında kontrole göre tüm tümör dokularının hem tüm miRNA'lara göre analiz grafiği (a) hem de miR-541 ekspresyonu diğer miRNA'lara göre en fazla ekspresyonu olduğu için anlaşılır bir şekilde gösterebilmek adına ayrı br grafik olarak verilmiştir (b). En yüksek ekspresyon seviyesinin pNF doku örneklerinde olduğu gözlenmiştir. cNF doku örneklerinde ise pNF'lere göre daha az seviyede ekspresyon olduğu gözlenmiştir.

Diğer miRNA'lara göre en yüksek ekspresyon seviyesi miR-541 de görülmüş olup, bu grafiğe de baktığımızda çalışılmış olan diğer miRNA'larda ki gibi en yüksek ekspresyon seviyesinin yine pNF doku örneklerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.6 (b)).

Şekil 4.7'de ise gerçek zamanlı PZR çalışmasında her bir miRNA'ya göre (miR-541 hariç) ortalaması alınan cNF ve pNF tümör dokularının miRNA analiz grafiği verilmiştir. Buna göre en yüksek ekspresyon seviyesinin yine pNF'de yüksek olduğu görülmüştür (a). miR-541 için de ayrıca ortalaması alınan cNF ve pNF tümör dokularının miRNA analiz grafiğine baktığımızda yine pNF'lerin daha yüksek ekspresyon verdiği görüşmüştür (b).

Bu sonuçlara bağlı olarak baktığımızda miR-128-3p, miR-1182, miR-361-5p, miR-23a-3p, miR-138-5p, miR-133a-3p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-107 ve miR-29a-3p'ye bakıldığında en yüksek ekspresyon seviyesinin pNF1 ve pNF3 nörofibrom dokularında olduğu, pNF2 ve pNF5 'de ise daha az oranda ekspresyon olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19).

miR-122-5p ve miR-217 geni için pNF dokularından özellikle pNF1 ve pNF2'de yüksek ekspresyon, pNF3 ve pNF5 için düşük seviyede ekspresyon görülmüştür. miR-122 için cNF dokularında ise cNF5 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir. miR-217 geni için cNF dokularında ise cNF4 ve cNF2 hariç, cNF dokularında ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

miR-3934-5p geni için pNF nörofibroma dokularından özellikle pNF3'de yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş, onu sırasıyla pNF1 ve pNF2 dokularının ekspresyonu izlemiştir. cNF dokularında ise ciddi bir ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 4.21).

miR-22 geninin ekspresyon seviyelerine baktığımızda ise özellikle pNF1 dokusunda yüksek ekspresyon düzeyi görülmüş olup diğer pNF dokularından pNF5'de bir miktar ekspresyon görülmüş, cNF dokularında ise bir ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 4.22).

miR-34a-5p geni için özellikle pNF1 nörofibroma dokusunda yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiş, diğer pNF nörofibroma dokularından pNF3'de düşük bir miktar ekspresyon görülmüş olup, cNF dokularından en belirgin ekspresyon oranı cNF4'de görülmüştür (Şekil 4.23).

miR-484 geninin ekspresyon seviyelerine baktığımızda özellikle pNF1 dokusunda yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmiş, diğer pNF nörofibroma dokularından pNF3 ve pNF5'de düşük bir ekspresyon görülmüş olup, cNF nörofibroma dokularında da (cNF2, cNF4 ve cNF5) düşük seviyede ekspresyon görülmüştür (Şekil 4.24).

miR-128-3p, miR-1182 tümör baskılayıcı miRNA'lardır. Literatüre göre miR-128'in bir kanser hücre çizgisi panelinde TERT'in mRNA ve protein seviyelerini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. miR-128, TERT (hTERT)'i düzenler ve ayrıca miR-128'in hem HeLa hücrelerinde hem de teratom hücrelerinde mRNA'nın kodlama dizisi ile doğrudan etkileşime girdiğini göstermiştir (Herlinda vd. 2018).

miR-541 ve miR-133a hTERT (telomeraz aktivitesinden sorumlu) geninin doğrudan düzenlemesi ile ilgili bir miRNA'lardır. Çalışma içerisinde ekspresyon seviyesi en çok görülen (özellikle pNF3) miRNA'lardan birisi de miR-541'dir. Ancak net olarak telomer uzunluğunu nasıl etkilediği hakkında detaylı bir bilgi henüz yoktur. Bu miRNA'ların hTERT geninin doğrudan düzenlemesinden sorumlu bir miRNA olması elde ettiğimiz sonuçların bize yol gösterici olduğunu belirtmektedir. Aynı şekilde yapılan çalışmalara göre miR-133-a'nın telomeraz enziminin aktivitesini düzenleyerek telomer uzunluğunu etkileyebileceği gösterilmiştir. Ancak net olarak literatürlerde detaylı bir bilgiye rastlanmamıştır.

Yakın zamanda yapılan bir araştırmada miR-155'in insan meme kanserinde telomerik tekrar bağlama faktörü (TERF1) 'in ekspresyon seviyesini aşağı doğru düzenleyerek telomer bütünlüğünü bozduğunu göstermiştir. Yüksek miR-155 ekspresyonunun genomik kararsızlığın artmasına yol açtığını ve östrojen reseptörünün pozitif meme kanserinde kötü klinik sonuçla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Tutarlı bir şekilde miR-155 ekspresyonunun aşağı regülasyonu, telomer stabilitesini artırarak, genomik stabiliteyi iyileştirdiği görülmüştür. Bu bulgular miR-155'in genomik kararsızlığa neden olmada birden fazla işlevi olduğunu göstermektedir (Dinami vd. 2014).

Diğer bazı çalışmalarda da miR-155-5p'nin çeşitli kanser türlerinde onkogenik bir miRNA olarak hareket ettiği görülmüştür (Mahesh ve Biswas 2019). Özellikle, miR-155-5p'nin artan regülasyonu mesane (Chen VD. 2020), kolorektal (Qu vd. 2015, Gao vd. 2018) ve meme kanserinde (Pasculli 2020) çeşitli tümör baskılayıcı genleri hedef alarak metastazı ve proliferasyonu teşvik etmektedir. Ayrıca, miR-155-5p'nin artan miktarları, pankreas (Greither 2009), mesane (Wang ve Men 2015) primer karaciğer karsinomu (Han vd. 2012) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Xu

vd. 2013) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde daha kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Önceki yapılan çalışmalar da miR-155-5p'nin berrak hücreli karsinom gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermektedir (Kajdasz vd. 2021, Shiomi vd. 2021).

Başka bir çalışmaya baktığımızda, miR-138'in aşırı ekspresyonu, Malign melanom (MM) hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiş ve hücre apoptozunu ve döngü durmasını tetiklemiştir. Ayrıca insan telomeraz ters transkriptazını (hTERT) miR-138'in doğrudan hedef geni olarak tanımlamışlar ve hTERT protein seviyesine MM hücrelerinde miR-138'in negatif aracılık ettiğini göstermişlerdir. Bu arada hTERT'nin aşırı ekspresyonu, miR-138'in MM hücre çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkilerini kurtarmıştır. miR-138, hTERT'yi hedef alarak insan malign melanom hücrelerinin hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Bu bulgulara göre miR-138'in, hTERT'yi hedef alarak MM'de bir tümör baskılayıcı görevi gördüğüdür. Böylelikle miR-138/hTERT yeni bir tedavi yöntemi olabilir (Li vd. 2017).

İnsan miR-361 kök döngüsü, miR-361-5p ve miR-361-3p dahil olmak üzere iki miRNA'yı kodlar. Bir dizi çalışma, miR-361-5p'nin çoklu kanserlerde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını göstermiştir. FOXM1'i hedef alarak akciğer kanseri ilerlemesini bastırır (Hou vd. 2017). NF1 ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada cNF ve pNF dokularındaki ekspresyon seviyelerini görmek amaçlanmıştır. Daha detaylı bilgi ve sonuçlar için hücre kültürü deneylerinin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Diğer bir çalışılan miRNA miR-217 tarafından, NF1 hedeflenebilir. miR-217, NF1'i inhibe ederek ATF3-MMP13 etkileşimini artırarak meme kanseri hücrelerinin malign özelliklerini desteklemiştir. miR-217, NF1/HSF1/ATG7 eksenini aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin otofajisini indükleyerek anti-kanser ilaçlarına karşı duyarlılığı baskılamıştır. Ayrıca miR-217, meme kanseri hücrelerinin in vivo tümörjenik yeteneğini kolaylaştırmak için NF1'i inhibe edebilmektedir. Bu çalışmada, miR-217'nin c-Jun'u aktive etmek için NF1 ekspresyonunu potansiyel olarak inhibe edebileceğini, böylece ATF3/MMP13'ün ekspresyonunu ve

etkileşimini artırabileceğini ve meme kanseri hücrelerinin malign özelliklerini destekleyebileceğini vurgulamıştır. (Li vd. 2023).

miR-1290 onkogenik bir miRNA'dır. Onkogenik ve tümör baskılayıcı işlevi olan miRNA'ların anormal ekspresyonu, kanserin başlaması, ilerlemesi, malign transformasyonu ve metastazı ile ilişkilidir. Onkomir'ler olarak da bilinen onkogenik miRNA'lar, tümör baskılayıcı genlerin aşağı regülasyonuna aracılık eder ve bunların ekspresyonu kanserde yukarı doğru düzenlenir (Małgorzata vd. 2022).

miR-23a-3p, TRF2 ekspresyonunu inhibe ederek telomer fonksiyon bozukluğunu ve hücrel yaşlanmayı indüklemektedir. Yapılan çalışmada özellikle miR-23a'nın TRF2'nin 3' çevrilmemiş bölgesini (3'UTR) doğrudan hedefleyebileceğini ortaya çıkardı. miR-23a'nın aşırı ekspresyonu, yalnızca telomere bağlı TRF2'yi azaltmakla ve telomer fonksiyon bozukluğunun neden olduğu odakları (TIF'ler) arttırmakla kalmadı, aynı zamanda ektopik olarak eksprese edilen TRF2 ile kurtarılabilecek insan fibroblast hücrelerinin yaşlanmasını da hızlandırdı. TRF2'nin miR-23a'nın spesifik bir hedefi olduğunu göstermekte ve miR-23a'nın telomer regülasyonu ve hücrel yaşlanmada önceden bilinmeyen bir rolünü ortaya çıkarmaktadır (Zhenhua vd. 2015).

İnsan malignitelerindeki çeşitli genleri hedef alan miR-122, onkogen veya tümör baskılayıcı olarak hareket etme potansiyeline sahiptir. miR-122, meme kanseri, akciğer kanseri, mesane, lösemi, karaciğer kanseri, kolorektal kanser, yumurtalık kanseri ve özofagus dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde anormal bir şekilde eksprese edilir ve hem bir tümör promoteri hem de tümör susturucu olarak görev yapmaktadır. NF1'de bu miRNA için henüz bir çalışma olmamakla beraber bu çalışmamızda bize fikir vermesi adına miR-122'in etkileri göz önüne alınarak seçilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Ayrıca, miR-122'nin karsinogenez ve çeşitli kanser türlerinin tümör gelişimindeki düzensizliği ve anormal ekspresyonu, bunun insan kanseri için tanısal ve/veya prognostik bir belirteç olarak yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçların

ışığında miR-122, kanser için potansiyel yeni bir terapötik hedef ve tanısal/prognostik moleküler belirteçtir. Sonuç olarak, mevcut inceleme miR-122'ye ve onun insan kanserlerindeki rolüne kapsamlı bir giriş sunmakta ve hedefe yönelik terapötiklerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Lashkarian 2023).

Çeşitli biyolojik süreçlerdeki yaygın rolü nedeniyle miR-21'e olan ilgi, özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. miR-21'in kanser ve kardiyovasküler hastalıklardaki önemini vurgulayan çeşitli incelemeler halihazırda mevcuttur (Jazbutyte ve Thum 2010, Ribas ve Lupold 2010, Selcuklu vd. 2009).

miR-21'in ilk olarak çeşitli hücre hatlarında apoptotik baskılayıcı olduğu fark edildi (Chan vd. 2005). Daha sonra 540 insan numunesi üzerinde yapılan büyük ölçekli bir çalışmada, miR-21'in bu özelliği taşıyan tek miRNA olduğu bulundu. Birçok ağır kanser türünde de aşırı derecede eksprese edildiği gösterilmiştir. (Asangani vd. 2008, Schramedei vd. 2011). NF1'de bu miR-21 için henüz bir çalışma olmamakla beraber bu çalışmamızda bize fikir vermesi adına miR-21-5p'in olası etkileri göz önüne alınarak seçilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

miR-107 inhibisyonunun NF1 (nörofibromin 1) mRNA ve protein seviyelerini arttırdığını ortaya çıkartmış, bu NF1'in GC'deki miR-107 hedeflerinden biri olduğunu ortaya koymuştur. Lusiferaz raportör tahlili, miR-107'nin, NF1 mRNA'nın 3'-UTR'si içindeki ilk potansiyel bağlanma bölgesine bağlanarak NF1 ekspresyonunu bastırdığını ortaya çıkartmıştır. mRNA stabil analizi, bu bağlanmanın, anormal protein ekspresyonuna katkıda bulunabilecek NF1 mRNA kararsızlığına yol açabileceğini gösterdi. miR-107'nin yüksek ekspresyonun tümör boyutuna ve istila derinliğine katkıda bulunduğunu görmüşlerdir. Sonuçlar, miR-107'nin aşağı regülasyonunun hücre büyümesine, göçüne ve istilasına karşı çıktığını, oysa NF1 baskısının bu fenotipleri desteklediğini göstermiştir (Wang 2016). Bizim çalışmamızda da NF1 dokularındaki ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

Diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'ların çoğunluğunun (%91) pleksiform nörofibromlarla karşılaştırıldığında MPNST grubunda aşağı regüle edildiği bulunmuştur. Aşağı regüle eden miRNA içersinde miR-29a bulunmaktadır (Amirnasr 2020). Bizim çalışmamızda MPNST doku örneği olmadığı için tam bir karşılaştırılma yapılamamıştır.

miR-3934'ün NF1 ile ilgili her hangi bir çalışması yoktur. Bize fikir vermesi adına miR-3934'ün olası etkileri göz önüne alınarak seçilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Bir literatürde ki çalışmaya göre miR-3934, astımda RAGE ekspresyonunu baskılayarak bazofil apoptozunda ileri glikasyon son ürünlerinin neden olduğu artışları kısmen inhibe ettiği görülmüştür.

miR-22, omurgalı türleri arasında yüksek oranda korunur ve ekspresyonu çeşitli organlarda her yerde bulunur (Chen 2015, Wang 2017). Birçok çalışma, miR-22'nin karaciğer, kolon, prostat, meme kanseri, mide kanserleri ve daha pek çok kanser türü dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gelişiminde rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Genel olarak miR-22, metabolik susturucu ve tümör baskılayıcı olarak kabul edilir. Ancak onkojenik etkisi de belgelenmiştir (Wang 2017, Huang 2018).

NF1 ile ilgili her hangi bir çalışması yoktur. Tümör baskılayıcı olarak kabul edildiğinden bize fikir vermesi adına miR-22'nin olası etkileri göz önüne alınarak seçilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

miR-34a'nın çeşitli kanserlerde aşağı regülasyonu kesin olarak belirlenmiştir. Fonksiyonel miR-34a'nın restorasyonunun, kanser hücresi büyümesinin inhibisyonu ve apoptozun uyarılması nedeniyle terapötik bir etki gösterebilmesinin ve dolayısıyla ilaç duyarlılığını arttırabilmesinin nedeni budur. miR-34a taklitleri şu anda kanser tedavisi için değerlendirilmektedir (Duan 2013). Genom çapında transkriptom

analizleri, nörofibromadan MPNST'ye kadar malignite gelişiminin, ekspresyondaki bir artıştan ziyade bir dizi genin ekspresyonunun kaybıyla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu daha sonra, nörofibromlarla karşılaştırıldığında çoğu MPNST'de miR-34a'nın aşağı regülasyonunu gösteren miRNA ekspresyon profilinin çıkarılmasına yol açmıştır. Bu miR-34a kaybı, malignite gelişimine katkıda bulunabilir (Sedani vd. 2012).

Litartürlere göre nörogelişim ile miR-484 arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir.

Ancak tümörlerdeki miRNA-484'ün spesifik düzenleyici mekanizması gibi pek çok soru açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir. MiR-484'ün hem proto-onkogen hem de onkogen olarak hareket edebildiği göz önüne alındığında, miR-484'ün biyolojik özelliklerine dayalı kesin terapötik stratejilerin nasıl geliştirilebileceğinin hala araştırılması gerekmektedir (Jia 2022). Bizim çalışmamızda da NF1 dokularındaki ekspresyon düzeylerine bakılıp bir az da olsa bir öngörü oluşturmaktadır.

miRNA'lardan hTERT ile ilgili olan mir133a, mir138-35, mir-1182, mir-541, ve mir-128-3p hTERT in ekspresyonunu negatif olarak düzenler ve tümör baskılayıcı bir gen olarak da işlev görebilirler. pNF'lere baktığımızda, henüz tümörleşmemiş ancak malignitenin erken evresi olmasından dolayı, olası hTERT ekspresyonunu baskılamak için bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerin yükselmiş olabileceğini ve bu dokuların yüksek dereceli malignite için potansiyel belirteçler olduğunu gösterebilir.

Diğer bakılan mir-23, mir-155 ve mir-361 telomer uzunluğunu düzenleyen TRF1 ve TRF2 genleri ile ilişkilidir. Bu genlerin ekspresyonunun inhibisyonu, telomerin uzmasına sebep olur. Burada saydığımız miRNA'lar da bu genlerin ekspresyon seviyesini aşağıya doğru düzenleyerek telomer bütünlüğünü bozar. Bu bağlamda grafiklerimize baktığımızda pNF1, pNF3 de yine en yüksek ekspresyon seviyesi bunun ardından düşük seviyede pN2 ve pNF5 ekspresyonları izler. Bizim beklediğimiz sonuç ekspresyonun azalması yönünde olmalıydı ancak yine yüksek ekspresyon seviyesi görüldü. Bunun için de bu sonuçların detaylı olarak

araştırılmasını gerektiğini bize göstermektedir. Burada dikkat edici olarak mir-155 de cNF4 'de bir miktar ekspresyon görülmüştür. mir-155, onkogen olarak görev yapan bir miRNA olduğu düşünülebilir.

Tümör gelişimi ile ilgili miRNA'lar olan mir-484, mir-217 ve mir-22'ye baktığımızda, bu mirRNA'dan mir-484 onkogen-proto-onkogen olarak görev alabilir (nörolojik bozukluklar). Birçok farklı mutasyon olabileceğini düşünerek tam etkenlerinin araştırması gerekmektedir. mir-217, mir-22 tümör baskılayıcı olarak görev alır. Bu iki miRNA'nın pNF'deki yüksek ekspresyonu, yüksek malignitesi olabileceği düşünülen PNF'ler için beklenebilir bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

Kanser gelişimi ile ilgili seçilmiş olan miRNA'lardan, mir-107, NF1'i etkileyerek, inhibisyonu proliferasyona ve hücre göçüne neden olur. mir-107 ekspresyonu yüksek olan sırasıyla pNF1, pNF3 ve pNF2'dir ve ekspresyonu NF1 ile ilişki olduğundan artması beklediğimiz sonuçlardandır. miR-1290, onkogen özelliktedir ve ekspresyonu yüksek olduğunda NF1'i baskılamaktadır. En yüksek ve tek ekspresyon pNF1'de görülmüştür. Diğer örneklerde de ekspresyon bekleniyordu. Bu nedenler detaylı araştırılması gerekmektedir.

Diğer fonksiyonlar ile ilgili çalışılan miRNA'lar; miR-21-5p, miR-29-3p, miR-34a miR-122-5p, miR-3934-5p'dir. Buradaki miRNA'lardan mir-29, mir-34, mir-3934 ve mir21 proliferasyonu inhibe eder, apoptozu destekler. (Analizlere göre yüksek ekspresyon gösteren pNF'lerde yine maligniteden kaynaklı ekspresyon etkisi düşünülebilir. cNF4'te de ekspresyon görülmesi bu örnek miRNA lar için saf kültürlerle çalışılması ve detaylı analizler yapmamız gerektiğini bize yine göstermiştir).

mir-122, hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak görev alabilir, burada tümör baskılayıcı etkisi düşünülebilir. Ancak genel olarak baktığımızda NF1 ile ilgili detaylı çalışma yok denecek kadar azdır.

miRNA'ların fonksiyonları düşünüldüğünde ve NF1 geninde de meydana gelen çok sayıda mutasyonun oluşumu birçok sonucu doğurabilir. Bu nedenle bu çalışma bizim için pilot bir çalışma olmuş olup elde ettiğimiz verilerinden özellikle bazı miRNA ve örneklerin tekrar ve detaylı olarak çalışılması gerektiğini vurgulamaktadır. miRNA'ların çok fazla sayıda göstermiş olduğu bu özellik ve fonksiyonlarından dolayı çok bilinmeyenli bir denklem oluşturduğu görülmektedir. Buda bize çözülmesi ve cevaplaması gereken birçok soru olduğunu göstermektedir.

miRNA'ların hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak nasıl hareket ettiğinin daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. En yaygın hastalık tarama yöntemlerinin, tümörleri hastalığın erken evrelerinde doğru bir şekilde taramakta başarısız olduğu göz önüne alındığında, serum ve dokularda miRNA ekspresyonunun tespit edilmesi, tümör teşhisi, prognozu ve tedavisi için etkili bir hedef haline gelebilir ve tümör tedavisinde miRNA için umut verici bir uygulama sağlayabilir.

Bu tez çalışmasında, pleksiform nörofibromun hem telomer uzunluğunun hem de telomeraz aktivitesinin, diğer tümör örneklerine kıyasla en fazla azalmaya sahip olduğunu göstermektedir. Diğer bir biyobelirteç olarak da miRNA ekspresyon seviyelerinin pleksiform nörofibromlarda yine diğer tümör örneklerine göre en yüksek ekspresyon seviyesinin olduğunu göstermiştir.

5.2 Sonuç

Bu sonuçlara ve literatürlere göre telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesindeki herhangi bir değişiklik hastalığın ilerlemesini etkileyebilir. Bu bulgular, NF1 hastalarında telomeraz aktivitesinin ve TERT ekspresyon seviyesinin yüksek dereceli malignite için potansiyel belirteçler olduğunu gösterebilir. Bu çalışmada örnek sayısının az olmasına rağmen literatür çalışmalarına göre paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca çalışılan bu miRNA'ların çoğunun hTERT geninin doğrudan düzenlemesinden sorumlu miRNA'lar olması, bazı miRNA'ların hTERT'i hedef alarak tümör baskılayıcı gen olarak görev almasından dolayı birçok kanser türünün

miRNA/hTERT tedavi şekli kullanarak yeni tedavi yöntemlerine olanak sağlayabilir. Yapılan bu çalışmalar sonucu elde edilen verilerin bize ileride yapılacak olan yeni çalışmalar için yol gösterici olduğunu göstermektedir.

Elde ettiğimiz bu bulgulara dayanarak daha net sonuçlar almak adına başka parametrelere bakılması gerektiğini bize göstermiş olup, özellikle NF1 tümör dokularından hücre kültürü çalışılmasına geçilmesi gerektiğini göstermiştir.

Bununla beraber geniş bir miRNA taraması yapmak adına bundan sonraki çalışmalarımızda RNAseq çalışmasının da yapılması bizlere birçok miRNA'nın NF1 hastalığında ki rolü hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdallah, P., Luciano, P., Runge, K.W., Lisby, M., Geli, V., Gilson, E., Teixeira, M.T. 2009. A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere *Nat Cell Biol.*, (11), 988-993.
- Allison, L.A. 2014. *Temel Moleküler Biyoloji* (A.O. Beldüz, Çeviri Ed.) Ankara: Palme Yayıncılık
- Amirnasr, A., Verdijk, R.M., van Kuijk, P.F., Kartal, P., Vriends, A.L.M., French, P. J., van Royen, M.E., Taal, W., Sleijfer, S. and Wiemer, E.A.C. 2020. Deregulated microRNAs in neurofibromatosis type 1 derived malignant peripheral nerve sheath tumors. *Sci Rep.*, (10), 2927.
- Anastasaki, C., Le, L.Q., Kesterson, R.A., Gutmann, D.H., 2017. Updated nomenclature for human and mouse neurofibromatosis type 1 genes. *Neurol Genet*, 3(4), e169.
- Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., Allgayer, H. 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor *Pdcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, (27), 2128–2136.
- Beezhold, K.J., Castranova, V. and Chen F. 2010. Microprocessor of miRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Mol Cancer*, (9), 134-143
- Bijnens, E.M. et al. 2017. Telomere tracking from birth to adulthood and residential traffic exposure *BMC Med.*, (15), 205.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W., Szostak, J.W. 2006. Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging *Nat Med* (12), 1133-1138.
- Bottillo, I., Ahlquist, T., Brekke, H., Danielsen, S.A., van den Berg, E., Mertens, F., Dallapiccola, B. 2009). Germline and somatic *nf1* mutations in sporadic and *nf1*- associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol*, 217(5), 693-701.
- Boyd, K.P., Korf, B.R., Theos, A., 2009. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*, 61(1), 1-14; quiz 15-16.
- Britt-Compton, B., Rowson, J., Locke, M., Mackenzie, I., Kipling, D., Baird, D.M. 2006. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis acting determinants in humans *Hum Mol Genet* (15), 725-733.

- Brossier, N.M., Carroll, S.L., 2012. Genetically engineered mouse models shed newlight on the pathogenesis of neurofibromatosis type i-related neoplasms of the peripheral nervous system. *Brain Res Bull*, 88(1), 58-71.
- Cawthon, R.M. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR *Nucleic Acids Res* (30), e47.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, (65), 6029–6033.
- Chen, L., Yang, X., Zhao, J., Xiong, M., Almaraihah, R., Chen, Z., Hou, T. 2020. Circ_0008532 promotes bladder cancer progression by regulation of the miR-155-5p/miR-330-5p/MTGR1 axis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, (27), 94.
- Chen, B., Tang, H., Liu, X., et al. 2015. miR-22 as a prognostic factor targets glucose transporter protein type 1 in breast cancer. *Canc Lett.*, (35), 410–417
- Cichowski, K., Jacks, T., 2001. Nf1 tumor suppressor gene function: Narrowing the gap. *Cell*, 104(4), 593-604.
- Cimino, P. J., Gutmann, D. 2018. Neurofibromatosis type 1. *Handbook of clinical neurology*, (148), 799-811.
- Daras, M., Kaley, J.T., 2015. Benign brain tumors and tumors associated with phakomatoses. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, (21(2 Neuro-oncology)), 397-414.
- De Lange, T. 2005. Telomere-related genome instability in cancer *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, (70), 197-204.
- Department of Molecular Biology and Biochemistry, Francisco J. Ayala School of Biological Sciences, University of California, Irvine 92697–3900, CA, USA
- Dinami, R., Ercolani, C., Petti, E., Piazza, S., Ciani, Y., Sestito, R., Sacconi, A., Biagioni, F., le Sage, C., Agami, R., et al. 2014. miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res.*, (74), 4145–4156.
- Duan, W., Xu, Y., Dong, Y., Cao, L., Tong, J., Zhou, X. 2013. Ectopic expression of miR-34a enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells, partly by suppressing the LyGDI signaling pathway. *J. Radiat. Res.*, (54), 611–619.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J. and Moore, M.A. 1997. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res.*, 3(11), 1931-41.

- Engelhardt, M., Kumar, R., Albanell, J., Pettengell, R., Han, W. & Moore, M. 1997. Telomerase regulation, cell cycle and telomere stability in primitive haematopoietic cells. *Blood*, (90),182±193.
- Fan, F., Zhuang, J., Zhou, P., Liu, X., & Luo, Y. 2017. Microrna-34a promotes mitochondrial dysfunction-induced apoptosis in human lens epithelial cells by targeting notch2. *Oncotarget*, 8(66), 110209-110220.
- Gao, Y., Liu, Z., Ding, Z., Hou, S., Li J., Jiang, K. 2018. MicroRNA-155 increases colon cancer chemoresistance to cisplatin by targeting forkhead box O3. *Oncol. Lett.*, (1), 4781–4788.
- Gottfried, O.N., Viskochil, D.H., Fults, D.W., & Couldwell, W.T., 2006. Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery*, 58(1), 1-16; discussion 11-16.
- Greider, C.W. 1998. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95:90–2.
- Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschläger, C., Würfl, P., Taubert, H. 2009. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int. J. Cancer.*, (126),73–80.
- Greider, C.W. 1998. Telomeres and senescence: the history, the experiment, th future *Curr Biol.*, (8), R178-181.
- Gutmann, D.H., Ferner, R.E., Listernick, R.H., Korf, B.R., Wolters, P.L., Johnson, K.J., 2017. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17004.
- Guz, M., Jeleniewicz, W., and Cybulski, M. 2022. An Insight into miR-1290: An Oncogenic miRNA with Diagnostic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1234
- Han, Z.B., Chen, H.Y., Fan, J.W., Wu, J.Y., Tang, H.M., Peng, Z.H. 2012. Up-regulation of microRNA-155 promotes cancer cell invasion and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, (138), 153–161.
- Hartmann, U., Brummendorf, T.H., Balabanov, S., Thiede, C., Illme, T., Schaich, M. 2005. Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid leukemia correlates with chromosomal abnormalities *Haematologica* (90),307-316.
- Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., Greider, C.W. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability *Cell* (107),67-77.

- Herlinda, G., Katie, S., Adam, I., Aurore, B., Douglas, J., Iben, D., Dimitrios, G.Z. and Irene, M.P. 2018. miR-128 inhibits telomerase activity by targeting TERT mRNA. *Oncotarget*, 9(17): 13244–13253.
- Hilde B., Eline B., Thomy de R., Eric L., 2009. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol.*, (10), 508–15.
- Hou, X. W., Sun, X., Yu, Y., et al. 2017. miR-361-5p suppresses lung cancer cell lines progression by targeting FOXM1. *Neoplasma.*, 64(4), 526–534.
- Hrdličková, R., Nehyba, J., Bargmann, W., Bose Jr, H.R. 2014. Multiple tumor suppressor micrnas regulate telomerase and tcf7, an important transcriptional regulator of the wnt pathway. *PloS one*, 9(2), e86990.
- Huang, Z.P., Wang, D.Z. 2018. miR-22 in smooth muscle cells: a potential therapy for cardiovascular disease. *Circulation.*, (137),1842–1845.
- Jia, Y., Liu, J., Wang, G. and Song, Z. 2022. miR-484: A Potential Biomarker in Health and Disease. *Front Oncol.*, (12),830420.
- Jiang, C., McKay, R. M., Le, L. Q. 2021.Tumorigenesis in neurofibromatosis type 1: Role of the microenvironment. *Oncogene*, 1-7.
- Jung, Y.-d., Park, S.-K., Kang, D., Hwang, S., Kang, M.-H., Hong, S.-W., You, D. 2020. Epigenetic regulation of mir-29a/mir-30c/dnmt3a axis controls sod2 and mitochondrial oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Redox biology*, (37), 101716.
- Kajdasz, A., Majer, W., Kluzek, K., Sobkowiak, J., Milecki, T., Derebecka, N., Kwias, Z., Bluysen, H.A.R., Wesoly, J. 2021. Identification of RCC Subtype Specific microRNAs–Meta-Analysis of High-Throughput RCC Tumor microRNA Expression Data. *Cancers.*, 13:548.
- Koczkowska, M., Chen, Y., Callens, T., Gomes, A., Sharp, A., Johnson, S., Messiaen, L.M. 2018. Genotype-phenotype correlation in nf1: Evidence for a morsevere phenotype associated with missense mutations affecting nf1codons 844 848. *Am J Hum Genet*, 102(1), 69-87.
- Kresak, J.L., Walsh, M. 2016. Neurofibromatosis: A review of nf1, nf2, and schwannomatosis. *J Pediatr Genet*, 5(2), 98-104.
- Krutzfeldt, J., Poy, M.N., Stoffel, M. 2006. Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat. Genet.*, (38), 14–19.
- Lai, T.P. et al. 2017. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues *Nat Commun*, (8),1356.

- Lashkarian, M. F., Hashemipour, N., Niaraki, N., Soghala, S., Moradi, A., Sarhangi, S., Hatami, M., Aghaei-Zarch, F., Khosravifar, M., Mohammadzadeh, A., Najafi, S., Majidpoor, J., Farnia, P., Aghaei-Zarch, S.M. 2023. MicroRNA-122 in human cancers: from mechanistic to clinical perspectives. *Cancer Cell International*, (23), 29.
- Le, L.Q., Parada, L.F., 2007. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type i: Connecting the gaps. *Oncogene*, 26(32), 4609-4616.
- Li, W., Yang, C., Li, J., Li, X., Peng, Zhou P. 2023. MicroRNA-217 aggravates breast cancer through activation of NF1-mediated HSF1/ATG7 axis and c-Jun/ATF3/MMP13 axis. *Hum Cell*, 36(1):377-392.
- Li, C., Zhang, Z., Tao Gao, T., Du, M., 2017. MicroRNA-138 suppresses cell proliferation of human malignant melanoma cells by targeting hTERT. *Int J Clin Exp Med.*, 10(4), 6517-6526.
- Liu, Y., Snow, B.E., Hande, M.P., Yeung, D. , Erdmann, N.J. , Wakeham, A., Itie, A., Siderovski, D.P., Lansdorp, P.M., Robinson, M.O., Harrington, L., 2000. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Curr Biol.*, 10(22),1459-62.
- Lou, G., Ma, N., Xu, Y., Jiang, L., Yang, J., Wang, C., Gao, X. 2015. Differential distribution of u6 (rnu6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microrna quantification. *Int J Mol Med*, 36(5), 1400-1408.
- Luo, Z., Feng, X., Wang, H., Xu, W., Hao, Y., Ma, W., Jiang, S., Liu, D., Huang, J., Songyang, Z.2015. Mir-23a induces telomere dysfunction and cellular senescence by inhibiting TRF2 expression. *Aging Cell*, 14(3):391-9
- Mahesh, G. and Biswas, R. 2019. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J. Interf. Cytokine Res.*, (39), 321–330.
- Mantripragada, K.K. et al. 2008. Telomerase activity is a biomarker for high grade malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1 individuals *Genes Chromosomes Cancer*, (47),238-246.
- Masliah-Planchon, J., Pasmant, E., Luscan, A., Laurendeau, I., Ortonne, N., Hivelin, M., Lantieri, L. 2013. Micrornaome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: Evidences of pten pathway alterations in early nf1 tumorigenesis. *BMC genomics*, 14(1), 1-11.
- Mayer, S. et al. 2006. Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans *Cytogenet Genome Res* 112:194-201

- McClintock, B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays Genetics, (26), 234-282.
- Montpetit, A.J. et al. 2014. Telomere length: a review of methods for measurement Nurs Res., (63),289-299.
- Moyzis, R.K. et al. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes Proc Natl Acad Sci U S A, (85),6622-6626.
- Nana-Sinkam, S.P., Croce, C.M. 2011. MicroRNAs as therapeutic targets in cancer. Transl Res, (157), 216–225.
- Ortega, M.A., Fraile-Martínez, O., Guijarro, L.G., Casanova, C., Coca, S., Álvarez-Mon, M., Asúnsolo, Á. 2020. The regulatory role of mitochondrial micromRNAs (mitomirs) in breast cancer: Translational implications present and future. Cancers, 12(9), 2443.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. 2018. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. Frontiers in endocrinology, (9),402.
- O'Callaghan, N.J., Fenech, M. 2011. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length Biol Proced Online 13:3
- Palm, W., de Lange, T. 2008. How shelterin protects mammalian telomeres Annu Rev Genet 42:301-334.
- Park, W.J., Bae, S.U., Heo, Y.R., Jung, S.J., Lee, J.H. 2017. Telomere shortening in non- tumorous and tumor mucosa is independently related to colorectal carcinogenesis in precancerous lesions Int J Mol Epidemiol Genet, (8),53-58.
- Pasculli, B., Barbano, R., Fontana, A., Biagini, T., Di, Viesti M.P., Rendina, M., Valori, V.M., Morritti, M., Bravaccini, S., Ravaioli, S., et al. 2020. Hsa-miR-155-5p Up-Regulation in Breast Cancer and Its Relevance for Treatment With Poly[ADP-Ribose] Polymerase 1 (PARP-1) Inhibitors. Front. Oncol., (12), 10.
- Pasmant, E., Sabbagh, A., Masliah-Planchon, J., Ortonne, N., Laurendeau, I., Melin, L.,Valeyrie-Allanore, L.,2011. Role of noncoding rna anril in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. Journal of the National Cancer Institute, 103(22), 1713-1722.
- Poole, J.C., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). Gene., 269 (1–2), 1–12.

- Qu, Y.L., Wang, H.F., Sun, Z.Q., Tang, Y., Han, X.N., Yu, X.B., Liu, K. 2015. Up-regulated miR-155-5p promotes cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, (1), 6988–6994.
- Ratner, N., Miller, S.J. 2015. A rasopathy gene commonly mutated in cancer: The neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*, 15(5), 290–301.
- Ribas, J., Lupold, S.E. 2010. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. *Cell Cycle*, (9), 923–929.
- Sedani, A., Cooper, D.N., Upadhyaya, M. 2012. An emerging role for micrnas in nf1 tumorigenesis. *Human genomics*, 6(1),1-9.
- Selcuklu, S.D., Donoghue, M.T., Spillane, C. 2009. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans.*, (37), 918–925.
- Schramedei, K., Morbt, N., Pfeifer, G., Lauter, J., Rosolowski, M., Tomm, J.M., et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene*. 2011;30:2975–2985.
- Shampay, J., Blackburn, E.H. 1988. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (2), 534–8.
- Sharafi, P., Ayter, S., 2018. Possible modifier genes in the variation of neurofibromatosis type 1 clinical phenotypes. *Journal of neurogenetics*, 32(2), 65-77.
- Shiomi, E., Kato R., Matsuura, T., Maekawa, S., Kato, Y., Kanehira, M., Takata, R., Sugimure, J., Ishida, K., Abe, T., et al. 2021. Relationship between miR-155 expression and clear cell papillary renal cell carcinoma in the dialyzed kidney. *IJU Case Rep.*, (4), 127–131.
- Tamura, R. 2021. Current understanding of neurofibromatosis type 1, 2, and schwannomatosis. *Int J Mol Sci*, 22(11).
- Tiryakioğlu, A.F., Özkan, M.N., Kayım, S., Bağcı, Ö., Çeviker, K., Tatar, B., Yazkan, R and Erdeoğlu, E. 2016. *Journal of Engineering Sciences and Design* 4(2), 125-131.
- Tomoda, R., Seto, M., Tsumuki, H., Iida, K., Yamazaki, T., Sonoda, J. et al. 2002. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression are correlated with clinical aggressiveness in soft tissue tumors. *Cancer*, (95), 1127–33.

- Trovó-Marqui, A.B., Tajara, E.H., 2006. Neurofibromin: A general outlook. *Clin Genet*, 70(1), 1-13.
- Trybek, T., Kowalik, A., Gozdz, S. and Kowalska, A.. 2020. Telomeres and telomerase in oncogenesis. *Oncol Lett.*, 20(2), 1015-27.
- Upadhyaya, M., Majounie, E., Thompson, P., Han, S., Consoli, C., Krawczak, M., Cooper, D.N. 2003. Three different pathological lesions in the *nf1* gene originating de novo in a family with neurofibromatosis type 1. *Hum Genet*, 112(1), 12-17.
- Von Deimling, A., Krone, W., Menon, A.G. 1995. Neurofibromatosis type 1: pathology, clinical features and molecular genetics *Brain Pathol.*, (5),153-162
- Wallace, D.C., Chalkia, D. 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(11), a021220.
- Wallace, D.C. 2018. Mitochondrial genetic medicine. *Nat Genet*, 50(12), 1642-1649.
- Wang, H. and Men, C.P. 2015. Correlation of Increased Expression of MicroRNA-155 in Bladder Cancer and Prognosis. *Lab. Med.*, (46), 118–122.
- Wang, B., Yao, Q., Xu, D., Zhang, J.A. . 2017. MicroRNA-22–3p as a novel regulator and therapeutic target for autoimmune diseases. *Int Rev Immunol*, (36),176–181.
- Wang, J., Li, Y., Ding, M., Zhang, H., Xu, X., Tang, J. 2017. Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review). *Int J Oncol.*, (50),345–355.
- Wang, K., Long, B., Jiao, J.-Q., Wang, J.-X., Liu, J.-P., Li, Q., Li, P.-F. 2012. Mir-484 regulates mitochondrial network through targeting *fis1*. *Nature communications*, 3(1), 1-9.
- Wang, S., Ma, G., Zhu, H., Lv, C., Chu, H., Tong, N., Wu, D., Qiang, F., Weida Gong, W., Zhao, Q., Tao, G., Zhou, J., Zhang, Z., Wang, M. 2016. miR-107 regulates tumor progression by targeting NF1 in gastric cancer. *Sci Rep.*, (9:6), 36531.
- Wang, W.-X., Springer, J.E. 2015. Role of mitochondria in regulating microrna activity and its relevance to the central nervous system. *Neural regeneration research*, 10(7), 1026.
- Wegscheid, M.L., Anastasaki, C., Gutmann, D.H., 2018. Human stem cell modeling in neurofibromatosis type 1 (*nf1*). *Experimental neurology*, 299, 270-280.

- Weischer, M., Nordestgaard, G.B., Cawthon, M.R., Freiberg, J.J., Tybjaerg-Hansen, A., Bojesen, E.S. 2013. Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 individuals. *J Natl Cancer Inst.*, 105(7), 459-68.
- Wentzensen, I.M., Mirabello, L., Pfeiffer, R.M., et al. 2011. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, (20), 1238-50
- Wilson, B.N., John, A.M., Handler, M.Z., Schwartz, R.A., 2021. Neurofibromatosis type 1: New developments in genetics and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(6), 1667-1676.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., et al. 2009. Many Roads to Maturity: MicroRNA Biogenesis Pathways and Their Regulation. *Nature Cell Biology*, (11), 228-234.
- Ye, W., Liang, F., Ying, C., Zhang, M., Feng, D., Jiang, X. 2019. Downregulation of microrna-3934-5p induces apoptosis and inhibits the proliferation of neuroblastoma cells by targeting tp53inp1. *Exp Ther Med*, 18(5), 3729-3736.
- Zhang, W.C., Chin, T.M., Yang, H., Nga, M.E., Lunny, D.P., Lim, E.K., Lim, B. 2016. Tumour-initiating cell-specific mir-1246 and mir-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression. *Nat Commun*, (7),11702.
- Zhao, W.-G., Yu, S.-N., Lu, Z.-H., Ma, Y.-H., Gu, Y.-M., Chen, J. 2010. The mir-217 microrna functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting kras. *Carcinogenesis*, 31(10), 1726-1733.