



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Dahili Tıp Bilimleri / Tıbbi Genetik

**RASOPATİ TANISI ALAN OLGULARDA MOLEKÜLER ANALİZ
SONUÇLARININ RETROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Kübra ATEŞ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

MALATYA

2022



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Dahili Tıp Bilimleri / Tıbbi Genetik

**RASOPATİ TANISI ALAN OLGULARDA MOLEKÜLER ANALİZ
SONUÇLARININ RETROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Kübra ATEŞ

ORCID: 0000-0002-0669-8230

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

MALATYA

2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. RAS proteinleri	2
2.2. RAS/MAPK yolağı ve patolojileri.....	2
2.3. RASopatiler	3
2.3.1. Tanımı	3
2.3.2. Epidemiyoloji.....	4
2.3.3. Etiyolojisi	5
2.3.4. Patogenez	8
2.3.5. Klinik özellikler	11
2.3.6. Kalıtım Paterni	29
2.3.7. Tedavi.....	29
2.4. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi.....	32
2.5. Amaç	34
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1. Olguların Belirlenmesi.....	36
3.2. Etik Kurul Onayı.....	36
3.3. Moleküler Genetik Çalışma	37

3.3.1. Hedeflenmiş RASopati Gen Paneli	37
3.3.4. Kütüphane Kuantifikasyonu.....	45
3.3.6. Ham Datadan Veri Analizi.....	49
3.3.7. Sanger Dizileme	50
3.4. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. Olguların Demografik Verileri	51
4.2. Olguların Klinik Verileri	52
4.2.1. <i>NFI</i> Geninde Varyant Saptanan Olguların Değerlendirilmesi	52
4.2.2. <i>NFI</i> Dışındaki Genlerde Varyant Saptanan Olguların Değerlendirilmesi	78
4.3. Olguların Moleküler Analiz Sonuçları	93
5. TARTIŞMA.....	108
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	118
KAYNAKLAR.....	119
EKLER	150
Ek-1. Etik kurul kararı	150

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde büyük katkısı olan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. İbrahim Tekedereli'ye,

Asistanlık eğitimimde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Elif Yeşilada, Prof. Dr. Ahmet Koç ve Dr. Öğr. Üyesi Cemal Ekici'ye, İnönü Üniversitesi Tıbbi Genetik bölümü asistan hekim arkadaşlarıma, Turgut Özal Tıp Merkezi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi ekibine,

Tez sürecimde desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Zeynep Esener ve Uzm. Dr. Mustafa Doğan'a,

Asistanlık eğitimimde klinik bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ekibine,

Hayatım boyunca desteğini hiçbir zaman esirgememiş, en büyük fedakarlık örneği canım babam Onur Ateş'e, her zaman yanımda olan motivasyon kaynağım canım annem Cemile Ateş'e ve desteğini hep hissettiğim canım kardeşim Ramazan Ateş'e çok teşekkür ederim.

Dr. Kübra ATEŞ

Malatya, 2022

ÖZET

RASopati Tanısı Alan Olgularda Moleküler Analiz Sonuçlarının Retrospektif Olarak İncelenmesi

Amaç: RASopati grubu hastalıklar en sık rastlanan genetik sendrom gruplarından biridir. Klinik bulgular bazı durumlarda iç içe geçmiş şekilde olabilmektedir ve moleküler tanı bu amaçla büyük öneme sahiptir. Bu amaçla oluşturulmuş hedefli gen panelleri hızlı ve ucuz tanı yöntemi olarak oldukça önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında RASopati grubu sendromların hedefli yeni nesil dizi analizi verilerine göre retrospektif olarak araştırılarak, sendrom sıklıkları ile mutasyon türlerinin belirlenmesi ve sonuçların genotip-fenotip korelasyonu ile yorumlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu tez çalışması için 2016-2021 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran ve RASopati moleküler tanısı alan 61 olgu retrospektif olarak incelenmiş, klinik bulguları, olgulara ait demografik bilgiler ve laboratuvar sonuçları taranarak saptanan mutasyonlar ile olguların klinikleri karşılaştırılmıştır. Çalışma verileri için tanımlayıcı istatistiksel metodlar kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışma kapsamında ACMG kriterlerine göre 41 patojenik, 17 muhtemel patojenik ve 3 klinik önemi bilinmeyen (VUS) varyant saptanmıştır. 20 tane daha önce literatürde bildirilmemiş yeni varyant saptanmış, bunların 19 tanesi *NF1* geninde bulunmuştur. Toplamda 41 varyant ise daha önce literatürde bildirilmiştir. İndeks olguların 42 tanesinde *NF1* geninde varyant saptanırken 9 olguda *PTPN11*, 3 olguda *RAF1*, 3 olguda *SOS1* ve birer olguda *KRAS*, *NRAS*, *SOS2* ve *RIT1* genlerinde klinik ile ilişkili varyant mevcuttu.

Sonuç: Çalışmamızda RASopati moleküler tanısı almış olgular retrospektif olarak incelenmiş ve klinik korelasyonları açısından değerlendirilmiştir. RASopati sendromlarının kendi içinde dağılım oranları açısından en sık NF1, 2. sıklıkla Noonan sendromu büyük çoğunluğu oluşturmuştur. Klinik olarak RASopati sendromları arasında ayırıcı tanı yapılamayan durumlarda moleküler analiz oldukça önemlidir. Tasarlanmış hedefli RASopati panel genleri zamansal ve maddi açıdan kazanç sağlanmakta olup tanıyı kolaylaştırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Noonan sendromu, nörofibromatozis tip 1, RASopati, yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Retrospective Study of Molecular Analysis Results in Cases Diagnosed with RASopathy

Aim: RASopathies are one of the most common genetic syndrome groups. Clinical findings may be overlapped in some cases and molecular diagnosis has a great importance for this purpose. Targeted gene panels are very important as a fast and cost-effective diagnostic method. In this thesis, it is aimed to determine the frequency of syndromes and mutation types and to associate them with the clinical findings, to interpret the results with genotype-phenotype correlations by retrospectively investigating RASopathies according to targeted next-generation sequence analysis data.

Material and method: For this thesis study, 61 cases who applied to İnönü University Faculty of Medicine Medical Genetics outpatient clinic between the years 2016-2021 and were diagnosed with RASopathy molecularly were analyzed retrospectively. Descriptive statistical methods were used for the study data.

Results: In the study, 41 pathogenic, 17 likely pathogenic and 3 VUS variants were detected according to ACMG criteria. 20 novel variants were detected, 19 of which were found in the *NF1* gene. Totally, 41 variants have been previously reported in the literature. A variant in *NF1* gene was detected in 42 of the index cases. Clinically related variants were found in *PTPN11* gene in 9 cases, *RAF1* in 3 cases, *SOS1* in 3 cases, *KRAS* in a case, *NRAS* in a case, *SOS2* in a case and *RIT1* in a case.

Conclusion: In our study, cases with a molecular diagnosis of RASopathy were investigated retrospectively and evaluated in terms of clinical correlations. In terms of distribution rates of RASopathies, *NF1* was the most common and Noonan syndrome was the second most common. Molecular analysis is very important, especially in cases that clinical differential diagnosis among RASopathies cannot be made. Designed targeted RASopathy panel tests save time and money and facilitate diagnosis.

Keywords: Noonan syndrome, neurofibromatosis type 1, RASopathy, next generation sequencing

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACMG	: Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>)
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
AMP	: Moleküler Patoloji Derneği (<i>Association for Molecular Pathology</i>)
AoK	: Aort koarktasyonu
ASD	: Atriyal septal defekt
ASO	: Amplatzer septal oklüzyon
AVSD	: Atriyovenriküler septal defekt
AY	: Aort yetmezliği
BAEP	: <i>Brainstem Auditory Evoked Potentials</i>
BAM	: <i>Binary Alignment Map</i>
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CAP	: Amerikan Patologlar Koleji (<i>College of American Pathologists</i>)
cm	: Santimetre
CS	: Costello sendromu
DEHB	: Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EEG	: Elektroensefalografi
EKG	: Elektrokardiyografi
EKO	: Ekokardiyografi

ERK1/2	: Ekstraselüler sinyal ile regüle olan kinaz 1 ve 2
GAP	: GTPaz aktive edici protein
GDP	: Guanozin difosfat
GEF	: Guanin nükleotit değişim faktörleri
GH	: Gebelik haftası
GRB2	: Büyüme faktörü reseptörü bağlayıcı protein 2
GSNS	: Gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk
GTP	: Guanozin trifosfat
HKMP	: Hipertrofik kardiyomiyopati
HT	: Hipertansiyon
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IGFBP-3	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3
IGV	: <i>Integrative Genomics Viewer</i>
IQ	: <i>Intelligence quotient</i>
İAS	: İnteratriyal septum
İVS	: İnterventriküler septum
JMML	: Jüvenil myelomonositik lösemi
KFKS	: Kardiyofasiyokütanöz sendrom
KKH	: Konjenital kalp hastalığı
KM-AVM	:Kapiller malformasyon-arteriyovenöz malformasyon sendromu
LP	: Muhtemel patojenik
LVOTO	: Sol ventrikül çıkım darlığı
LZTR1	: Lösün fermuar benzeri transkripsiyonel regülatör 1

MAF	: Minör allel frekansı
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
ml	: Mililitre
MLNS	: Multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromu
mm	: Milimetre
MPSKT	: Malign periferik sinir kılıfı tümörü
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MVP	: Mitral kapak prolapsusu
MY	: Mitral yetmezlik
NF1	: Nörofibromatozis tip 1
ng	: Nanogram
NGS	: Yeni nesil dizileme
NIH	: <i>National Institutes of Health</i>
nM	: Nanomolar
NS	: Noonan sendromu
NSVSF	: Normal sol ventrikül sistolik fonksiyonu
NT	: Nukal translusensi
OSB	: Otizm spektrum bozukluğu
P	: Patojenik
p	: Persantil
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patent duktus arteriyosus
PFO	: Patent foramen ovale

pM	: Pikomolar
PP1	: Protein fosfataz 1
PS	: Pulmoner kapak stenozu
PTP	: Fosfotirozin fosfataz
PTPN11	: Protein-tirozin fosfataz, nonreseptör-tip, 11
PY	: Pulmoner yetmezlik
RAS	: Rat sarkom
RBD	: RAS bağlanma domaini
RNA	: Ribonükleik asit
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SDS	: Standart deviasyon skoru
SH2	: Src homoloji 2
SHP2	: SH2 domain içeren tirozin fosfataz-2
SOS	: <i>Son of sevenless</i>
TOF	: Fallot tetralojisi
TY	: Triküspit yetmezliği
USG	: Ultrasonografi
VCF	: <i>Variant Calling Format</i>
VSD	: Ventriküler septal defekt
VUS	: Klinik önemi bilinmeyen
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. RAS/MAPK yolağı ve ilişkili sendromlara yol açan genler.....	4
Şekil 2.2. Olgu 7'ye ait kutanöz ve pleksiform nörofibrom görüntüleri.....	12
Şekil 2.3. Café-au-lait makülleri	13
Şekil 2.4. Olgu 14'e ait Crowe bulgusu pozitifliği	13
Şekil 2.5. NF1 klinik bulgularının döneysel olarak ortaya çıkışı.....	16
Şekil 2.6. RAS/MAPK sinyal kaskadı ve küçük molekül inhibisyonu.....	31
Şekil 2.7. Yeni nesil dizileme yöntemindeki ıslak laboratuvar adımları.	34
Şekil 3.1. Değişik uzunluktaki fragmentlerin lokalizasyonuna göre yerleşimi... 40	
Şekil 3.2. <i>QIAseq Library Quant Assay</i> Kit düzeni	47
Şekil 3.3. <i>MiSeq</i> cihazındaki <i>Illumina Experiment Manager</i> yazılımında iş akış parametreleri	48
Şekil 3.4. Olgu 53'ün <i>Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret</i> yazılımındaki varyant listesi	50
Şekil 4.1. 61 olgunun cinsiyete göre dağılımı.....	51
Şekil 4.2. Pozitif aile bireyleri dahil edildiğinde olguların cinsiyete göre dağılımı	51
Şekil 4.3. Olgu 1'in kızının Sanger dizileme sonucunun <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> görüntüsü.....	53
Şekil 4.4. Olgu 1'in oğlunun Sanger dizileme sonucunun <i>IGV</i> görüntüsü	54
Şekil 4.5. Olgu 8'in BAM formatında <i>forward</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>NF1</i>)	58
Şekil 4.6. Olgu 9'un BAM formatında <i>forward</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>NF1</i>)	58
Şekil 4.7. NF1 ve NF-Noonan sendromu tanıli olgularda NIH tanı kriterleri pozitifliğine göre olguların durumu	77
Şekil 4.8. NF1 ve NF-Noonan sendromu tanıli olgulardaki destekleyici klinik bulgular	77
Şekil 4.9. NF1 ve NF-Noonan sendromu olgularında aile öyküsü oranı	78
Şekil 4.10. Olgu 43'ün BAM formatında <i>reverse</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>RAF1</i>)	79

Şekil 4.11. Olgu 44'ün BAM formatında <i>reverse</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>KRAS</i>)	80
Şekil 4.12. Olgu 45'in BAM formatında <i>forward</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>PTPN11</i>)	81
Şekil 4.13. Olgu 46'nın BAM formatında <i>forward</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>PTPN11</i>)	82
Şekil 4.14. Olgu 48'in BAM formatında <i>reverse</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>SOS1</i>)	84
Şekil 4.15. Periferik kandan çalışılan karyotip analizi	86
Şekil 4.16. Olgu 50'nin BAM formatında <i>reverse</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>NRAS</i>)	86
Şekil 4.17. Olgu 52'nin BAM formatında <i>reverse</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>SOS1</i>)	88
Şekil 4.18. Olgu 53'ün BAM formatında <i>reverse</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>RAF1</i>)	89
Şekil 4.19. Olgu 55'in BAM formatında <i>forward</i> dizi NGS analiz görüntüsü (<i>PTPN11</i>)	91
Şekil 4.20. Olguların varyant saptanan genlere göre dağılımı	94
Şekil 4.21. Olgularda saptanan varyantların patojenitesine göre dağılımı.....	94
Şekil 4.22. <i>NF1</i> geninde saptanan varyantların lokalizasyonlarına göre dağılımı	95
Şekil 4.23. <i>PTPN11</i> geninde saptanan varyantların lokalizasyonlarına göre dağılımı	95
Şekil 4.24. <i>NF1</i> geninde saptanan varyantların mutasyon tipine göre sınıflandırılması	96
Şekil 4.25. Novel ve literatürde daha önce bildirilmiş varyantların genlere göre dağılımı	97
Şekil 4.26. <i>NF1</i> geninde saptanan varyantlar için <i>de novo-inherited</i> dağılımı ...	97

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. RAS/MAPK yolağında yer alan genler	6
Tablo 2.2. NIH Konsensüs Geliştirme Konferansı tarafından belirlenen NF1 tanı kriterleri	17
Tablo 2.3. Noonan sendromu tanı kriterleri.....	21
Tablo 2.4. Klinik Araştırmalar için RAS/MAPK Küçük Moleküllerinin Mevcut Durumu	32
Tablo 3.1. Fragmentasyon, uç onarım (<i>end-repair</i>) ve A-ekleme (<i>A-addition</i>) için reaksiyon miksi	39
Tablo 3.2. Fragmentasyon, uç onarım (<i>end-repair</i>) ve A-ekleme (<i>A-addition</i>) için PCR koşulları.....	39
Tablo 3.3. Adaptör ligasyonu için reaksiyon karışımı.....	41
Tablo 3.4. DNA ligasyonu için inkübasyon koşulları	41
Tablo 3.5. Hedef zenginleştirme için reaksiyon karışımı	42
Tablo 3.6. Hedef zenginleştirme için PCR protokolü.....	43
Tablo 3.7. Evrensel PCR için reaksiyon bileşenleri	44
Tablo 3.8. Evrensel PCR için siklus koşulları	45
Tablo 3.9. ILMN standardının seyreltilmesi.....	46
Tablo 3.10. Kütüphane örneklerinin dilüsyonu	46
Tablo 3.11. PCR karışımının hazırlanması	47
Tablo 3.12. Real time PCR döngüsü.....	47
Tablo 4.1. Olguların yaş ortalaması.....	52
Tablo 4.2. NF1 ve NF-Noonan sendromu olgularının klinik bulgularının özeti	73
Tablo 4.3. Olguların mutasyon tipine göre dağılımı.....	96
Tablo 5.1. NF1 bulgu sıklıklarının literatürle karşılaştırılması	112

1. GİRİŞ

RASopati, RAS-mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağındaki komponentlerde veya yolak düzenleyicilerindeki *germline* mutasyonlar sonucu ortaya çıkan klinik spektrumu ifade eder (1, 2). Bu grup hastalıkların içine nörofibromatozis tip 1 (NF1), Noonan sendromu, multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromu (MLNS) (eski adıyla LEOPARD), gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk (GSNS), Costello sendromu, Legius sendromu, kardiyofasiyokütanöz sendrom (KFKS), kapiller malformasyon-arteriyovenöz malformasyon sendromu, jüvenil myelomonositik lösemi (JMML) ve otozomal dominant kalıtmımlı entelektüel yetersizlik tip 5 girer (1-3). Bu bozuklukların hepsinin kendine has kliniğı olmakla birlikte altta yatan genetik patoloji (RAS/MAPK yolağındaki aktivasyon sonucu) düşünöldüğünde bazı ortak bulgular söz konusudur. Bunlar; kardiyak anomaliler, büyümede azalma, cilt ve kas-iskelet sistemi bulguları, çeşitli homeostatik defektler, görme problemleri, yüz özellikleri, bilişsel yetersizlik ve sekonder malignensilere yatkınlık olarak sıralanabilir (2-4).

Genel olarak, RASopati sendromları, yaklaşık 1000 canlı doğumdan 1'ini etkileyen en büyük konjenital malformasyon sendrom gruplarından biridir (1, 3). Tek tek bakıldığında bu sendromların içinde en sık görölenler Noonan sendromu ve nörofibromatozis tip 1'dir. Noonan sendromunun görölme sıklığı 1000-2500 canlı doğumda 1 olarak değeriendirilirken nörofibromatozis tip 1 sıklığı 3000 doğumda 1'dir (5, 6). RASopati grubu hastalıklarda kadın ve erkek oranı açısından ya da etnik köken açısından farklılık gösterilmemiştir (7). RASopati tanısı, yüksek oranda ilgili genlerde dizi analizi yöntemiyle patojenik bir varyant saptanması ile konur. Bu amaçla dizayn edilmiş yeni nesil dizileme panelleri kullanılmaktadır.

RAS/MAPK yolağını hedef alan birçok tedavi, yakın zamanda kanser yönetimi için onkolojide inhibitörler olarak geliştirilmiştir (3, 8). RASopati sendromları için de tedavi denemeleri yapılmış, spesifik tedavi çalışmaları devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında, hedeflenmiş yeni nesil dizi analizi sonuçlarıyla RASopati tanısı almış olguların retrospektif olarak araştırılıp demografik verilerin literatürle karşılaştırılması, sonuçların genotip-fenotip korelasyonu ile yorumlanması ve bu amaçla olası sıcak bölge mutasyonları ile genotipin klinik bulgulara etkisinin değeriendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RAS proteinleri

RAS (H-, K-, N-izotipleri) (guanin nükleotid bağlayıcı protein) proteinleri, hücre sinyalinde önemli rol oynayan heterotrimerik G proteinlerinin G α alt birimiyle yapı olarak ilişkili tek bir GTPaz molekülüdür (8, 9). Sinyal aktarımı sırasında hücrenin fonksiyonuna bağlı olarak açılıp kapanabilen proteinlerdir. Bunu sağlamak için aktif halde GTP (guanozin trifosfat)-bağlı ve inaktif durumda GDP (guanozin difosfat)-bağlı olarak bulunur (9, 10). Stabil, inaktif GDP-bağlı formdan aktif GTP-bağlı forma geçiş guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF)'ler ile sağlanır (10). RAS proteinleri, hücre polaritesi, proliferasyon, diferansiyasyon, adezyon, migrasyon ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerde yer alan hücre içi sinyal yollarını kontrol eden ikili (*binary*) moleküler anahtarlar olarak işlev görür. RAS ve RAS ile ilgili proteinler, tüm insan kanserlerinin yaklaşık üçte birinde disregüle olmaktadır (11). Ayrıca bu proteinler normalde sıkı kontrol altında iken RASopati grubu bozukluklarda RAS genlerindeki ve düzenleyicilerindeki mutasyonlar, RAS proteinlerini aktif tutar (10).

RAS, sinyalleri aşağı doğru ileten ve birkaç hücresel mekanizmanın kontrolünde yer alan genlerin transkripsiyonuyla sonuçlanan RAF-MEK-ERK/MAPK kaskadı dahil olmak üzere birçok yolağı aktive eder (11). RAS ailesi üyeleri, plazma membranının sitoplazmik tarafına sabitlenmiş olarak bulunur. Böylece sitozolde RAS'a bağlı nükleotid-GDP'nin GTP'ye dönüşümünü azaltmak için RAS adaptörlere, büyüme faktörü reseptörü bağlayıcı protein 2'ye (GRB2) ve nükleotid değişim faktörü SOS'a yakın bir yere yerleşmiş olur (12). Buna göre RAS, hücre dışı sinyalleri nükleusa iletir.

Değişen aktivasyon sonucunda, aşırı hücre büyümesi, diferansiyasyon ve uzun ömür gibi uygun olmayan hücresel aktivitelere ve nihayetinde kansere yol açar (13). Ayrıca benzer şekilde RASopati grubu hastalıklar gözlenir.

2.2. RAS/MAPK yolağı ve patolojileri

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) RAS-RAF-MEK-ERK1/2 (ekstraselüler sinyal ile regüle olan kinaz 1 ve 2)'den oluşan farklı sinyal kaskatlarını kapsar. Bu yolak, hücre proliferasyonu, büyüme, yaşlanmayı içeren normal gelişim için kritik birçok hücre fonksiyonunu düzenler (11, 14). RAS-RAF-MEK-ERK yolağı, reseptör tirozin kinaz (RTK) sinyalleri yoluyla ve esas olarak RAS ve RAF genlerindeki

mutasyonları aktive ederek bilinen birkaç büyüme faktörü ve sitokin tarafından aktive edilir (11).

Klinik açıdan en anlamlı RAS yolağı RAS-RAF-MEK-ERK ve PI3K-Akt'i içerir (8). RAS-RAF-MEK-ERK sinyal yolağı, hücre proliferasyonu, diferansiyasyon ve apoptozu içeren farklı hücresel mekanizmalar için hayati önem taşır (1). Bu önem özellikle kanserde veya konjenital gelişim bozukluklarıyla giden bazı durumlarda görülen RAS veya bu yolaktaki diğer proteinlerin mutasyonlarıyla daha belirgin hale gelir (1). Bunun dışında RAS ilişkili lenfoproliferatif hastalıklar ve histiyositozun yakın zamanda bu yolaktaki mutasyonlarla ilişkisi gösterilmiştir (1). Ayrıca RAS aktivitesindeki anormallik otizm ve diğer nörolojik hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur (10).

RAS mutasyonlarının aktivasyonu, insan kanserlerinin % 30'una kadarında görülür (8).

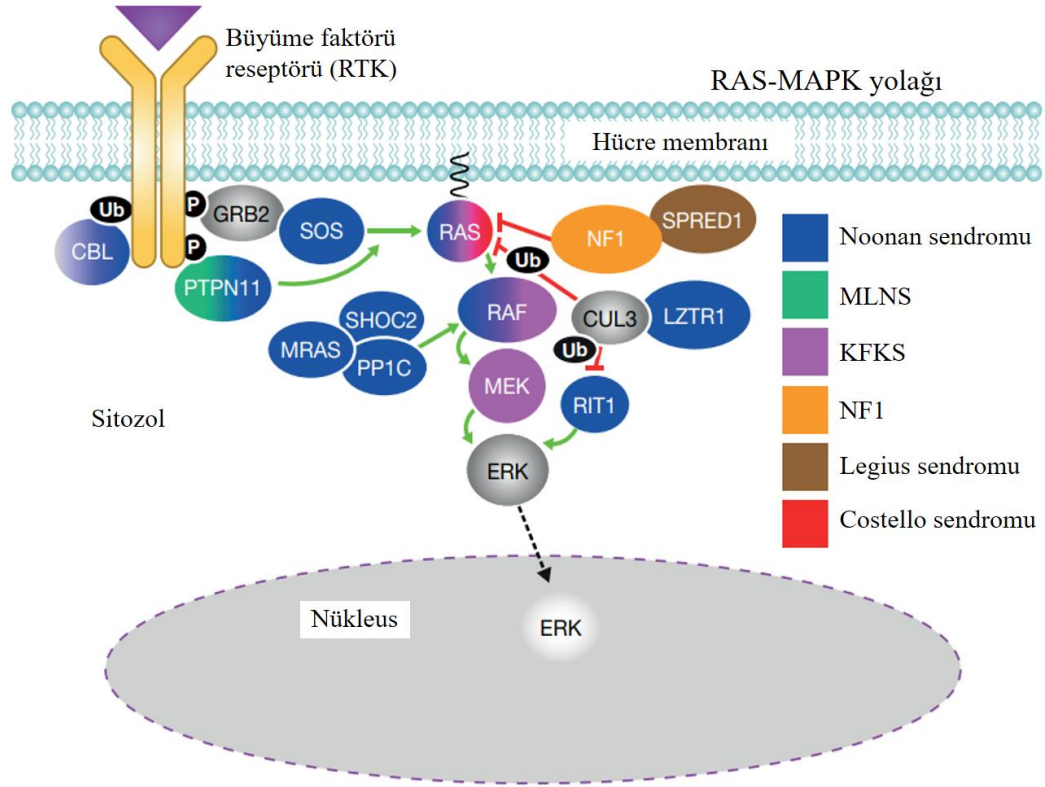
RTK yoluyla aktivasyon, RTK otofosforilasyonuna neden olan bir büyüme faktörünün bağlanması ve adaptör protein GRB2 ile etkileşime girmesiyle gerçekleşir. GRB2, daha sonra plazma membranına alınan SOS'a bağlanır. SOS proteinleri, GTP için GDP'nin RAS nükleotid değişim oranını artıran ve aktif GTP'ye bağlı formda RAS'ın artmasına neden olan guanozin nükleotid değişim faktörleridir (GEF). RAF aracılı MAPK yolu, RAS'ın birkaç önemli aşağı akış (*downstream*) kaskadından biridir. Aktive RAS, yolun ilk MAPK kinaz kinazı olan RAF'ın (ARAF, BRAF ve/veya CRAF) aktivasyonuna yol açar. RAF, MEK1 ve/veya MEK2'yi (MAPK kinazı) fosforile eder ve aktive eder, bu da ERK1 ve/veya ERK2'yi fosforile eder ve aktive eder. ERK1/2 nihai efektörlerdir ve işlevlerini hem nükleer hem de sitozolik olmak üzere çok sayıda *downstream* molekülünde uygularlar. ERK1/2 substratları nükleer bileşenleri, transkripsiyon faktörlerini, membran proteinlerini ve sırayla hücre döngüsü ilerlemesi, farklılaşma ve hücre büyümenin kontrolü dahil olmak üzere hayati hücresel fonksiyonları kontrol eden protein kinazları içerir (Şekil 2.1) (14, 15).

2.3. RASopatiler

2.3.1. Tanımı

RASopati grubu hastalıklar, diğer ismiyle nöro-kardiyo-fasiyo-kutanöz sendrom olarak adlandırılan bir klinik spektrumu ifade eder (1, 2). RAS/MAPK yolağındaki komponentlerde veya yolak düzenleyicilerindeki çeşitli *germline* mutasyonlar sonucu

ortaya çıkan, zamanla etiyojileri netleştikçe genişlemeye devam eden bir karmaşık fenotip grubudur (16). Ayrıca bu yolda meydana gelen somatik mutasyonlar kanser etiopatogenezinde önemli bir yer tutmaktadır.



Şekil 2.1. RAS/MAPK yolağı ve ilişkili sendromlara yol açan genler. Yolağın bazı bileşenleri birkaç izoform şeklinde bulunmaktadır (Örneğin; RAS: KRAS, HRAS, NRAS, RRAS; RAF: RAF1, BRAF; SOS: SOS1, SOS2) (17). KFKS: kardiyofasiyokütanöz sendrom, MAPK: mitojen ile aktive olan protein kinaz; MLNS: multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromu, NF1: nörofibromatozis tip 1, P: prolin; RTK: reseptör tirozin kinaz enzimi; Ub, ubiquitin.

2.3.2. Epidemiyoloji

RASopati grubu hastalıklar, genel olarak değerlendirildiğinde yaklaşık 1000 bireyde bir kişiyi etkilemektedir. Bu açıdan en sık bilinen malformasyon sendromlarından biridir (3, 16). Bu grubu oluşturan hastalıklara tek tek bakmak gerekirse Nörofibromatozis tip 1 sıklığı 3000 doğumda 1 olarak belirtilirken Noonan sendromunun

görülme sıklığı ise 1000-2500 canlı doğumda 1'dir (5, 6). RASopati grubu hastalıklar genel olarak kadın ve erkek oranı açısından ya da etnik köken açısından farklılık göstermemektedir.

2.3.3. Etiyolojisi

Bu grup hastalıkların içine Nörofibromatozis tip 1 (NF1), Noonan sendromu (NS), multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromu (MLNS) (eski adıyla LEOPARD), gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk (GSNS), Costello sendromu (CS), Legius sendromu, kardiyofasiyokütanöz sendrom (KFKS), kapiller malformasyon-arteriyovenöz malformasyon sendromu (KM-AVM) ve otozomal dominant kalıtmı entelektüel yetersizlik tip 5 girer (3). Bunların içinde en sık görülenler Noonan sendromu ve nörofibromatozis tip 1'dir.

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), RAS/MAPK yolağındaki bir genin (*NF1*) mutasyonundan kaynaklandığı tanımlanan ilk sendromdur (18-20). NF1 olgularının % 95'ten fazlası dizi analizi ile tanı almaktadır (21-23). NF1 tanılı olguların yaklaşık % 5-11'inde tüm gen delesyonları gözlenmektedir. Yaklaşık % 10-13 olgu gen hedefli delesyon/duplikasyon analizi ile tanı almaktadır (24). % 1'den daha az olguda karyotip analizi tanı koydurucu olmaktadır.

NF1 sonrasında RAS/MAPK yolağı ilişkili çok sayıda başka sendrom tanımlanmıştır. *PTPN11* (25), *SOS1* (26, 27), *RAF1* (28, 29), *KRAS* (30), *NRAS* (31), *SHOC2* (32) ve *CBL* (33, 34) genlerindeki aktive edici mutasyonların neden olduğu Noonan sendromu (NS) bunlar arasındadır (Tablo 2.1). En sık mutasyonu gözlenen gen olan *PTPN11*, Noonan sendromu olgularının yaklaşık % 50'sinden sorumlu tutulmaktadır (35). Noonan sendromu klinik tanısı olan ve tanımlanmış bir *PTPN11* patojenik varyantı olmayan olguların yaklaşık % 16-20'sinin *SOS1* geninde bir patojenik varyanta sahip olduğu saptanmıştır ve bu grup, Noonan sendromlu olguların % 10-13'ünü oluşturmaktadır (26, 27). Diğer ilişkili genlerin Noonan sendromu etiyojisindeki sıklıkları sırasıyla *LZTR1* için % 8 (36), *RAF1* için % 5 (37), *RIT1* için % 5 (37), *KRAS* için % 5'ten az (30, 38), *SOS2* için yaklaşık % 4 (36), *BRAF* için % 2'den az (39), *MAP2K1* için % 2'den az (40), % 1'den daha az olarak *MRAS* (41), *NRAS* için %1'in altında (42), *RRAS2* için %1'den az (43) olarak değerlendirilmektedir.

Tablo 2.1. RAS/MAPK yolağında yer alan genler

Gen	Protein	Kromozomal Lokusu	Ekzon sayısı	OMIM#	RASopati İlişkili Klinik (genomik) (OMIM)
<i>BRAF</i>	V-RAF Mürin Sarkom Viral Onkogen Homolog B1	7q34	24	164757	KFKS, LEOPARD sendromu tip 3, Noonan sendromu tip 7
<i>CBL</i>	CAS-BR-M Mürin Ekotropik Retroviral Transforme Edici Dizi	11q23.3	16	165360	JMML eşlik edebildiği Noonan sendromu benzeri bozukluk
<i>HRAS</i>	V-HA-RAS Harvey Rat Sarkomu Viral Onkogen Homolog	11p15.5	7	190020	Costello sendromu
<i>KRAS</i>	V-KI-RAS2 Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog	12p12.1	7	190070	KFKS 2, Noonan sendromu tip 3, RAS-ilişkili otoimmün lökoproliferatif bozukluk
<i>LZTR1</i>	Lösün Fermuar Benzeri Transkripsiyonel Regülatör 1	22q11.21	21	600574	Noonan sendromu tip 2, Noonan sendromu tip 10
<i>MAP2K1 (MEK1)</i>	Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz 1	15q22.31	12	176872	KFKS 3
<i>MAP2K2 (MEK2)</i>	Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz 2	19p13.3	12	601263	KFKS 4
<i>MRAS</i>	RAS Viral Onkogen Homolog 3	3q22.3	10	608435	Noonan sendromu tip 11
<i>NF1</i>	Nörofibromin	17q11.2	58	613113	Nörofibromatozis tip 1
<i>NRAS</i>	Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog	1p13.2	7	164790	Noonan sendromu tip 6
<i>PPP1CB</i>	Protein Fosfataz 1-Beta	2p23.2	9	600590	Gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk tip 2
<i>PTPN11</i>	Protein-Tirozin Fosfataz 2C	12q24.13	16	176876	Noonan sendromu tip 1, MLNS tip 1

<i>RAF1</i>	V-RAF-1 Mürin Lösemi Viral Onkogen Homolog 1	3p25.2	23	164760	Noonan sendromu tip 5, MLNS tip 2
<i>RRAS</i>	<i>Related RAS</i> Viral Onkogen Homolog	19q13.33	6	165090	RASopati ilişkili lökogenenezis
<i>RIT1</i>	CAAX Motifsiz RIC- benzeri Protein 1	1q22	7	609591	Noonan sendromu tip 8
<i>SHOC2</i>	SHOC2 Lösün Zengin Tekrar <i>Scaffold</i> Proteini	10q25.2	11	602775	Gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk tip 1
<i>SOS1</i>	Son of Sevenless Drosophila Homolog 1	2p22.1	26	182530	Noonan sendromu tip 4
<i>SOS2</i>	Son of Sevenless Drosophila Homolog 2	14q21.3	28	601247	Noonan sendromu tip 9
<i>SPRED1</i>	Sprouty-ilişkili EVH1 Domain İçeren Protein 1	15q14	10	609291	Legius sendromu

LZTR1 genindeki homozigot veya heterozigot patojenik varyantlar Noonan sendromuyla ilişkilendirilmekle beraber diğer Noonan sendromu ilişkili genler için kalıtım paterninin otozomal dominant olduğu dolayısıyla heterozigot varyantların hastalık yaptığı bilinmektedir.

Multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromunda (MLNS) ise en sık sebep % 90 sıklıkla *PTPN11* geninde oluşan heterozigot yanlış anlamlı mutasyonlardır ve literatürdeki patojenik varyantların çoğu 7 ve 12. ekzonlarda tanımlanmıştır (44, 45). İkinci olarak % 5'in altında sıklıkla *RAF1* genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanır. Bu varyantların tamamı 6, 13 ve 16. ekzonlarda saptanmıştır (29). MLNS kliniğine sahip 2 olguda *BRAF* geninde patojenik yanlış anlamlı varyantlar saptanmıştır (39, 46). 1 olgu ise MLNS kliniği ile değerlendirilmiş olup *MAP2K1* geni dizi analizinde patojenik yanlış anlamlı bir varyant saptanmıştır (47). Bunların dışında muhtemelen RAS sinyal iletimi ile ilgili, henüz tanımlanmamış bir veya daha fazla başka genin, *PTPN11*, *RAF1* veya *BRAF* geninde hiçbir patojenik varyant tanımlanmamış MLNS tanılı olguların yaklaşık % 5'i ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Kardiyofasiyokütanöz sendromda (KFKS) ise yaklaşık % 75 olguda *BRAF*, % 25 olguda *MAP2K1* ve *MAP2K2* dizi analizinde saptanan patojenik varyantlar sorumludur (3). Sadece 1 olguda *BRAF* genindeki delesyon kaynaklı KFKS benzeri klinik raporlanmıştır (48). % 2-3'ten daha az olguda *KRAS* geni dizi analizi tanı koydurucu olmaktadır. Bunun dışında henüz tanımlanamayan genlerdeki patojenik varyantların KFKS'ye neden olup olmadığı şu anda belirsizdir.

Costello sendromunda (CS) ise *HRAS* geni dizi analizi olguların neredeyse tamamında tanı koydurucudur. Olguların % 95'ten fazlasında Costello sendromuna neden olan patojenik varyantlar p.Gly12 veya p.Gly13 aminoasitlerini etkilemektedir (49-54). Costello sendromu *HRAS* genindeki aktive edici mutasyonlardan kaynaklandığı için gen hedefli delesyon/duplikasyon analizinin tanıda yeri olması beklenmemektedir.

Gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk (GSNS) ile ilgili şimdiye kadar tanımlanmış 2 gen mevcuttur (55). GSNS tip 1 diğer ismiyle Mazzanti sendromu ya da Tosti sendromu, *SHOC2* geninde saptanan heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanmakta olup GSNS tip 2, *PPP1CB* genindeki patojenik varyantlar nedeniyle oluşmaktadır (56).

Legius sendromunda olguların tamamında *SPRED1* geninde patojenik varyant saptanmıştır. NF1 şüpheli klinik ön tanısı mevcut ancak tanımlanabilir bir *NF1* patojenik varyantı saptanmamış olguların yaklaşık % 10'unda *SPRED1* geninde mutasyon saptanmıştır (57, 58).

Jüvenil myelomonositik lösemninin *PTPN11*, *CBL*, *NF1*, *KRAS* ve *NRAS* genlerindeki *germline* veya somatik mutasyonlar sonucu, kapiller malformasyon-arteriyovenöz malformasyon sendromunun *RASA1* genindeki haployetmezlik sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir (2, 3).

2.3.4. Patogenezi

RAS/MAPK yolak aktivasyonu, reseptör tirozin kinazlara (RTK) ligand bağlanması, reseptör dimerizasyonu ve tirozin kalıntıları üzerinde otofosforilasyon ile başlatılır. Fosfotirozin kalıntıları, GRB2 ve onun hücre membranı iç kısmı proksimal bölgesine birlikte bağlanan SOS'u alır. SOS, aktif RAS-GTP kompleksini oluşturan, RAS ile birlikte bağlı GDP'nin GTP'ye dönüşümünü destekleyen bir RAS-guanin nükleotid

değişim faktörüdür (RAS-GEF). NS ile ilişkili *SOS* mutasyonları, molekül içi otoinhibitör etkileşimlerini bozarak RAS ile birlikte olan GDP-GTP dönüşümünü uyarır. NS, KFKS ve CS'deki RAS mutasyonları, guanin nükleotid bağlanmasını ve/veya intrinsik GAP (GTPaz aktive edici protein) aktivitesini azaltarak RAS aktivitesini etkiler. NS ile ilişkili bazı RAS mutasyonları, allosterik *SOS* otoaktivasyonunu ve dolayısıyla RAS aktivasyonunu artıracak şekilde *SOS*'a bağlanabilir (59).

Ek olarak RAS düzenleyici proteinler SHP2, p120GAP, NF1 ve LZTR1'in RASopati grubu hastalıklarda mutasyona uğradığı bilinmektedir. SHP2, SH2 ve fosfotirozin fosfataz (PTP) domainleri arasındaki molekül içi otoinhibitör etkileşimi bozan bölgelerde kümelenmiş mutasyonlar ile inaktif formu destabilize ederek ve SHP2 PTP aktivitesinin artmasına izin vererek NS ve MLNS'de mutasyona uğramaktadır.

Aktif SHP2, RAS inhibitörü p120GAP'nin (*RASA1* geninin protein ürünü) bağlanmasını azaltarak ve MAPK yolağının downstream mediatörü olan RAF'ın bağlanmasını artırarak RAS-GTP ile otoinhibitör fosfotirozinleri defosforile eder (60, 61). p120GAP ve başka bir RAS-GAP olan *NF1*'in nonfonksiyonel mutasyonları, azalmış ekstrinsik RAS-GAP aktivitesi ve artmış RAS-MAPK yolu aktivitesi nedeniyle sırasıyla KM-AVM ve NF1 ile ilişkilidir. Lösin fermuar benzeri transkripsiyonel regülatör 1 (LZTR1), son zamanlarda RAS proteinlerinin ubiquitinasyon ve degradasyonunu kolaylaştırdığı gösterilen E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşenidir. *LZTR1*'in heterozigot mutasyona uğramış formları, artmış RAS protein seviyeleri ile ilişkili görünmektedir (62). Böylece muhtemelen azalmış olan ubiquitin proteazomal degradasyonu nedeniyle RAS-MAPK sinyalini artırır. *LZTR1*'in homozigot mutant formlarının RAS/MAPK sinyalini nasıl artırabileceğine ilişkin mekanizma belirsizdir, ancak LZTR1 ile RASopatilerde (RAF1, SHOC2, PP1) yer alan diğer proteinler arasındaki etkileşimin, kompleks içindeki bazı mutasyonlar tarafından azaltılan inhibitör RAF1 Ser259 fosforilasyonunu desteklediği rapor edilmiştir (63).

RAF1'in RAS bağlanma domainine (RBD), aktive edilmiş RAS bağlanmasıyla, RAF hücre zarına alınır ve bu durum konformasyonel bir değişikliği tetikler, RAF1'in Ser259'unun protein fosfataz 1 (PP1) tarafından defosforilasyonunu ve intrinsik kinaz domaininin otoinhibisyonunu azaltarak RAF1 içindeki multipl bölgelerin fosforilasyonunu tetikler. PP1'in katalitik alt birimini kodlayan *PPP1CB*'nin yanlış

anlamli mutasyonlari, nadir gorulen NS varyantina benzer fenotipik ozelliklere sahip hastalarda, gevsek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu benzeri bozukluk (GSNS) bildirilmistir (55). Şu anda, bu mutasyonlari fonksiyonel etkileri net olarak belirlenmemiştir.

RAF1 Ser259 veya yakin lokalizasyondaki amino asitlerin mutasyonu, NS ve MLNS'de aktive edici *RAF1* mutasyonlariinin buyuk bir grubunu oluşturur, burada muhtemelen 14-3-3 proteinine bağlanmanın azalması nedeniyle *RAF1*'in otoinhibisyonu oluşur ve bunun sonucunda inaktif *RAF1*'in konformasyonel stabilizasyonu azalır (64-66).

NS'de mutasyona uğrayan *SHOC2*, multipl losin bakımından zengin tekrarlar iēerir ve RAS-GTP'yi *RAF*'a bağlayan bir *scaffold* proteindir ve ayrıca *RAF1*'deki reguлятор serin rezidüsünü defosforile eden *PP1C*'nin duzenleyici bir alt birimi olarak goev yapar. *SHOC2*'deki bir p.S2G mutasyonunun, *SHOC2*'nin miristoilasyonunu desteklediği ve *SHOC2*'nin hucre membranında kalıcı lokalizasyonuna neden olduğu ve burada *RAF1*'in fosforilasyonunu ve aktivasyonunu yapısal olarak ve daha kolay destekleyebildiği duşunılmektedir (32).

RAF'in hucre membranında kümelmesi, *RAF* transfosforilasyonunu teşvik eder (67). İlginē bir Şekilde, bazı NS, KFKS ve MLNS vakalarında, *BRAF* ve *RAF1*'in bozulmuş kinaz versiyonlari tanımlanmıştır. Kinaz aktivitesinin bozulmasının RAS-MAPK yolağının sinyalleşmesini azaltacağı varsayımının aksine, bozulmuş kinaz mutasyonlariinin *BRAF/RAF1* izoform homo- ve heterodimerizasyonunu desteklediği, kinaz transaktivasyonunu artırdığı ve dolayısıyla RAS-MAPK yolağının aktivasyonunu arttırdığı gürılmektedir (68). İlginē bir Şekilde, somatik tümörijenik *BRAF* mutasyonlariinin buyuk çoğunluğu kinaz domaininde meydana gelir.

Aktive edilmiş *RAF1/BRAF*, *MEK1/MEK2*'yi ēalıřtırır ve proteinleri iki serin rezidüsünden (Ser 218 ve Ser 222) fosforile eder. KFKS ile ilişkili olarak *MEK1* ve *MEK2* genlerindeki yanlış anlamli mutasyonlar araştırılmış ve kinaz aktivitesini aktive ettiği gürsterilmiştir (69, 70). Aktive edilmiş *MEK1/MEK2*, sonuēta hucre proliferasyonunu, buyümesini ve diferansiyasyonunu duzenleyen transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar gibi çok ēeřitli efektör proteinleri fosforile eden *ERK1/ERK2*'yi fosforile eder ve aktive eder.

Aktive RAS-GTP, src (src kinaz ailesi, bir nonreseptör tirozin kinaz ailesidir) tarafından tirozin kalıntıları üzerinde spesifik olarak fosforile edilir ve inaktive edilir. Bu fosforilasyon, BRAF/RAF1 bağlanmasını inhibe eder ve bir GAP proteininin (p120-GAP veya muhtemelen NF1) bağlanmasını kolaylaştırır (60). RAS Tyr64 fosforilasyonu, GEF aktivitesinin ilişkisini azaltır (71). SHP2, RAS tirozin rezidülerini defosforile ederek RAS-GTP'yi aktif duruma geri döndürebilir (16).

SPRED1 EVH1 domaininin mutasyonu, RAF1'in RAS aracılı aktivasyonunun *SPRED1* inhibisyonunu ortadan kaldırır (72). Bu mutasyonlar genelde trunkasyonlar ve fonksiyon kaybı tipindedir. *SPRED1*, normal olarak NF1'e bağlanarak, onu RAS'ın yakınında hücre membranına alarak işlev görebilir (73). Yapılan bir çalışmada Legius sendromuna neden olan EVH1 domainindeki *SPRED1* yanlış anlamlı mutasyonlarının NF1'e bağlanmayı azalttığını, böylece membranda daha az NF1 topladığı ve RAS'a karşı GAP aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (74).

2.3.5. Klinik özellikler

RASopati grubu hastalıkların hepsinin kendine has kliniği olmakla birlikte altta yatan genetik patoloji (RAS/MAPK yolağındaki aktivasyon sonucu) düşünüldüğünde bazı ortak bulgular söz konusudur. Bunlar; kardiyak anomaliler, büyümede azalma, cilt ve kas-iskelet sistemi bulguları, çeşitli homeostatik defektler, görme problemleri, yüz özellikleri, bilişsel yetersizlik ve sekonder malignansilere yatkınlık olarak sıralanabilir (2-4).

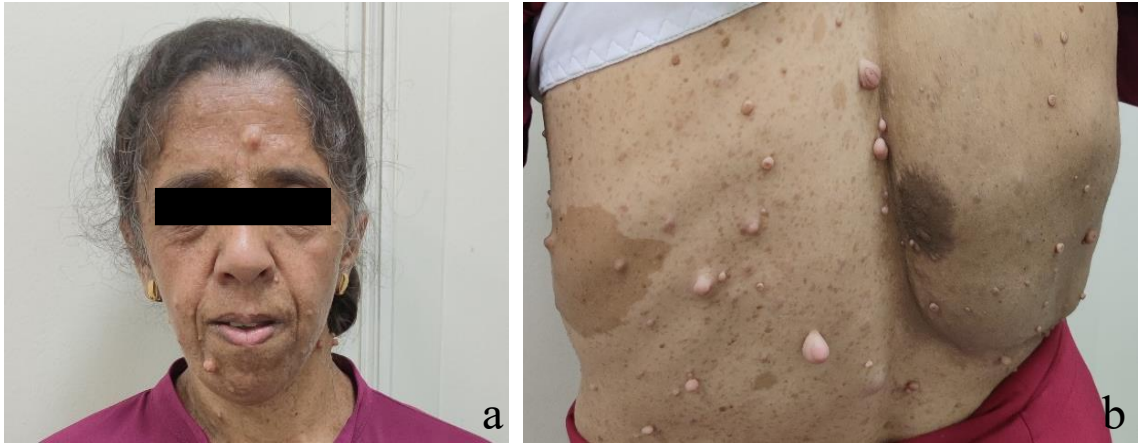
2.3.5.1. Nörofibromatozis Tip 1

Nörofibromatozis tip 1 (NF1) diğer adıyla von Recklinghausen hastalığı, otozomal dominant kalıtım paternine sahip, birçok sistemi etkileyebilen bir durumdur (75). En sık gözlenen RASopati tiplerinden olmakla beraber sıklığı farklı ülkelerde değişkenlik göstermektedir (76). Bu farklılık kurucu mutasyon etkisinden kaynaklanabileceği gibi ileri baba yaşı, etnisite gibi *de novo* mutasyon oranını etkileyen faktörlerden de kaynaklanabilmektedir (75).

NF1, primer olarak merkezi ve periferik sinir sistemini etkilemekle birlikte multisistem tutulumu olan bir hastalıktır, dermatolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal ve iskelet sisteminde de tutulum gözlenir (77).

Nörofibromatozis tip 1'in tanımlayıcı özelliği, spinal, periferik veya kraniyal sinirlerle yakın ilişki içinde oluşan nörofibromdur (75). Nörofibromlar, vücuttaki hemen her siniri etkileyebilen, NF1'de en sık olarak görülen iyi huylu Schwann hücreli tümörlerdir (78). Kutanöz nörofibromlar, genellikle 1-2 milimetre (mm) ile birkaç santimetre (cm) arasında değişen, ayırık, iyi sınırlı kitlelerdir. Çoğu asemptomatiktir, ancak kaşınabilir veya dokunmaya duyarlı olabilirler. Kutanöz nörofibromlar çocuklarda nadirdir, ancak hemen hemen NF1'li tüm yetişkinlerde bulunur (Şekil 2.2). Subkutan nörofibromlar da benzer şekilde çocuklarda nadirdir, ancak NF1'li yetişkinlerin yaklaşık %15'inde bulunur (6).

NF1'li kişilerin yaklaşık yarısında pleksiform nörofibromlar gözlenmektedir (6). Bu tümörlerin çoğu internaldir ve klinik muayenede görülememektedir, ancak manyetik rezonans görüntüleme (MRG'de) görülebilmektedir. Pleksiform nörofibromlar, çocukluk ve ergenlik döneminde büyüme eğilimindedir ve daha sonra yetişkinlik boyunca sabit kalır (Şekil 2.2) (79). Çoğu pleksiform nörofibrom asemptomatik olmasına rağmen, bazıları ağrıya neden olabilir, şekil bozukluğuna neden olacak şekilde büyüyebilir, bitişik dokuda aşırı büyümeye (*overgrowth*) veya erozyona neden olabilir veya sinirlerin ve diğer yapıların işlevini etkileyebilir.



Şekil 2.2. Olgu 7'ye ait kutanöz (a) ve pleksiform (b) nörofibrom görüntüleri

Olgularda en sık gözlenen non-neoplastik bulgu cilt bulgularıdır ve bunlar arasında neredeyse tüm NF1 tanılı olgularda gözlenen multipl café-au-lait makülleri (CALM) ilk sırayı almaktadır (80). Café-au-lait makülleri, daha açık veya daha koyu, daha küçük veya çok daha büyük veya şekil olarak düzensiz olabilmeleri birlikte genel olarak sınırları belirgin, oval, hiperpigmente maküllerdir (Şekil 2.3) (77). Genellikle

bebeklik ve erken çocukluk döneminde ortaya çıkarlar ve bir kez oluştuktan sonra sayı ve boyut olarak sabit kalırlar.



Şekil 2.3. Café-au-lait makülleri

NF1 için tanı kriterleri arasındaki en spesifik ve neredeyse patognomonik olduğu düşünülen bulgu intertriginöz çillenmedir (Crowe bulgusu) (81). % 85 oranında ve özellikle aksiller ve inguinal bölgelerde gözlenmektedir (Şekil 2.4) (77).



Şekil 2.4. Olgu 14'e ait Crowe bulgusu pozitifliği (aksiller çillenme)

Bunların dışında juvenil ksantogranüloma ve nevüs anemikus da NF1 olgularında genel toplum sıklığına göre daha sık görülen cilt bulgularındandır (82).

Oküler bulgular

Lisch nodülleri, hiperpigmente iris hamartomları olup yaklaşık tüm NF1 tanılı erişkin olgularda (%95-100) gözlenirken 5 yaşından küçük NF1 tanılı çocukların yarısından daha azında bulunur (6, 77). Koroidal çillenme ise her yaşta görülebilen ve yaşla beraber görülme sıklığı artan schwann hücre proliferasyonlarıdır (83).

Daha nadir ancak daha ciddi seyreden diğer göz bulgusu optik gliomlardır. NF1'de en sık görülen beyin tümörleridir. NF1'li çocukların %5-20'sinde görülmekte olup geç çocukluk hatta erişkinlik döneminde dahi asemptomatik olabilecekleri gibi semptomatik olanlar görme kaybı, strabismus, propitozis gibi bulgularla kendini gösterir (84). Optik gliomların klinik seyri NF1 olmayanlara göre daha hafif olma eğilimindedir.

Nörogelişimsel bulgular

NF1 tanılı olgular, okuma, yazma ve matematik becerilerini içeren belirli öğrenme güçlükleri ve davranış problemleri açısından yüksek risk altındadır (85). % 50-80 oranında öğrenme ve davranış problemleri görülebilmektedir (6). Tüm gen delesyonu olan olgularda bilişsel yetersizlik daha sık gözlenmektedir. Olguların yaklaşık % 4-13'ünde epilepsi gözlenmektedir (77). Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), otizm spektrum bozukluğu (OSB), anksiyete ve uyku bozuklukları sık olarak karşımıza çıkmaktadır (86). Polinöropati, migrene bağlı veya diğer tür baş ağrısı görülen diğer nörolojik bulgular arasındadır (87). Erişkinlerde daha fazla olmak üzere % 50'ye varan oranda baş ağrısı sıklığı rapor edilmiştir (87).

Kas-iskelet bulguları

NF1'li olgularda sfenoid kanat displazisi, skolyoz, uzun kemiklerde psödartroz, artmış fraktür riski, azalmış kemik mineral yoğunluğu, osteoporoz gibi çok çeşitli kemik ve iskelet bulguları sıkça karşımıza çıkmaktadır (88). Skolyoz, NF1'in en yaygın iskelet belirtisidir ve çocuklarda % 30'a varan sıklıkta görülmektedir (75). Kaspiris ve arkadaşlarına göre osteoporoz sıklığı % 20 ile 50 arasında değişmektedir (88).

Vaskülopati

NF1 tanılı olgularda % 20'ye varan sıklıkta arteriyal hipertansiyon (HT) görülebilmektedir (89). Hipertansiyon için her yaşta artmış risk söz konusudur, ancak

erişkinlerde çocuklara kıyasla daha sık gözlenmektedir. Vaskülopati nedeniyle genel popülasyona göre NF1'li olgularda özellikle daha erken yaşta görülebilen stroke riski mevcuttur (90).

Kardiyak bulgular

Pulmoner kapak stenozu ve mitral kapak anomalileri NF1 tanılı olgularda en sık görülen kardiyak patolojilerdir (91, 92) Konjenital kalp defektleri ve hipertrofik kardiyomyopati özellikle *NF1* tüm gen delesyonu olan olgularda daha sık görülmektedir (91, 93).

NF1 ile ilişkili olarak diffüz akciğer hastalığı yetişkinlerin % 10-20'sinde görülür (94, 95).

NF1'li bireyler, yaşa göre boy olarak ortalamanın altında ve baş çevresi açısından ortalamanın üzerinde olma eğilimindedir. (96). Buna karşılık, *NF1* tüm gen delesyonu olan olgularda, 2-6 yaş arasında özellikle boyda aşırı büyüme gözlenmektedir (24, 97).

Geç ergenlik (puberte tarda) sık gözlenen endokrinolojik problemler arasındadır (98). Bununla birlikte özellikle optik kiazma tümörü olan NF1'li çocuklarda erken ergenlik/puberte prekoks ve/veya büyüme hormonu (BH) fazlalığı da görülebilir (99, 100).

NF1'li olguların ortalama yaşam süresinin, genel popülasyona kıyasla en az sekiz yıl daha az olması beklenmektedir (101). NF1'li olgularda erken ölümün en önemli nedenleri olarak malignite ve vaskülopati sayılabilmektedir ayrıca yapılan bir çalışmada kadınlarda daha yüksek mortalite oranı tespit edilmiştir (76).

Tümörler

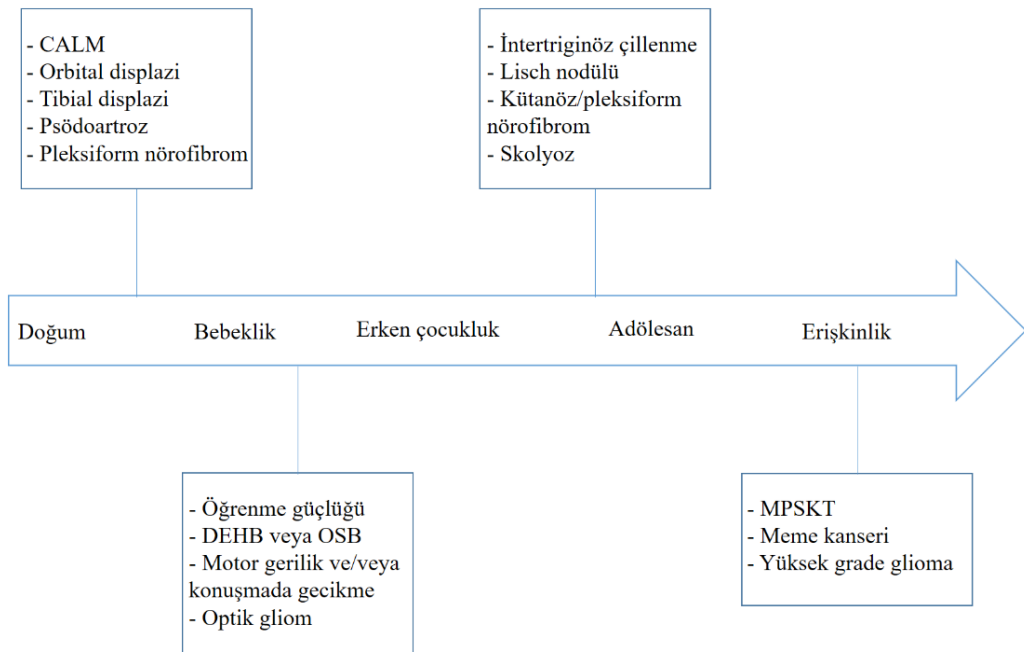
NF1 tanılı olgularda nörofibromlar dışındaki bazı tümörlerin de görülme sıklıkları artmıştır. Malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPSKT), NF1 ile ilişkili gözlenen en sık malign neoplazmlardır (6). Genel popülasyonla karşılaştırıldığında NF1'li olgularda, MPSKT daha genç yaşta ortaya çıkma eğiliminde ve daha kötü bir prognoz ile ilişkilendirilmektedir (102). NF1'li kadınlarda 50 yaşından önce meme kanseri gelişme riski artmıştır (103). Ayrıca nadir görülmekle birlikte, NF1 tanılı çocuklarda juvenil

miyelomonositik lösemi (JMML) riski diğer çocuklara göre yüzlerce kat daha fazladır (104).

Mozaik NF1

Vücudun bir veya daha fazla segmentinde lokalize NF1'in klinik özellikleri ile veya tipik jeneralize NF1 olarak prezente olabilir (105). Mozaik NF1 genellikle aynı patojenik varyantı içeren tipik jeneralize NF1'den daha hafiftir ve mozaik NF1'li bazı yetişkinlerde NF1'e ait hiçbir klinik bulgu gözlenmez (106, 107). Mozaik NF1'li yetişkinlerin tipik jeneralize NF1'li çocukları olabilir (108).

NF1 olgularında bulguların ortaya çıkma yaşları değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak belli yaş gruplarında belli bulgular gözlenmektedir (Şekil 2.5) (75).



Şekil 2.5. NF1 klinik bulgularının dönemsel olarak ortaya çıkışı. Klinik bulguların zamanlaması olgular arasında değişkenlik gösterebilmektedir (75). CALM, café-au-lait makülü, DEHB: dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, OSB: otizm spektrum bozukluğu, MPSKT: malign periferik sinir kılıfı tümörü.

NF1 tanısı için gerekli klinik bulgular, 1988 yılında *National Institutes of Health* (NIH) Konsensüs Geliştirme Konferansı tarafından belirlenen tanı kriterlerinde belirtilmiştir (Tablo 2.2) (109).

NF1, asemptomatik taşıyıcı veya nesil atlama olmaksızın tamamen penetrandır (75).

Tablo 2.2. NIH Konsensüs Geliştirme Konferansı tarafından belirlenen NF1 tanı kriterleri. Bu kriterlerden 2 veya daha fazlası sağlanırsa NF1 klinik tanısı konulmaktadır (109).

Puberte öncesi dönemde ≥ 5 mm çapında veya puberteden sonra ≥ 15 mm çapında altı veya daha fazla café-au-lait makülü
Aksiller veya inguinal bölgede çillenme
İki veya daha fazla kutanöz nörofibrom veya bir pleksiform nörofibrom
İki veya daha fazla iris hamartomu (Lisch nodülleri)
Optik yol gliomu
Sfenoid kanadı içeren belirgin bir uzun kemik displazisi veya psödoartroz olsun veya olmasın uzun kemik korteksinin incelmesi
Nörofibromatozis tip 1 tanılı birinci derece akraba

2.3.5.2. Noonan sendromu

Noonan sendromu (NS) en sık rastlanan RASopati sendromlarından biridir. Sıklığının 1:1000 ile 1:2500 arasında olduğu, bununla birlikte kliniği hafif seyreden olguların tanı almadığı düşünülmektedir (110).

PTPN11 ilişkili NS'de ileri baba yaşının etkili olduğu, ayrıca ailesel kalıtılan vakalarda erkek çocuklarda Noonan sendromu görülme riskinin daha fazla olduğu bilinmektedir (111).

Noonan sendromu, karakteristik yüz özellikleriyle tanınabilmekte olup görülen fasiyal dismorfik özellikler yaşa bağlı olarak bazı değişiklikler gösterebilmektedir. Yenidoğanlarda; geniş alın, aşağı çekik palpebral fissürler, hipertelorizm, düşük yerleşimli ve arkaya dönük kulaklar, belirgin vermillion sınırı, derin filtrum, kısa boyun, bol ense derisi ve düşük arka saç çizgisi bulunur. İnfant dönemde; horizontal palpebral fissürler, hipertelorizm, pitozis, deprese burun köprüsü, bülböz burun ucu mevcuttur. Çocukluk döneminde ise yüz görünümü sıklıkla miyopatik yüzü andırır şekilde ifadeden yoksundur. Adolesan dönemde üçgen bir yüz yapısı ile beraber daha belirgin yüz hatları

ortaya çıkar, daha uzun ve yele boyun gözlenir. Erişkinlerde ise belirgin nazolabial katlantılar gözlenir, deri transparan ve kırışık olur (112).

Büyüme

Noonan sendromlu olgular genelde doğumda normal kilo ve boya sahipken yenidoğan döneminde olguların % 63'ünde beslenme güçlükleri ve gelişme geriliği mevcuttur (113). Ortalama prepubertal büyüme, boy ve kilo için 3 persantile paralel olup puberte başlangıcı yaklaşık iki yıl gecikir ve pubertal büyüme atağı genellikle az veya yoktur (113). Kemik matürasyonu genellikle geciktiğinden, 20'li yaşlara kadar uzun süreli büyüme mümkün olur ve final boy erkeklerde 161-167 cm, kadınlarda 150-155 cm olan normalin alt sınırına ulaşabilir (112). Postnatal başlangıçlı orantılı boy kısalığı % 80'e varan sıklıkta gözlenebilmektedir (114). *PTPN11* geninde patojenik varyantı mevcut NS tanıılı olgularda, artmış BH salgısıyla parsiyel olarak kompanse edilebilen post-reseptör düzeyde sinyal defektinden kaynaklı hafif BH direnci gösterilmiştir (115).

Kardiyak bulgular

Noonan sendromlu olgularda yaklaşık % 85-90 sıklıkta kardiyovasküler defekt görülmekte olup kardiyak hastalıkları ikiye ayırmak gerekirse konjenital kalp hastalığı (KKH) % 80, hipertrofik kardiyomiyopati (HKMP) % 20 sıklıkla görülmektedir (116). En sık görülen konjenital kalp defekti pulmoner kapak stenozudur (PS) (% 50-% 62) (113). NS'da sık gözlenen diğer kardiyak anomaliler; % 4-57 sıklıkla atriyal septal defekt (ASD), % 1-14 oranında ventriküler septal defekt (VSD), % 1-13 oranında atriyoventriküler kanal defektleri, % 2-17 sıklıkla mitral kapak anomalileri, % 2-9 oranda aort koarktasyonu, % 1-6 patent duktus arteriyosus (PDA) ve % 1-4 sıklıkla Fallot tetralojisi (TOF) olarak sayılabilir (116). Ayrıca ileti bozuklukları ve diğer elektrokardiyografik patolojiler yaklaşık % 90 sıklıkla görülebilmektedir (117).

Noonan sendromu, trizomi 21'den sonra KKH görülen en sık sendromik nedendir (118). Prendiville ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Noonan sendromlu hastaların % 81'inde kardiyovasküler hastalık bulunduğunu, bunların % 57'sinde PS, % 32'sinde sekundum tip ASD, % 16'sında HKMP görüldüğünü tespit etmiştir (118).

Noonan sendromunda görülen HKMP durumunda % 70 oranda ek konjenital kalp hastalığı mevcuttur (118). Ek olarak HKMP görülen Noonan sendromu hastaları arasında % 25'e varan oranda ölümcül kalp yetmezliği veya ani ölüm görülmektedir (4).

Psikomotor gelişim

Özellikle eklem hiperlaksisitesi ve hipotoni nedeniyle gelişim basamaklarında erken dönemde gecikme olabilmektedir. Ortalama olarak desteksiz oturma 10 aylıkken, yürüme ise 21 aylıkken kazanılmaktadır (119). Tek kelime kullanımı ortalama 15 aylıkken, 2 kelimelik cümle kurma 31-32 aylıkken kazanılmaktadır (120). Bilişsel yetersizlik görülme sıklığı % 15-35 oranında olup genelde hafif seyredir (113). NS tanılı olgularda dikkat eksikliği ve otizm spektrum bozukluğu görülme riski de artmıştır (119).

Ürogenital bozukluklar

NS'lu olguların % 11'inde renal anomaliler bulunmaktadır. Genel olarak hafif bulgular görülmekle beraber en sık rastlanan renal anomali renal pelvis dilatasyonudur (112). Erkeklerde pubertal gelişim ve fertilité normal, gecikmiş veya yetersiz olabilmekte iken kadınlarda fertilitenin normal olması beklenmektedir. Kızlarda ise puberte gecikmeli olabilir, ortalama menarş yaşı 14.6 ± 1.17 yıldır (112). İnmemiş testis erkek olgularda doğumda sık olarak gözlenmektedir (% 77) (113).

İskelet bulguları

% 13-30 NS tanılı olguda torakal bölgede skolyoz tespit edilmekte olup geniş toraks, ayırık meme başları, süperior pektus karinatum, inferior pektus ekskavatum gibi göğüs deformiteleri sık görülen (% 28-95) bulgular arasındadır (121). Yüksek damak, dişlerde kalabalıklaşma, mikrognati de sık rastlanan bulgularındadır (121). Kubitus valgus, radyoulnar sinostoz, brakidaktili ve 5. parmakta klinodaktili de gözlenen üst ekstremité bulguları arasındadır (112).

Kanama diyatezi

Yapılan farklı çalışmalara göre NS'li tüm bireylerin üçte biri veya daha azında, bir veya daha fazla koagülasyon bozukluğu olduğu öngörülmektedir (122).

Lenfatik sistem

NS'lu olgularda sıklıkla lenfatik sistem anomalileri gözlenmektedir. En sık olarak el sırtında ve ayak dorsalinde gözlenmektedir.

Oküler

NS'lu olguların % 95'e yakınında pitozis, strabismus, kırma kusurları, ambliyopi ve nistagmus gibi oküler anormallikler gözlenmektedir (112).

İşitme

Yaklaşık % 40 NS'li olguda sensörinöral, ileti tipi veya hem ileti hem sensörinöral tipte işitme kaybı mevcuttur (123).

Dermatolojik bulgular

Café-au-lait makülleri, lentiginler ve özellikle ekstansör bölgelerde ve yüzde foliküler keratoz gözlenebilmektedir (112).

Malignensiler

JMML başta olmak üzere akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut myeloid lösemi (AML) gibi hematolojik maligniteler ile rabdomiyosarkom ve nöroblastom gibi solid tümörler sıklığı artmış malignensiler arasındadır (124).

Prenatal dönemde muayene bulguları arasında; polihidramniyoz, hidrops fetalis, lenfatik displazi (nukal translusenside [NT] artış, kistik higroma, *ascites*, pleval ve perikardiyal efüzyon başta olmak üzere), kardiyak anomali, rölatif makrosefali, renal anomali bulunur. NT artışı olan kromozomal olarak normal fetusların % 3-15'inde *PTPN11* ile ilişkili NS olduğu tahmin edilmektedir (125).

NS'de fenotip değişken olmakla birlikte penetrans tamdır (116).

Noonan sendromu tanı kriterleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 2.3) (113).

2.3.5.3. Multipl Lentiginlerle Seyreden Noonan Sendromu (MLNS)

Multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromu (MLNS), Noonan sendromu ve NF1'den sonra 3. en sık nöro-kardiyo-fasiyo-kutanöz sendrom olarak karşımıza çıkar (8).

Tablo 2.3. Noonan sendromu tanı kriterleri (113)

Klinik özellik	A: major	B: minör
1. Yüz	Tipik yüz bulguları*	Destekleyici yüz bulguları
2. Kardiyak	PS ve/veya HKMP	Diğer kardiyak defektler
3. Boy	<3 p	<10 p
4. Göğüs duvarı	Pektus karinatum/ekskavatam	Geniş toraks
5. Aile öyküsü	Kesin NS tanılı 1. derece akraba	NS tanısını destekleyen 1. derece akraba
6. Diğer	Hafif gelişimsel gecikme, kriptorşidizm VE lenfatik displazi	Hafif gelişimsel gecikme, kriptorşidizm VEYA lenfatik displazi
NS tanısı	1A kriteri (tipik yüz bulguları) + 1 major kriter VEYA 2 minör kriter	1B kriteri (destekleyici yüz bulguları) +2 major kriter VEYA 3 minör kriter

* NS'nin yüz özellikleri zamanla değişir ve sadece küçük farklılıklar olabilir.

HKMP: hipertrofik kardiyomiyopati, NS: Noonan sendromu, PS: pulmoner stenoz

Prevalansının 100000 canlı doğumda 1'den az olduğu tahmin edilmekte olup dünyada 200'den fazla olgu raporlanmıştır (4, 8). Erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan daha fazladır (126). Ancak bu farklılığın bias kaynaklı olduğu veya etkilenmiş erkek fetusların yaşamalarının tercihli olarak istenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (111).

Eski adı olan LEOPARD sendromu, olgularda gözlenen bulguların baş harflerinden oluşmuştur. Bu bulgular; multipl lentiginler, elektrokardiyografi (EKG)'de ileti defektleri, oküler hipertelorizm, pulmoner stenoz, anormal genital yapı, büyüme geriliği (retardasyon), sensörinöral işitme kaybıdır (4).

Dermatolojik bulgular

Lentiginler, genellikle mukozanın korunduğu, yüz, boyun ve gövdenin üst kısmındaki siyah-kahverengi maküller olarak karşımıza çıkmaktadır (127). MLNS tanılı

bazı olgularda lentiginler gözlenmemektedir. Sıklıkla lentiginler ortaya çıkmadan önce % 70-80 olguda café-au-lait makülleri görülmektedir (128). Ayrıca bu olgularda cilt elastisitesinde artış da görülebilmektedir.

Kardiyovasküler bulgular

Noonan sendromunda görülen yüksek PS sıklığının tam tersi olarak HKMP, MLNS'de kalp kusurları olan olgularda % 70'e varan sıklıkta gözlenebilmekte olup en sık infant dönemde ortaya çıkar (129). Olguların yaklaşık % 25'inde PS, yaklaşık % 23'ünde ileti defektleri görülürken az bir kısmında aort ve mitral kapak anormallikleri de gözlenir (130).

Yüz bulguları

Fasiyal dismorfik bulgular Noonan sendromuna benzemekle beraber genellikle daha hafif seyreder (128).

İşitme

MLNS'li olguların yaklaşık % 20'sinde sensörinöral işitme bozukluğu mevcuttur (130). Noonan sendromuna göre MLNS'de işitme kaybı daha belirgin seyreder (4).

Büyüme

Büyüme geriliği olguların yaklaşık % 30'unda gözlenir ve NS'de görülene kıyasla daha hafif seyreder (4). Boy kısalığı raporlanmış olguların % 50'sinden fazlasında gözlenir (8).

Psikomotor gelişim

Yaklaşık % 30 olguda hafif bilişsel yetersizlik gözlenmektedir (130).

Ürogenital sistem

Kriptorşidizm erkek olguların yaklaşık üçte birinde mevcuttur. Seyrek olarak hipospadias, idrar yolu defektleri ve ovaryen anomaliler gibi diğer anormallikler de gözlenebilmektedir (130).

MLNS'nin penetransı, genellikle fenotipik özelliklerin şiddetinin değişkenliği, bias ihtimali ve hastalığın değişken ekspresivitesi nedeniyle netlik kazanmamıştır.

2.3.5.4. Legius Sendromu

Legius sendromu, yaklaşık 200000 kişide 1 sıklığa sahip *SPRED1* genindeki otozomal dominant fonksiyon kaybettirici mutasyonların sebep olduğu bir RASopatidir (1, 8). Literatürde yaklaşık 300 olgu raporlanmış olup NF1 kliniği ile özellikle cilt bulguları açısından örtüştüğü için gerçek sayının altında kaldığı düşünülmektedir (131).

Bazı olgularda Noonan sendromu benzeri yüz özellikleri, mutlak veya rölatif makrosefali, öğrenme güçlüğü, davranış problemleri görülebilmektedir (58). Yapılan bir çalışmada rölatif makrosefali oranı % 27 olarak saptanmıştır (132). Kaba yüz özellikleri görülebilmektedir (8). Bazı olgularda boy kısalığı bildirilmiş olmakla beraber olguların genellikle normal boy aralığında olmaları beklenmektedir (58, 132).

Cilt bulguları

Legius sendromlu olgularda neredeyse her zaman CALM bulunmaktadır ve bazı olgularda intertriginöz çillenme görülebilmektedir (1, 3). Bununla birlikte *SPRED1* geninde patojenik varyant tanımlanmış 60 yaşında bir erkek ve 2 yaşında bir çocuk olguda CALM veya çillenme saptanmamıştır (58, 133). İnfantlarda CALM sayısı azken NF1'deki cilt bulgusunun durumuna benzer olarak, yaşla birlikte artması beklenmektedir (131). Bahsedilen 2 olgunun durumunun da muhtemelen çocuğun küçük yaşta olması ve ileri yaşla beraber café-au-lait maküllerinin kaybolabilmesi nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (131).

Psikomotor gelişim

Legius sendromlu olgularda öğrenme güçlüğü, DEHB görülebilmektedir (132). Sıklığı az olmakla birlikte olgularda bilişsel yetersizlik görülebilmektedir; ancak NF1'de gözlenenlerden daha hafif olması beklenmektedir (134, 135).

Tümörler

Legius sendromunda genel anlamda, tipik olarak NF1'de gözlenen Lisch nodülleri, nörofibromlar ve merkezi sinir sistemi tümörleri gibi tümörler gözlenmemektedir. Raporlanan bazı olgularda malignite oluşumu gözlenmiş olup *SPRED1* geninin RAS-MAPK yolağının bir parçası olması göz önünde bulundurulduğunda, potansiyel kanser riskini değerlendirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (131).

Penetrans

Olguların büyük çoğunluğunda CALM ve/veya çillenme gözlenmekle beraber, cilt bulgularının penetransının yaşla ilgisi belirlenmemiştir (131). Küçük yaş çocuklarda henüz CALM gelişmemiş olabilir ve daha ileri yaş olgularda CALM kaybolmuş olabilir.

2.3.5.5. Kardiyofasiyokütanöz Sendrom

Kardiyofasiyokütanöz sendrom (KFKS), nadir görülen bir RASopati olup dünya çapında yaygınlığı bilinmemektedir, ancak Japonya'da 1:810000 olduğu tahmin edilmektedir (136). Literatürde KFKS tanılı 100'den fazla birey bildirilmiş olmakla birlikte dünyada KFKS tanılı olguların toplam sayısının birkaç yüz olduğu tahmin edilmektedir, ancak hafif derecede etkilenen bireylerin tanısının atlandığı düşünülmektedir (137). Kadın ve erkeklerde eşit sıklıkta görülmektedir (137).

Olguların çoğunda değişken derecede nörolojik etkilenme, nörobilişsel gecikme veya öğrenme güçlüğü görülmekte olup ağır seyreden olgularda konuşmada gecikme, yürüme güçlüğü de eşlik edebilmektedir. Bununla beraber normal aralıkta IQ'ya sahip bazı olgular da mevcuttur (137). KFKS tanılı olguların yaklaşık % 50'sinde nöbet gözlenir ve bunların çoğu bebeklik veya erken çocukluk döneminde başlar (138).

İnfant dönemde, ciddi beslenme güçlükleri yaygındır ve bu da gelişme geriliğine neden olmaktadır; ancak ilerleyen yaşla beraber beslenme problemleri ortadan kalkmaktadır.

Olgularda gözlenen dismorfik yüz bulguları arasında oküler hipertelorizm, yüksek alın, aşağı çekik palpebral fissürler, makrosefali ve kaba yüz sayılabilir (8). Geç adölesanlıktan itibaren Noonan sendromuna benzer olan fasiyal özellikleri daha az belirgin olmaya başlar.

Kalp problemleri olguların yaklaşık % 75-80'inde görülür (137). En sık görülen kardiyak anomaliler PS ve ASD olup HKMP veya ritim bozuklukları daha az sıklıkla gözlenir (8). Nörolojik tutulum KFKS'de yaygındır ve bilişsel gerilik, öğrenme güçlüğü, hipotoni, motor becerilerde ve konuşmada gecikme ve epilepsi olarak kendini gösterir (136).

Ektodermal bulguların sıklığı ile NS'den ayrılmaktadır (4). Seyrek kaş ve kirpikler, ince, kıvrıkcık ve kırılğan saçlar ve hiperkeratotik cilt görülen ektodermal bulgular arasındadır (136). Ciltte kuruluk ve foliküler hiperkeratoz ilerleyen yaşla beraber iyileşme eğilimindedir ve yüzde ve kafa derisinde saç ve kıl büyümesine izin verir, bununla birlikte palmoplantar hiperkeratoz ve lenfödem daha şiddetli hale gelebilir (139). Eğer ciltte nevüs mevcutsa zamanla artış gösterebilmektedir (140).

Kardiyak anomalilerin sıklığı NS'dekine benzerdir ve en yaygın olarak PS, septal defektler ve HKMP görülmektedir (3). Strabismus, nistagmus, miyopi, hipermetropi ve astigmatizm gibi oküler anormallikler ve kas-iskelet sistemi anormallikleri de sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (3). Olguların çoğunda, hipotoni, kas kütesinde azlık ve eklemlerde laksisite artışı da dahil olmak üzere kas-iskelet sistemi bulguları vardır. Bunun yanında pektus deformiteleri, skolyoz, kifoz ve/veya yürüme bozuklukları gibi ortopedik problemler görülebilmektedir (137).

Strabismus, nistagmus, optik sinir hipoplazisi, astigmatizm, miyopi ve/veya hipermetropi dahil olmak üzere oküler anormallikler çoğu bireyde mevcut olup görme keskinliğinde azalmaya neden olabilmektedir (137).

Ürogenital anomaliler arasında en sık olarak erkeklerde kriptorşidizm olmak üzere, böbrek kistleri, taşlar, hidronefroz ve hidroüreter gibi patolojiler % 33'e varan sıklıkta görülebilmektedir (137).

CS, NS veya NF1 dahil olmak üzere diğer RASopatilerde gözlenen benign papillomlar veya maligniteler KFKS'de bildirilmemiştir. Bununla birlikte, birkaç olguda ALL, immunsuprese bir olguda hepatoblastom, non-Hodgkin lenfoma ve büyük B hücreli lenfoma bildirilmiştir (141-145).

Prenatal dönemde olguların çoğunda polihidramniyoz gözlenmektedir. Maternal olarak hiperemezis gravidarum oluşabilir ve fetal hareketlerde azalma görülebilir.

KFKS'nin penetransı tamdır.

2.3.5.6. Costello Sendromu

Costello sendromu (CS), tahmini 1:300000 doğum insidansına sahip en nadir RASopati sendromlarından biridir (1). Kadın ve erkeklerde eşit sıklıkta görülmektedir.

Cilt bulguları

CS'deki dermatolojik özellikler ayırt edici olup birçoğu CS'ye özgüdür. CS'li olguların çoğunda kıvrıkcık saç paterni (% 95.7) ve frontotemporal alopesi (% 30.4) vardır ve saçlar seyrek, kırılğan ve yavaş uzama eğilimindedir (146). Palmoplantar keratoderma yaygındır ve ciddiyetine bağlı olarak işlevi etkileyebilir (147). Avuç içi ve ayak tabanlarında, gevşek, kırışmış veya fazla deri kırışıklıkları içerir ve olguların aile üyelerine göre daha koyu ten rengine sahip olmaları beklenmektedir (146). İnfant dönemde gözlenmeyen papilloma, küçük çocuklarda, genellikle perinazal bölgede ve daha az sıklıkla perianal bölge, gövde ve ekstremitelerde görülebilmektedir (148).

Büyüme

Gestasyonel yaşa göre doğum kilosunun ve baş çevresinin büyük olması (genellikle >50. persantil), Costello sendromunun hatalı bir şekilde makrozomi olarak sınıflandırılmasına yol açabilmektedir (148). Bu durumun yanında boy kısalığı gözlenir. Bebeklik döneminde ciddi beslenme güçlükleri ile karakterizedir. Kemik yaşı geridir ve tam veya kısmi BH eksikliği görülebilmektedir (149). Erişkinde boy aralığı ortalama 135-150 cm olarak bildirilmiştir (150).

Kardiyak

İlk 1 yaş içinde en sık morbidite ve mortalite nedeni olan kardiyak defektler % 85 olguda görülmekte olup bunlar arasında HKMP, KKH ve aritmiler sayılabilir (146).

Psikomotor gelişim

Çoğu olguda infant dönemde hipotoni ve gelişme geriliği gözlenir. Bilişsel yetersizlik yaklaşık % 80 olguda görülür (146). Olguların % 20-50'sinde nöbet gözlenmektedir (151).

4 yaşına kadar olan çoğu olguda otizm spektrum bozukluğu için tarama kriterleri karşılanırken 4 yaşından büyük olguların hiçbirinde kriterlerin karşılanmaması, otizm benzeri bulguların ilerleyen yaşla beraber kaybolmasını destekler niteliktedir (152).

Kas-iskelet bulguları

Kas-iskelet bulguları sıklıkla görülmekte olup skolyoz, kifoz, pektus deformiteleri, el bileği ve parmaklarda ulnar deviasyon, osteopeni, osteoporoz, kalça displazisi, aşil tendonunda gerginlik, pes ekinovarus, düz tabanlık, büyük veya küçük eklem kontraktürleri, eklem laksitesinde artış görülen bulgular arasındadır (153).

Respiratuar bulgular

Yapılan bir çalışmada, yenidoğanların % 78'inde solunum komplikasyonları gözlenmiş olup çoğunluğu düzelmiştir, sadece şiddetli fenotiple ilişkili nadir *HRAS* patojenik varyantları olanlarda daha ciddi komplikasyonlar görülmüştür (154). Büyük çocuklarda ve genç erişkinlerde üst hava yolu obstrüksiyonları daha sık görülmektedir (154).

Görme

CS'li olguların çoğunda şaşılık, nistagmus, miyopi, hipermetropi ve astigmatizm gibi kırma kusurları ile görme problemleri görülmektedir (146).

Solid tümörler

Benign ve malign solid tümörler, genel popülasyona göre Costello sendromlu bireylerde çok daha sık görülmektedir ve *HRAS* patojenik varyantı olan bireylerin genel olarak yaşamları boyunca tümör insidansı yaklaşık % 15'tir (51). CS'li olgularda, ağırlıklı olarak erken çocukluk döneminde embriyonal rabdomiyosarkom, ergenlik ve erken erişkinlik döneminde mesanenin transisyonel hücreli karsinomu ve nöroblastom için artmış malignite riski bulunmaktadır (146).

Costello sendromunun penetransı tamdır (148).

2.3.5.7. Kapiller Malformasyon-Arteriyovenöz Malformasyon Sendromu

Kapiller malformasyon-arteriyovenöz malformasyon sendromu (KM-AVM), arteriyovenöz malformasyonlar ve fistüllerle ilişkili olabilen multifokal kapiller malformasyonlarla karakterize otozomal dominant kalıtsal bir hastalıktır (155). Kuzey Avrupalılarda prevalansın 1:100000 olduğu tahmin edilmektedir (156).

Bu sendromun en önemli özelliği malformasyonların multifokal olmasıdır. Arteriyovenöz malformasyonlar, cilt, kas, kemik, kalp ve beyin dahil olmak üzere çeşitli

iç organlarda ve birçok dokuda ortaya çıkabilmektedir (3). Olguların % 15-20'sinde bir arteriyovenöz malformasyon (AVM) görülmektedir ve bu olgularda arteriyovenöz malformasyonlar ve fistüllerden kaynaklanan anormal kanama, migren ve nöbet ve hatta yüksek debili kalp yetmezliği gözlenebilmektedir (8, 157). Arteriyovenöz malformasyonlara ek olarak, olgularda TOF, septal defektler ve kapak anomalileri gibi kardiyovasküler malformasyonlar görülebilmektedir (3).

"Porto şarabı lekeleri" olarak da bilinen kapiller malformasyonlar özellikle yüz ve ekstremitelerde lokalize beyaz bir halo ile çevrili multipl, pembe, yaklaşık 1-2 cm'lik yuvarlak lezyonlardır (155, 158).

Net olmamakla beraber KM-AVM olgularında, NF1'de görülenlere benzer şekilde tümör görülme riski olabileceği belirtilmektedir (3).

KM-AVM'nin penetransı % 90-99 olarak belirtilmektedir (8).

2.3.5.8. Gevşek Anagen Saçlarla Seyreden Noonan Sendromu Benzeri Bozukluk

Gevşek anagen saçlarla seyreden Noonan sendromu (GSNS), belirgin alın, makrosefali gibi belirgin yüz görünümüne sahiptir (159).

Saç yapısı oldukça karakteristik olup seyrek, gevşek, ince, anagen, genellikle gümüş sarısı renkte ve yavaş uzayan tiptedir (160). Cilt problemleri gözlenebilmektedir ve olgular egzama veya iktiyozisin eşlik ettiği hiperpigmente cilde sahip olabilmektedir (159).

Klasik NS ile karşılaştırıldığında kardiyak olarak mitral kapak displazisi ve septal defektler özellikle gözlenmekte olup yapısal kardiyak anomaliler oldukça sıktır (161).

Skolyoz, pektus deformiteleri, boy kısalığı gibi iskelet problemleri, erkeklerde kriptorşidizm gibi ürogenital problemler de sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (162).

Ciddi seviyede BH eksikliği, psikomotor gelişim basamaklarında hafif gecikme, hipernazal konuşma ve DEHB görülebilmektedir (160).

Ayrıca bazı olgularda, rölatif megalensefali, benign eksternal hidrosefaliyi düşündüren genişlemiş subaraknoid boşluklar ve vertikal tentoryum ile gösterilen görece küçük posterior fossayı içeren bazı beyin anormallikleri de gözlenmiştir (163).

2.3.6. Kalıtım Paterni

NF1 ve diğer RASopatilerin çoğunda hastalık otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Bu durumda olgunun kardeşleri için risk, ebeveynlerin genetik durumuna bağlıdır:

-Bir ebeveyn etkilenirse veya olguda tanımlanan patojenik varyant mevcutsa, olgunun kardeşleri için risk % 50'dir.

-Olguların bazılarında etkilenmiş bir ebeveyn bulunmakla beraber bazı olgularda patojenik varyant *de novo* olarak bulunmaktadır.

-Ebeveynler klinik olarak etkilenmediyse ve olguda bulunan patojenik varyant, her iki ebeveynde tespit edilemediğinde, kardeşlerinde NS riski düşük (<% 1) olarak öngörülmektedir.

-Mutasyon saptanan olgunun ileride her bir çocuğunun, NS ile ilişkili bu patojenik varyanta sahip olma riski % 50'dir. Bununla ilgili olarak gebelik öncesi preimplantasyon genetik tanı ve gebelik süresince yüksek risk söz konusu olduğundan prenatal tanı mümkündür.

Farklı olarak *LZTR1* geninde saptanan varyantların kalıtımı otozomal resesif veya otozomal dominant olabilmektedir. Otozomal resesif kalıtım paterninde etkilenmiş bireyin ebeveynlerine taşıyıcılık açısından bakılmalıdır. Ebeveynlerde taşıyıcılık durumunda her gebelikte % 25 olasılıkla etkilenme riski, % 50 olasılıkla asemptomatik taşıyıcı olma riski ve % 25 etkilenmeme ve taşıyıcı olmama ihtimali vardır. Etkilenmiş bireyde patojenik varyant saptandığında benzer şekilde riskli gebeliklerde prenatal tanı imkanı bulunmaktadır.

2.3.7. Tedavi

RASopatilerin RAS/MAPK yolağının neresinden kaynaklandığını belirlemek ve bunu ortadan kaldırabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. RAS/MAPK yolağını hedef alan birçok tedavi, yakın zamanda kanser yönetimi için onkolojide inhibitör olarak geliştirilmiştir (3, 8). RASopatilerin tamamı genel olarak RAS yolağındaki bir patolojiden

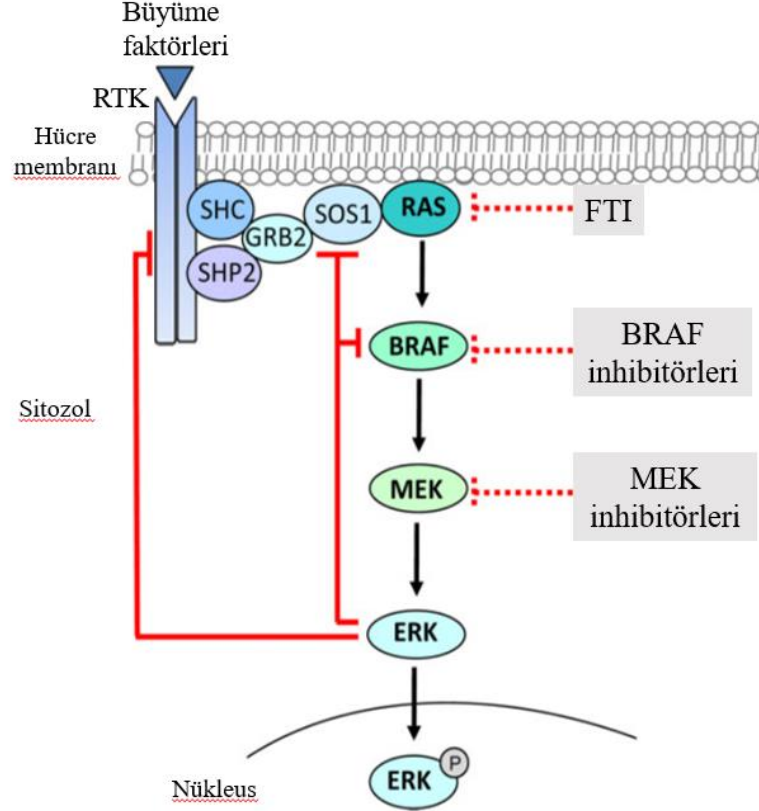
kaynaklandığından, bu yolağın spesifik moleküler tedavilerle hedeflenmesi umut verici olmakla birlikte, mozaik bir durumun sistemik seçeneklerle tedavi edilmesinin etkileri ve bu tür tedavi rejimlerinin sahip olabileceği potansiyel yan etkiler hakkında önemli sorular bulunmaktadır.

2018 yılı itibariyle, potansiyel faydalarını görmek için RASopatilerde sınırlı küçük moleküler tedaviler kullanılmış iken şu anda mevcut tedavi hedefleri, daha fazla hedefli uygulamanın yapılabileceği odaklanmış bir sistem sağladığı için nörobilişsel durumlara yöneliktir (8).

Statinler, Ras aktivitesine önemli bir katkıda bulunan Ras izoprenilasyonunun yapıldığı yolak olan kolesterol sentez yolağına müdahale ettiğinden, simvastatin veya lovastatin kullanımının umut verici olduğu düşünülmüştür (164). Ancak fonksiyonel MRG'deki değişikliklere rağmen, her iki denemenin de nörobilişsel gelişim üzerinde saptanabilir bir etkiye sahip olmadığı ve büyük ölçüde başarısız olduğu bildirilmiştir (164, 165).

Daha yeni bir tedavi denemesi olarak, HKMP olan çocuklarda sol ventrikül kitlesi üzerindeki etkisini belirlemek için bir MEK inhibitörü olan MEK162 kullanılmıştır (8). CS ve KFKS'nin, farnesil transferaz inhibitörleri tarafından doğrudan hedeflenmelerine izin veren RAS mutasyonları nedeniyle böyle bir ilaçla tedavi edilebileceği umulmaktadır (Şekil 2.6) (8, 166).

Güncel olarak RAS/MAPK yolağına yönelik geliştirilmiş, klinik araştırmalarda kullanılan ilaç denemeleri Tablo 2.4'te sunulmuştur.



Şekil 2.6. RAS/MAPK sinyal kaskadı ve küçük molekül inhibisyonu. RAS/MAPK yolağındaki genler küçük GTPaz'ları kodlayan bir multigen ailesi olarak bulunur. Yolakta aşağı doğru bir akış kaskadı mevcuttur. Fosforillenmiş ERK, yolağın nihai efektörüdür ve işlevini aşağıda yer alan birkaç molekül üzerinde gösterir. Yolak içinde geri besleme döngüleri (kesintisiz çizgiler) mevcuttur, bu sayede aktive edilmiş ERK, kaskadın sürekliliğini reseptör, SOS ve RAF seviyesinde engelleyebilir. CS (heterozigot aktive edici yanlış anlamalı *HRAS* mutasyonlarının neden olduğu) ve KFKS (*BRAF*, *MEK1* veya *MEK2*'deki heterozigot mutasyonların neden olduğu) için potansiyel terapötik tedaviler, farnesil transferaz inhibitörleri, BRAF inhibitörleri ve MEK inhibitörleri (kesik çizgiler) olarak belirtilmektedir (166). FTI: farnesil transferaz inhibitörleri.

Tablo 2.4. Klinik Araştırmalar için RAS/MAPK Küçük Moleküllerinin Mevcut Durumu (166)

Ajan	Hedef	Durum
<i>RAS modülasyonu</i>		
Lonafarnib	Farnesil transferaz	Faz II
Tipifarnib	Farnesil transferaz	Faz I/II
Salirasib	RAS antagonist	Faz I/II
<i>RAF inhibisyonu</i>		
Sorafenib	RAF/çok hedefli	Onaylı
RAF265	RAF/çok hedefli	Faz I/II
PLX4032	BRAF	Faz III
PLX5568	BRAF	Faz I/II
GSK2118436	BRAF	Faz I/II
XL281 (BMS908662)	BRAF	Faz I/II
<i>MEK inhibisyonu</i>		
CI-1040	MEK	Sonlandırılmış
PD0325901	MEK	Beklemede
AZD6244 (ARRY-886)	MEK	Faz I/II
AZD8330 (ARRY-704)	MEK	Faz I/II
ARRY-162	MEK	Faz I/II
ARRY-300	MEK	Faz I/II
RDEA119	MEK	Faz I/II
RDEA436	MEK	Faz I/II
E6201	MEK	Faz I/II
GSK1120212	MEK	Faz I/II
WX554	MEK	Faz I/II
GDC-0973	MEK	Faz I/II
AS703026	MEK	Faz I/II
RG7168 (CH4987655)	MEK	Faz I/II
TAK-733	MEK	Faz I/II

2.4. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi

Deoksiribonükleik asit (DNA)'ın yapısının Watson, Crick ve Park tarafından temel olarak keşfedilmesinden (Watson ve Crick 1953) ve diziyi tespit etmek için öncü yöntemlerin geliştirilmesinden bu yana Maxam ve Gilbert (1977) ve ardından Sanger

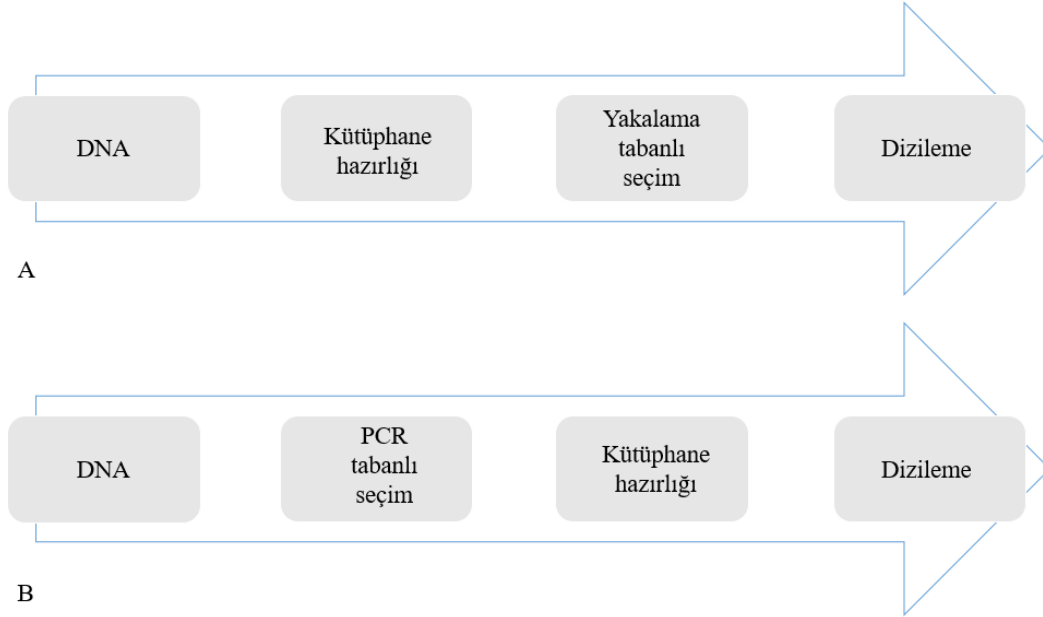
dizilemesi (Sanger ve Coulson 1975) gibi temel yöntemlerle DNA bazlarının belirlenmesi, DNA dizileme alanı kapasite, yetenek ve uygulamalarda hızla gelişmiştir (167). Yeni nesil dizileme yöntemi (NGS), aynı anda milyonlarca DNA fragmentini dizilemeye olanak veren ve geleneksel yöntemlere kıyasla birçok gen ve gen bölgelerini tek bir testle aynı anda analiz edebilen bir yöntemdir (168, 169). 2004 ile 2006 yılları arasında NGS teknolojileri tanıtılmıştır ve böylece biyomedikal araştırmayı dönüştürüp veri-çıktı dizilemesinde çarpıcı bir artışlara neden olmuştur (170). Bu durum bize hem zaman açısından hem de maddi açıdan fayda sağlamaktadır. NGS, tüm genomları sıralamak için kullanılabilir veya 22000 kodlayan genin tümü (tam bir ekzom) veya az sayıda bireysel gen dahil edilerek belirli ilgi alanlarıyla sınırlandırılabilir (171).

Milyonlarca DNA parçasının (fragmentinin) (veya komplementer DNA'nın) eş zamanlı olarak dizilenmesine yönelik bir yöntem olan yeni nesil dizileme (NGS) veya diğer adıyla masif paralel dizileme, birkaç gen veya gen bölgesini geleneksel yöntemlere kıyasla tek bir test ile eş zamanlı analiz edebilmesi sayesinde klinik laboratuvar çalışmalarına hızlı bir şekilde adapte olmuştur (168). Yeni nesil dizileme, birçok klinik laboratuvarında *germline* ve somatik genetik mutasyonlar için uygulanan bir test yöntemidir. Kalıtsal hastalıklarda *germline* mutasyonlar için testler, hedeflenen panel, tüm ekzom, tüm genom veya mitokondriyal DNA dizilemeyi içerebilir (172, 173). Laboratuvarlar arasında ihtiyaca bağlı olarak değişkenlik gösteren hedeflenmiş panel testler, çok çeşitli kalıtsal bozukluklar için dizayn edilebilmektedir. Klinik bir fenotip ile ilişkili genler için hedeflenen paneller, genellikle kalıtsal bozukluklar için uygulanan ilk test iken, tüm ekzom dizileme, hedeflenen testin bilgilendirici olmadığı durumlar için kullanılmaktadır (174, 175). Bir panel içindeki herhangi bir gen, tümüyle dizilenebilmektedir veya sadece *hotspot* bölgeleri gibi mutasyonların sıklıkla gözlemlendiği belirli bölgeleri dizilenebilir. Hem *germline* hem de somatik testler için, bir test kullanmaya karar verilirken hedeflenen panellerin içeriğini bilmek önemlidir.

Numuneler DNA ekstraksiyonu, kütüphane hazırlığı, hedef zenginleştirme ve dizileme aşamalarını takip etmektedir (Şekil 2.7) (176). Sonrasında sonuçlar biyoinformatik analizlerden geçirilerek mutasyonların tespiti yapılmaktadır.

2.5. Amaç

RASopati grubu hastalıklar en sık rastlanan genetik sendrom gruplarından biri olup en sık olarak NS ve bunu takip eder şekilde NF1 gözlenmektedir. Klinik bulgular bazı durumlarda iç içe geçmiş şekilde olabilmektedir ve moleküler tanı bu amaçla büyük öneme sahiptir. Bu amaçla oluşturulmuş hedefli gen panelleri hem maddi açıdan hem de zaman açısından hızlı ve ucuz tanı yöntemi olarak oldukça önem arz etmektedir. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde 2016-2021 yılları arasında *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *LZTR1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NF1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RASA1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1*, *SOS2* ve *SPRED1* genlerini içeren RASopati gen paneli çalışılmış olup sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda RASopati grubu sendromların sıklık oranının hedefli yeni nesil dizi analizi verilerine göre retrospektif olarak araştırılarak, mutasyon sıklıklarının ve mutasyon türlerinin belirlenmesi ve klinik ile ilişkilendirilmesi, sonuçların genotip-fenotip korelasyonu açısından değerlendirilmesi ve moleküler patolojinin klinik seyre etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 2.7. Yeni nesil dizileme yöntemindeki ıslak laboratuvar adımları. A, yakalama tabanlı dizileme için ıslak laboratuvar adımları. DNA, dizilemeden önce kütüphane hazırlığından ve ardından yakalamaya dayalı seçimden geçer. B, Polimeraz

zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı dizileme için ıslak laboratuvar adımları. PCR seçim adımı, kütüphane hazırlığından önce gerçekleşir veya PCR tabanlı dizilemede kütüphane hazırlama adımıyla birleştirilebilmektedir (168, 176). PCR: polimeraz zincir reaksiyonu.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Olguların Belirlenmesi

Çalışmamız kesitsel, retrospektif bir çalışma olup 2016-2021 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran ve RASopati moleküler tanısı alan 61 olgunun ve moleküler tanı almış aile üyeleri de dahil edildiğinde 69 olgunun klinik bulgularının, olgulara ait demografik bilgilerin ve laboratuvar sonuçlarının taranarak saptanan mutasyonlar ile olguların kliniklerinin karşılaştırılması ve moleküler patogenezin kliniğe etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyeti, yaşı, klinik bulguları, özgeçmiş ve soygeçmiş ile pedigrî bilgileri ve görüntüleme sonuçları Tıbbi Genetik polikliniği hasta dosyalarından elde edilmiştir. RASopati panel testi sonuçları Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi verilerinden temin edilmiştir.

Olguların çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. RASopati klinik ön tanısı almış olmak
2. RASopati moleküler tanısı almış olmak (ACMG [*American College of Medical Genetics and Genomics*] kriterlerine göre patojenik, muhtemel patojenik veya segregasyon sonucu ya da klinik korelasyon sonucu anlamlı bulunan klinik önemi bilinmeyen varyant saptanmış olması)

Olguların çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

1. RASopati açısından moleküler analiz yapılmamış olması
2. NGS tekniğiyle gen mutasyon analizi çalışılmamış olması

3.2. Etik Kurul Onayı

Araştırmamızda, çalışmaya dahil edilen hastaların aydınlatılmış onam formları ıslak imzalı olacak şekilde 18 yaş altı olgular için yasal vasilerinden ve 18 yaş ve üstü olgular için kendilerinden alınmıştır. Araştırma "İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" 16.11.2021 tarih ve 2021/2632 sayılı karar ile onaylanmıştır (Ek-1).

3.3. Moleküler Genetik Çalışma

3.3.1. Hedeflenmiş RASopati Gen Paneli

Çalışmamızda, GRCh37 (hg19) referans dizisi temel alınmıştır. Araştırma kapsamında *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *LZTR1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RASA1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1*, *SOS2*, *SPRED1*, *NF1* genlerini içeren 17 genin ekzon ve ekzon-intron bileşkesindeki varyantları saptayabilecek *QIAGEN* tarafından hazırlanan *Qiaseq Targeted* DNA Paneli kullanılmıştır.

3.3.2. Genomik DNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü

Olgulardan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüpe 2 mililitre (ml) periferik kan örneği alındıktan sonra olguların 200 mikrolitre (μ l) kan örneği ile *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen, Almanya*) kullanılarak spin kolon yöntemi ile *QIAcube® cihazında* (*Qiagen, Almanya*) otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.

Üreticinin önerdiği protokol aşamaları aşağıda özetlenmiştir:

1. Çalışmaya başlamadan önce solüsyonlar oda sıcaklığına getirilir.
2. 1.5 ml'lik ependorflara etiketleme yaptıktan sonra, ependorf tüpler, Rotor adaptörler ve spin kolonlar belirtilen konfigürasyonda *QIAcube* cihazına yerleştirilir.
3. Her örnek için 20 μ l proteaz K mikrosantrifüj tüplerine eklendikten sonra 200 μ l kan eklenir.
4. Her örneğe 200 μ l Buffer AL, 200 μ l etanol, 500 μ l Buffer AW1, 500 μ l Buffer AW2 ve 200 μ l Buffer AE solüsyonları belirtilen prosedüre uygun olarak cihaza eklendikten sonra *QIAamp DNA Blood Mini Kit* prosedürüne göre *QIAcube* cihazında otomatik DNA izolasyonu yapılır.

En iyi sonucu elde edebilmek için, tüm DNA örnekleri tutarlı kaliteye sahip olmalıdır. DNA izolasyonundan sonra DNA'nın konsantrasyon analizi için yapılan ölçüm işleminde *Qubit®* (*Thermo Fisher Scientific, USA*) florometre cihazı kullanılmıştır:

1. Standart ve örneklerin ölçümü için *working solution* hazırlanır.
2. *Working solution*'a; 1 μ l Reagent ve 199 μ l HS Buffer eklenir.

3. Önce standartların ölçümü için, 2 ayrı standart tüpünden birine 190 µl *working solution* ve 10 µl Standart 1, diğer tüpe de 190 µl *working solution* ile 10 µl Standart 2 eklendikten sonra kısaca vorteks ve spin yapılır. Sonrasında standartların ölçümleri yapılır.
4. Örneklerin DNA kalite ve miktar ölçümü için 198 µl *working solution* ve ependorf tüplerinden 2 µl DNA örneği alınarak özel *Qubit* tüplerine eklenir.
5. 2 dakika (dk) oda sıcaklığında bekletildikten sonra *Qubit* cihazında *dsDNA-dsDNA High Sensitivity* programı seçilerek örnekler ölçülür.
6. Ölçümden sonra DNA örneklerinin konsantrasyonu 10 ng/µl (nanogram/mikrolitre) olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile dilüe edilir.

3.3.3. Kütüphane Hazırlanması

Hastalardan elde edilen genomik DNA'dan kütüphane hazırlanması birkaç basamaktan oluşmaktadır. Islak laboratuvar aşamaları sırasıyla şu basamakları içerir:

1. Fragmentasyon, uç onarım (*end-repair*) ve A-ekleme (*A-addition*) ve 1. PCR
2. Adaptör Bağlanması ve 2. PCR
3. Hedef Zenginleştirme
4. Amplifikasyon (Evrensel [universal] PCR)

3.3.3.1. Fragmentasyon, uç onarım (*end-repair*) ve A-ekleme (*A-addition*) ve

1. PCR

- Nükleik asit örnekleri plaka üzerinde buz üzerine alınır. Yavaşça karıştırılır, tüplerin kenarlarında kalan sıvıyı toplamak için kısa bir süre santrifüj edilir ve ardından buza geri dönülür.
- Fragmentasyon, uç onarım (*end-repair*) ve A-ekleme (*A-addition*) için gerekli reaktifler hazırlanır.

Not: Fragmentasyon enzim miksi kullanımdan hemen önce dondurucudan çıkarılmalı ve buz üzerine yerleştirilmelidir. Kullandıktan sonra enzimler hemen dondurucuya geri koyulmalıdır.

- Buz üzerinde, fragmentasyon, uç onarım (*end-repair*) ve A-ekleme (*A-addition*) karışımı (FERA solüsyonu) Tablo 3.1'e göre hazırlanır. Kısaca santrifüjlenir, 7-8

kez yukarı ve aşağı yönde pipetleyerek vortekslenmeden karıştırılır ve tekrar kısaca santrifüjlenir.

Tablo 3.1. Fragmentasyon, uç onarım (*end-repair*) ve A-ekleme (*A-addition*) için reaksiyon miksi

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
DNA*	Değişken
Fragmentasyon Buffer, 10x	2.5 µl
FERA solüsyonu	0.75 µl
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam	20 µl

Önemli: Tüm reaksiyon işlemleri sırasında reaksiyon tüpleri/plate buz üzerinde tutulmalıdır.

- *Thermal cycler* Tablo 3.2'ye göre programlanarak ilk PCR yapılır.

Tablo 3.2. Fragmentasyon, uç onarım (*end-repair*) ve A-ekleme (*A-addition*)* için PCR koşulları

Adım	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon zamanı (standart DNA)
1	4 °C	1 dk
2	32 °C	24 dk
3	72 °C	30 dk
4	4 °C	Bekleme

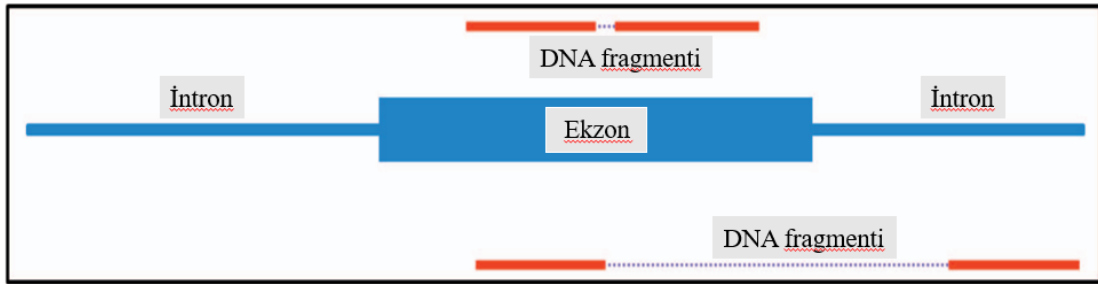
- Plakayı bir *thermal cycler* a yerleştirmeden önce program başlatılır. *Thermal cycler* 4 °C'ye ulaştığında program duraklatılır.

Not: *Thermal cyclers* önceden soğutulmalı ve 4°C'de duraklatılmalıdır.

Hazırlanmış olan plaka önceden soğutulmuş *thermal cyclers* a aktarılır ve PCR programına devam edilir.

- Tamamlandıktan sonra *thermal cyclers* 4 °C sıcaklığa döner.
- 25 µl olan örnekler buza konularak adaptör bağlanması aşamasına geçilir.

Fragmentlerin uzunluğuna göre farklı tip mutasyonları saptayabilme durumları değişebilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Değişik uzunluktaki fragmentlerin lokalizasyonuna göre yerleşimi. Kısa DNA insert uzunluğuna (üstte) sahip fragmentlerin, her iki uç okumasının (kırmızı çubuklar) da ekzon içine düşmesi daha olasıdır. Uzun insert boyutuna sahip fragmentlerin, genellikle intronda meydana gelen bir yeniden düzenlemenin kırık noktasını kapsamaları daha olasıdır (168).

3.3.3.2. Adaptör Bağlanması ve 2. PCR

- DNA ligasyonu için gerekli reaktifler hazırlanır.
 - Ligasyon Tamponu, 5x ve Ligasyon Solüsyonu oda sıcaklığında çözüldükten sonra buz üzerine yerleştirilir.
 - Tüp hafifçe vurularak karıştırılır ve ardından kısaca santrifüjlenir.

Not: DNA Ligaz kullanımdan hemen önce dondurucudan çıkarılmalı ve buz üzerine yerleştirilmelidir. Kullanıldıktan sonra da hemen dondurucuya geri koyulmalıdır.

- Adaptör ligasyon karışımı Tablo 3.3'e göre hazırlanır. Kısaca santrifüjlenir, 10-12 kez yukarı ve aşağı yönde pipetlenerek karıştırılır ve tekrar kısaca santrifüjlenir.

Not: Karıştırmak için yavaşça pipetlenmelidir. Reaksiyon karışımı çok viskozdur. Vortekslenmemelidir.

Tablo 3.3. Adaptör ligasyonu için reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
FERA reaksiyonu (tüpte mevcut olan)	25 µl
Ligasyon Buffer, 5x	10 µl
IL-N7## adaptör	2.8 µl
DNA Ligaz	5 µl
Ligasyon Solüsyonu	7.2 µl
Toplam	50 µl

- Reaksiyonlar Tablo 3.4'e uygun olarak *termal cyclers* da inkübe edilir.

Tablo 3.4. DNA ligasyonu için inkübasyon koşulları

Adım	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon zamanı
1	4 °C	1 dk
2	20 °C	15 dk
3	4 °C	Bekleme

- Çalışma bittiğinde her örneğe 100 µl *QIAseq Bead* eklenir. Birkaç kez yukarı ve aşağı yönde pipetlenerek iyice karıştırılır.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
- Plaka 10 dakika boyunca manyetik bir standı yerleştirilir. Solüsyon temizlendikten sonra, *bead* ler hala manyetik stand üzerindeyken, süpernatant dikkatlice çıkarılır ve atılır.
- *Bead* ler hala manyetik stand üzerindeyken 200 µl % 80 etanol eklenir. Yıkama sonrası sıvısı dikkatlice çıkarılır ve atılır. Etanol ile yıkama tekrarlanır.
- *Bead* ler hala manyetik stand üzerindeyken, oda sıcaklığında 10 dakika havayla kurutulur.

- *Bead* ler manyetik standdan çıkarılır ve 52 µl nükleaz içermeyen su eklenerek *bead* lardan DNA ayrıştırılır. Pipetlenerek iyice karıştırılır.
- Solüsyon temizlenene kadar plaka manyetik standda geri koyulur.
- 50 µl süpernatant temiz plakaya aktarılır.
- Temizleme aşamasını tekrarlamak amacıyla 50 µl *QIAseq Beads* eklenir. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetlenerek iyice karıştırılır. 5 dakika oda sıcaklığında ve 5 dakika manyetik stand üzerinde inkübe edilir.
- Solüsyon berraklaştığında, *bead* ler hala manyetik stand üzerindeyken, süpernatant dikkatlice çıkarılır ve atılır.
- *Bead* ler hala manyetik stand üzerindeyken 200 µl % 80 etanol eklenip bu aşama tekrarlanarak yıkama sonrası solüsyon dikkatlice çıkarılır ve atılır. Bu ikinci yıkamadan sonra tüm etanol kalıntıları tamamen temizlenir ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca havada kurutulur.
- *Bead* ler manyetik standdan çıkarılır ve 12 µl nükleaz içermeyen su eklenerek DNA *bead* lardan ayrıştırılır. Pipetlenerek iyice karıştırılır.
- Solüsyon temizlenene kadar plaka manyetik standda geri koyulur.
- 9.4 µl süpernatant temiz tüplere veya yeni plakaya aktarılır.

3.3.3.3. Hedef Zenginleştirme

- Hedef zenginleştirme için gerekli reaktifler Tablo 3.5'e göre hazırlanır.

Tablo 3.5. Hedef zenginleştirme için reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
“Adaptör ligasyonu”ndan gelen örnek	9.4 µl
TEPCR buffer, 5x	4 µl
QIAseq Targeted DNA Panel	5 µl
IL-Forward primer	0.8 µl
HotStarTaq DNA Polymeraz	0.8 µl
Toplam	20 µl

- *TEPCR Buffer, 5x; QIAseq Targeted DNA Paneli; ve IL-Forward Primer* solüsyonları oda sıcaklığında çözüldükten sonra buza yerleştirilir. Tüp hafifçe sallanarak karıştırılır, ardından kısaca santrifüjlenir.

Not: *HotStarTaq DNA Polimeraz*, kullanımdan hemen önce dondurucudan çıkarılmalı ve buza yerleştirilmelidir. Kullanıldıktan sonra enzim hemen dondurucuya geri koyulmalıdır.

- Karışım uygun şekilde oluşturulduktan sonra 3. PCR yapılır. Bu amaçla Tablo 3.6'daki <1500 primer/tüp içeren RASopati paneli için uygun olan siklus protokolü kullanılarak bir *termal cyclus* programlanır.
- Hedef zenginleştirme reaksiyonu *termal cyclus* a yerleştirilir ve çalışma başlatılır.
- Çalışma bittiğinde her numuneyi 100 µl'ye getirmek için 80 µl nükleaz içermeyen su eklendikten sonra 100 µl *QIAseq Beads* ilave edilir. Birkaç kez yukarı ve aşağı yönde pipetlenerek iyice karıştırılır.
- 5 dk oda sıcaklığında ve 5 dk manyetik standda bekletilip inkübe edildikten sonra süpernatant atılır.

Tablo 3.6. Hedef zenginleştirme için PCR protokolü

Adım	Zaman	Sıcaklık
İlk denatürasyon	13 dk	95 °C
	2 dk	98 °C
8 siklus	15 sn	98 °C
	10 dk	68 °C
1 siklus	5 dk	72 °C
Bekleme	∞	4 °C

- *Bead* ler manyetik stand üzerindeyken 200 µl % 80 etanol eklenir. Yıkama yapılan solüsyon dikkatlice çıkarılır ve atılır. Etanol ile yıkama 2. kez tekrarlandıktan sonra tüm etanol kalıntıları tamamen temizlenir.
- *Bead* ler manyetik stand üzerinde oda sıcaklığında 10 dk boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra *bead* ler manyetik standdan çıkarılır ve 16 µl nükleaz

içermeyen su eklenerek DNA *bead* lerden ayrıştırılır. Pipetlenerek iyice karıştırılır.

- Solüsyon temizlenene kadar plaka manyetik standı geri koyulur. 13.4 µl süpernatant temiz plakaya aktarılır.

3.3.3.4. Amplifikasyon (Evrensel [universal] PCR)

Not: Reaksiyonlar buz üzerinde hazırlanır. Herhangi bir reaktif veya reaksiyon vortekslenmemelidir.

Evrensel PCR için gerekli reaktifler hazırlanır. UPCR Buffer, 5x, oda sıcaklığında çözülür. Tüp hafifçe vurularak karıştırılır ve ardından kısaca santrifüjlenir.

Not: *HotStarTaq DNA Polimeraz*, kullanımdan hemen önce dondurucudan çıkarılmalı ve buza yerleştirilmelidir. Kullandıktan sonra enzim hemen dondurucuya geri koyulmalıdır.

- Evrensel PCR Tablo 3.7'ye göre hazırlanır. Kısaca santrifüjlenir, 7-8 kez yukarı ve aşağı yönde pipetlenerek karıştırılır ve tekrar kısaca santrifüjlenir.

Tablo 3.7. Evrensel PCR için reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
“Hedef zenginleştirme”den gelen örnek	13.4 µl
UPCR buffer, 5x	4 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	1 µl
Nükleaz içermeyen su	1.6 µl
Toplam	20 µl

- Siklus koşulları kullanılarak bir *termal cycler* programlanır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Evrensel PCR için siklus koşulları

Adım	Zaman	Sıcaklık
İlk denatürasyon	13 dk	95 °C
	2 dk	98 °C
20 siklus	15 sn	98 °C
	2 dk	60 °C
1 siklus	5 dk	72 °C
Bekleme	∞	4 °C

- Reaksiyon tamamlandıktan sonra buz üzerine yerleştirilir. Her örneği 100 µl'ye getirmek için 80 µl nükleaz içermeyen su eklenir. 100 µl *QIAseq Beads* eklenir.
- 5 dk oda sıcaklığında, 5 dk manyetik standda inkübe edilip çözelti temizlendikten sonra süpernatant dikkatlice atılır.
- *Bead* ler manyetik stand üzerindeyken 200 µl % 80 etanol eklenir. Yıkama sonrası solüsyonu dikkatlice alınıp atılır.
- Etanol ile yıkama tekrarlanır.
- *Bead* ler hala manyetik stand üzerindeyken, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca havada kurutulur.
- *Bead* ler manyetik standdan çıkarılır ve 30 µl nükleaz içermeyen su eklenerek DNA *bead* lerden ayrıştırılır. Pipetlenerek iyice karıştırılır.
- Çözelti temizlenene kadar plaka manyetik standda geri koyulur.
- 28 µl süpernatant temiz tüplere veya plakaya aktarılır.

3.3.4. Kütüphane Kuantifikasyonu

Hazırlanan kütüphanenin kantifikasyonu, QIAseq Library Quant Assay Kiti kullanılarak Real Time PCR (Rotor Gene) cihazında gerçekleştirilir.

- ILMN DNA standardı buz üzerinde eritilir.
- ILMN DNA standardı 5 seri dilüsyonla seyreltilir (Tablo 3.9). ILMN standart dilüsyonu için 5 tüp hazırlandıktan sonra her tüpe 45 µl dilüsyon buffer eklenir. İlk tüpe ILMN standardından alınan 5 µl eklenip pipetaj yapılarak karıştırılır.

Sonrasında ilk tüpten alınan 5 µl solüsyon 2. tüpe aktarılır, ardından aynı işlemler sırasıyla diğer tüpler için de tekrarlanır.

Tablo 3.9. ILMN standardının seyreltilmesi

Standart	Illumina DNA standardı	Dilüsyon Buffer
Std1	5 µl dilüe edilmemiş	45 µl
Std2	5 µl Std1	45 µl
Std3	5 µl Std2	45 µl
Std4	5 µl Std3	45 µl
Std5	5 µl Std4	45 µl

- Kütüphane örnekleri için 1:50, 1:5000, 1:50000 olmak üzere 3 dilüsyon hazırlanır (Tablo 3.10).

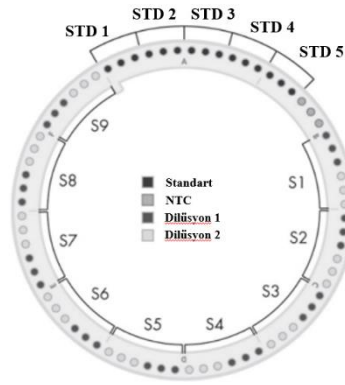
Tablo 3.10. Kütüphane örneklerinin dilüsyonu

Dilüsyon	Kütüphane	Dilüsyon Buffer
Dilüsyon 1 (1:50)	1 µl	49 µl
Dilüsyon 2 (1:5000)	1 µl (1:50)	99 µl
Dilüsyon 3 (1:50000)	4 µl (1:5000)	36 µl

- PCR karışımı SYBR Green ROX FAST mastermix aşağıdaki tablodaki oranlara göre (1 örnek için) hazırlanır (Tablo 3.11). Bunun için SYBR Green ROX FAST mastermix 10-15 sn santrifüj yapılır. 5 standart ve 1 NTC (non-template kontrol) için üçer kopya hazırlanır. Her örneğin (1:5000) ve (1:50000) dilüsyonlarından birer kopya Rotor Gene tüplerine doldurulur.
- Tüplere 17,5 µl PCR karışımı dağıtılır ve her bir tüpe 2,5 µl dilue standartlardan (3'er tekrar) sırasıyla eklenir. Ardından NTC 3 tekrar eklenir. Dilue edilen kütüphaneler (1:5000 ve 1:50000) sırasıyla eklenir ve Real-Time PCR (Rotor Gene) cihazına yüklenir (Şekil 3.2).

Tablo 3.11. PCR karışımının hazırlanması

İçerik	Rotor disk 72
RNAz/DNAz içermeyen su	6,7 µl
SYBR Green ROX FAST Mastermix	0,8 µl
Primer mix (10 µM)	10 µl
Template (Standart veya kütüphane)	2.5 µl
Toplam hacim	20 µl



Şekil 3.2. *QIAseq Library Quant Assay Kit* düzeni (Rotor 72)

- Real time PCR cihazı (Rotor Gene) aşağıdaki döngüde kurulur ve 30 siklus sonunda floresan ışına için veri toplanır (Tablo 3.12).

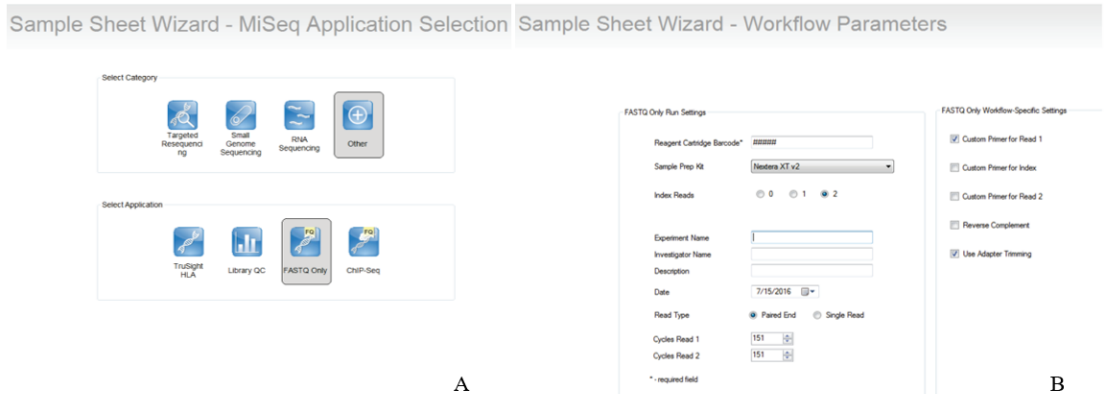
Tablo 3.12. Real time PCR döngüsü

Siklus	Süre	Sıcaklık	Yorum
1	10 dk	95°C	HotStarTaq DNA polimeraz bu ısıtma adımında aktive olur.
30	15 sn 5 sn 5 sn 60 sn	95°C 68°C 65°C 60°C	Floresan veri toplanması yapılır.

- PCR döngüsü bittikten sonra *Cycle Threshold* (CT) değerleri 'Illumina Data Analiz Programı_72'lik rotor disk için' Excel programına yüklenir.

3.3.5. Hazırlanan Ortak Kütüphanenin *MiSeq* Cihazına Yüklenmesi

- Dilüsyona başlamadan önce *Illumina Experiment Manager* kullanılarak *SampleSheet* hazırlanır.
- Kütüphane konsantrasyonları nükleaz içermeyen su kullanılarak 4 nanomolar (nM)'a dilüe edilir.
- Her örnekten 1.5 µl alınarak tek bir tüpte ortak kütüphane (*megapool*) oluşturulur.
- Kütüphanenin denatürasyonu için, 1N stok NaOH, nükleaz içermeyen su ile dilüe edilerek 0,2 N NaOH hazırlanır.
- 5 µl ortak kütüphane tüpünden ve 5 µl 0,2 N NaOH'den alınıp pipetajla karıştırıldıktan sonra denatüre olması için oda sıcaklığında 5 dk bırakılır.
- 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 990 µl Hibridizasyon buffer eklenir.
- 5 dk dolduktan sonra içerisine oluşturulmuş 10 µl örnek eklenerek 20 pM'de 1000 µl kütüphane hazırlanmış olur.
- Kullanılan kartuşa ve kütüphaneye göre örneklerin dilüsyonuna devam edilir (v2 için 12pM, v3 için 15pM-20pM yapılmalıdır).
- Yeni bir 1,5 ml'lik ependorf tüpü *Forward primer* olarak etiketlenir. Bu tüpe 597 µl Hibridizasyon Buffer (HT1) eklendikten sonra üzerine *Qiaseq A Read1 Custom Primer* den 3 µl eklenir. Her iki tüp de yüklenişe kadar soğuk blok üzerinde bekletilir.
- Kütüphane yüklenmesi aşamasında, kartuşun 17. pozisyondaki kuyucuğa 600 µl kütüphane örnekleri ve 18. kuyucuğa 600 µl *Forward primer* olarak hazırlanan tüpten 600 µl alınarak yükleme yapılır. Kartuş tanıtarak *Miseq* cihazında dizileme işlemi başlatılır (Şekil 3.3).



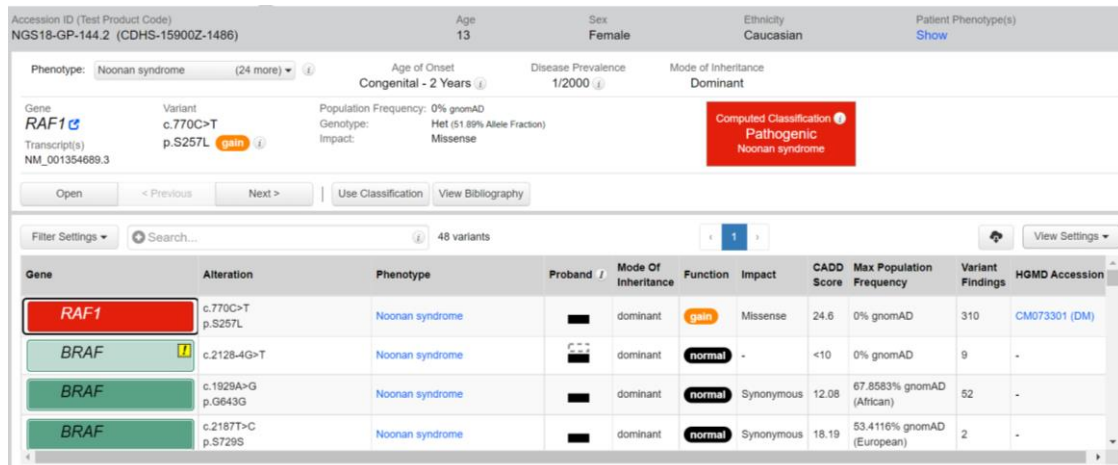
Şekil 3.3. *MiSeq* cihazındaki *Illumina Experiment Manager* yazılımında iş akış parametreleri

3.3.6. Ham Datadan Veri Analizi

MiSeq cihazından FASTQ formatında elde edilen ham veriler *QCI Analyze* programına yüklenir, kalite kontrolü yapıp referans genom dizisine göre hizalanarak BAM (*Binary Alignment Map*) dosyasına dönüştürülür. İlgili varyantlar çağrılarak VCF (*Variant Calling Format*) dosyası hazır hale getirilir, filtreleme ve anotasyon aşamasından sonra *Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret* yazılımına aktarılır ve varyantlar yorumlanarak sonuçlar raporlanmaya hazır hale getirilir (Şekil 3.3).

Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret yazılımında gen transkriptleri ‘Ensembl’ ve ‘RefSeq’ veritabanlarından, protein izoform ve domain bilgileri ‘UniProt’ veritabanından elde edilmiştir. Varyantların yazımı için *Human Genome Variation Society* kılavuzu temel alınmıştır.

Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret yazılımındaki varyantların patojenitesi ACMG/AMP (*American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology*) tarafından yayınlanan varyantların sınıflandırma kılavuzlarına göre değerlendirilmiştir (177, 178). Ek olarak varyant yorumlamada *Franklin Genoox* ve *VarSome* araçlarının tahmin sonuçlarından yararlanılmıştır. Varyantların etkilerini değerlendirmek için *CADD*, *PolyPhen*, *SIFT*, *MutationTaster*, *BLOSUM*, *PhyloP*, *MaxEntScan*, *GeneSplicer*, *B-SIFT* ve *QCI Inferred Activation in silico* tahmin araçlarından yararlanılmıştır. Tüm bu araçlar kullanılarak sınıflanan varyantlar aile segregasyon analizleriyle ve klinik bulgularla birlikte değerlendirilmiş ve klinikle ilişkili olan hastalık yapıcı varyantlar raporlanmıştır (Şekil 3.4).



Accession ID (Test Product Code)
NGS18-GP-144.2 (CDHS-15900Z-1486)

Age 13 Sex Female Ethnicity Caucasian Patient Phenotype(s) Show

Phenotype: Noonan syndrome (24 more) Age of Onset Congenital - 2 Years Disease Prevalence 1/2000 Mode of Inheritance Dominant

Gene **RAF1** Variant c.770C>T p.S257L Population Frequency: 0% gnomAD Genotype: Het (51.89% Allele Fraction) Impact: Missense Computed Classification Pathogenic Noonan syndrome

Transcript(s) NM_001354689.3

Open < Previous Next > Use Classification View Bibliography

Filter Settings Search... 48 variants 1 View Settings

Gene	Alteration	Phenotype	Proband	Mode Of Inheritance	Function	Impact	CADD Score	Max Population Frequency	Variant Findings	HGMD Accession
RAF1	c.770C>T p.S257L	Noonan syndrome	■	dominant	gain	Missense	24.6	0% gnomAD	310	CM073301 (DM)
BRAF	c.2128-4G>T	Noonan syndrome	■	dominant	normal	-	<10	0% gnomAD	9	-
BRAF	c.1929A>G p.G643G	Noonan syndrome	■	dominant	normal	Synonymous	12.08	67.8583% gnomAD (African)	52	-
BRAF	c.2187T>C p.S729S	Noonan syndrome	■	dominant	normal	Synonymous	18.19	53.4116% gnomAD (European)	2	-

Şekil 3.4. Olgu 53'ün *Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret* yazılımındaki varyant listesi

3.3.7. Sanger Dizileme

Raporlanan varyanlar için doğrulama amacıyla farklı bir dizileme yöntemi olan Sanger dizileme tercih edilmiştir.

- Sanger dizileme yapılacak olan bölgeye uygun primer dizaynı yapıldıktan sonra PCR tekniği ile bu bölge amplifiye edilir.
- Elde edilen PCR ürünün baz uzunluk boyu % 2'lik agaroz jel elektroforez ile kontrol edilir.
- *ExoSap* enzimi (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, katalog no: *EF0651*) ile ortamda bulunan primer ve nükleotidlerin enzimatik hidrolizi yapılır.
- Bölgeye uygun olan *forward* veya *reverse* primeri seçildikten sonra *BigDye* enzimiyle (*BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, Katalog no:4336911) floresanlı nükleotidlerin dizilenmesi sağlanır.
- Elde edilen ürün *CLEANNA CleanDTR* (Katalog No: *CDTR-0005*) kullanılarak manyetik *bead* (boncuk) ile pürifikasyonu yapılır.
- *Applied Biosystems AB3500 Genetic Analyzer* cihazı ile dizileme yapılır.
- Elde edilen sonuçlar *NCBI GenBank* veritabanından alınan referans gen dizisi ile karşılaştırılıp *Mutation Surveyor* programı ile analiz edilir. Bu program ile ilgili gen dizisinde bir mutasyon veya değişimin olup olmadığı tespit edilir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, patojenik, muhtemel patojenik ve klinik korelasyon sonrasında hastalık sebebi olduğu düşünülmüş, VUS (klinik önemi bilinmeyen) olarak sınıflandırılmış varyantlar değerlendirilmiştir.

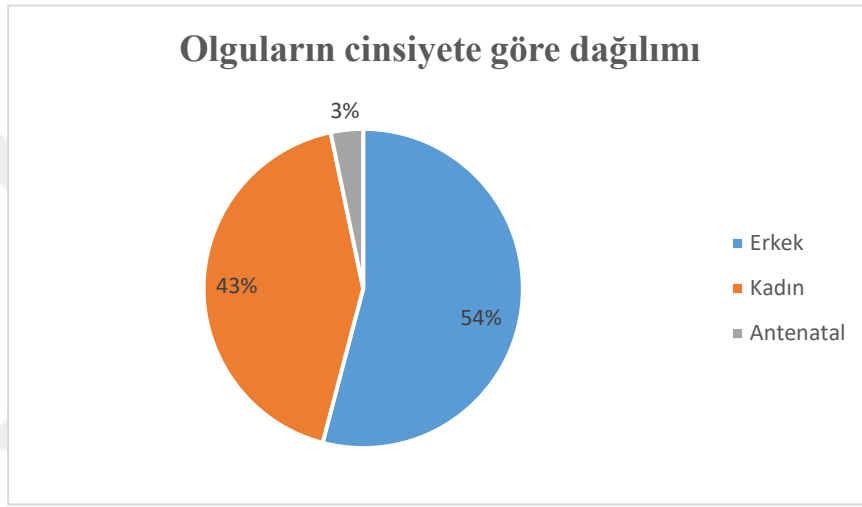
Çalışmada olgulardan elde edilen demografik, klinik ve moleküler veriler, Microsoft Excel programında medyan, ortalama, sıklık ve oran gibi tanımlayıcı istatistiksel metodlar kullanılarak analiz edilmiştir. Tablolar ve grafikler yüzde cinsinden hesaplanarak oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

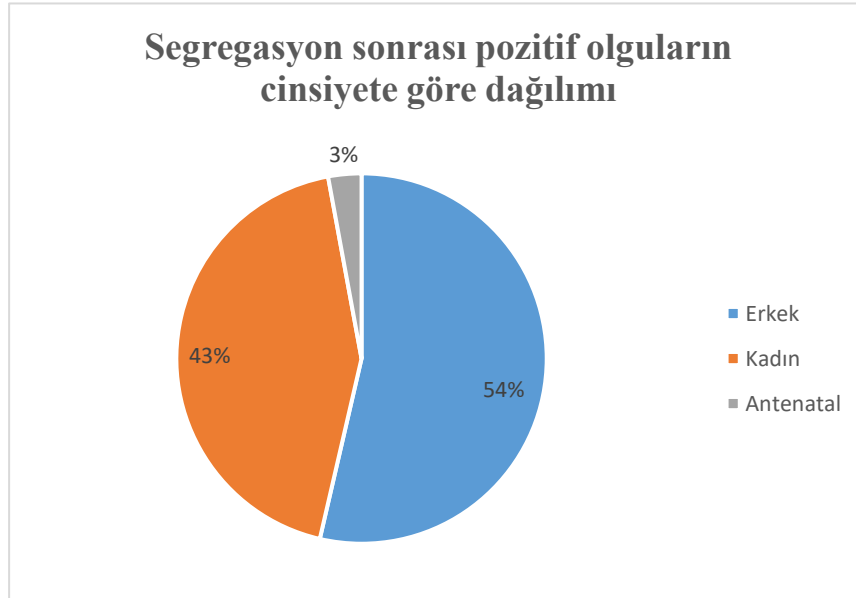
2016-2021 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran ve RASopati moleküler tanısı almış 61 olgu çalışmaya alınmıştır. Çalışma kapsamında bu olguların segregasyon analizi sonucunda moleküler tanı almış aile üyeleri de dahil edilerek toplamda 69 olgu değerlendirilmiştir.

4.1. Olguların Demografik Verileri

61 olgunun 26 tanesi kadın, 33 tanesi erkek, 2 tanesi antenatal olup cinsiyetleri bilinmemektedir (Şekil 4.1). Pozitif aile bireyleri de dahil edildiğinde 69 olgunun 37 tanesinin erkek, 30 tanesinin kadın ve 2 tanesinin antenatal olduğu belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. 61 olgunun cinsiyete göre dağılımı



Şekil 4.2. Pozitif aile bireyleri dahil edildiğinde olguların cinsiyete göre dağılımı

61 olgunun yaş ortalaması 14.3 olarak hesaplanmıştır.

Kadın olguların yaş ortalaması 16.4, erkek olguların yaş ortalaması 13.5 yıl olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

NF1 geninde varyant taşıyan olguların yaş ortalaması 17.4 iken *NF1* dışındaki genlerde varyant taşıyan olguların yaş ortalaması 7.4 yıl olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

PTPN11 geninde varyant saptanan olguların yaş ortalaması 9.7 yıl olarak saptanmıştır.

Tablo 4.1. Olguların yaş ortalaması

Kadın	16,4	<i>NF1</i>	17,4
Erkek	13,5	<i>NF1</i> dışındaki genler	7,4

4.2. Olguların Klinik Verileri

4.2.1. *NF1* Geninde Varyant Saptanan Olguların Değerlendirilmesi

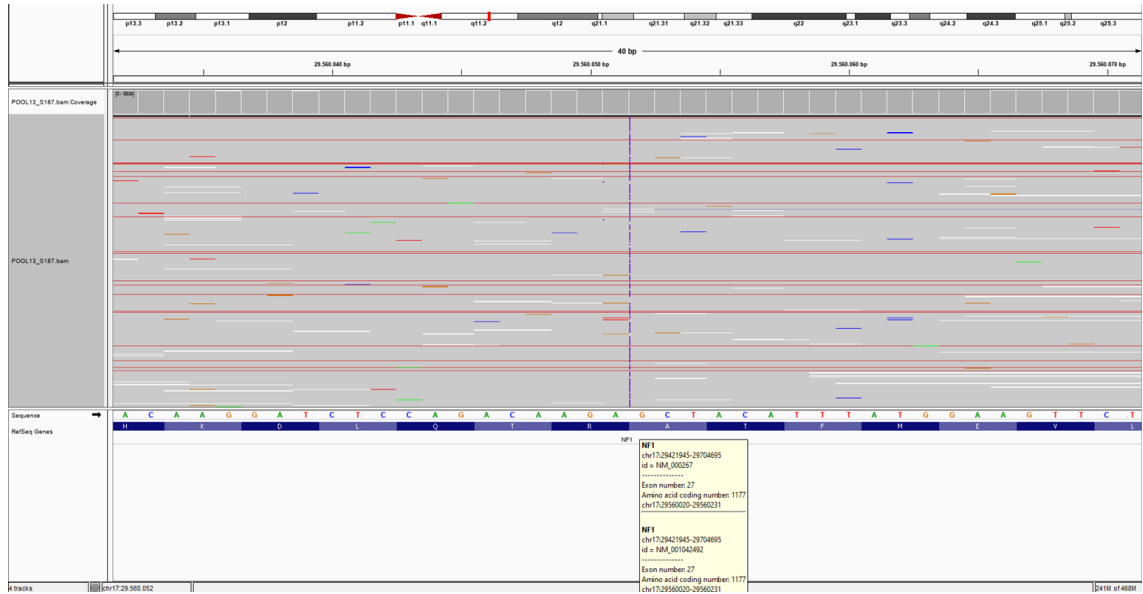
Olgu 1

34 yaş kadın olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Olgunun annesinin 6 gebeliği olmuştu (G6P6). Ebeveynlerde *NF1* lehine herhangi bir klinik bulgudan bahsedilmemiş olmasına rağmen 4 kız kardeşinde de CALM ve bir kız kardeşinde epilepsi öyküsü mevcuttu. Hidrosefali nedeniyle şant operasyonu olmuştu. CALM, aksiller ve inguinal bölgede çillenmesi ve nörofibromu bulunmaktaydı. Göz muayenesinde Lisch nodülleri izlenmişti ve bilateral optik sinirler tortüöz yapıdaydı. Kranial MRG'de bilateral paryetal periventriküler beyaz cevherde T2A sekansta hiperintens gliotik sinyal değişiklikleri saptandı. Çekilen ekokardiyografi (EKO)'de normal sol ventrikül sistolik fonksiyonu (NSVSF), 1-2. derece mitral yetmezlik (MY), 1. derece aort yetmezliği (AY), 1. derece triküspit yetmezliği (TY) olduğu öğrenildi. Olgudan çalışılan RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.3529dup (p.A1177fs*18) heterozigot, muhtemel patojenik (LP) varyantı saptandı. Saptanan bu varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Olgunun 2 çocuğunda da cilt bulguları olması üzerine

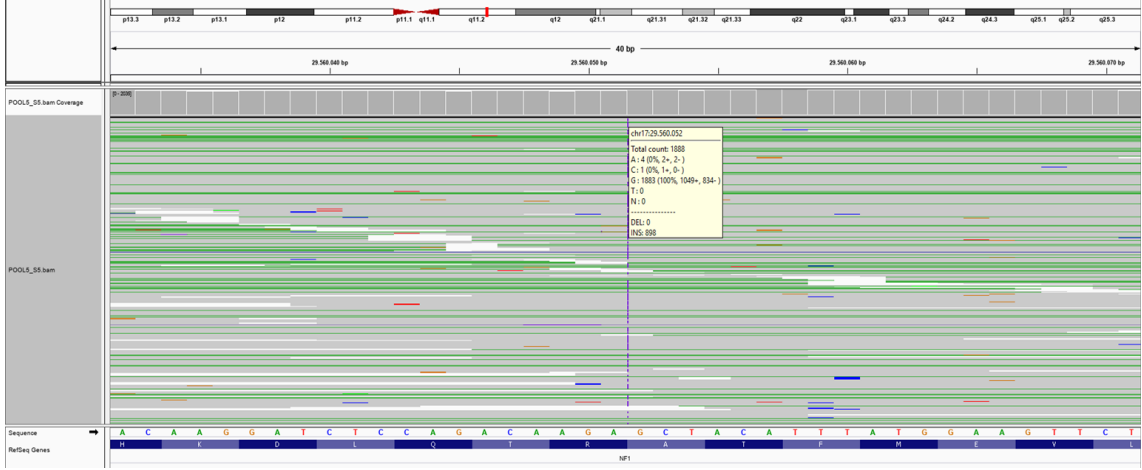
çocuklarda çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda ikisinde de aynı varyant Sanger dizileme yöntemiyle saptandı (Şekil 4.3, şekil 4.4).

Olgu 1'in oğlu 3 yaş 4 aylıkken muayene edilmişti. Postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu ve intertriginöz çillenme izlenmişti. Fizik muayenesinde Lisch nodülü saptandı, ancak skolyoz gözlenmemiştir. Psikomotor gelişim basamaklarında gecikme ve hiperaktivite mevcuttu.

Olgu 1'in kızı 5 yaş 10 aylık iken değerlendirilmiş olup postnatal dönemden itibaren CALM vardı ve muayenede intertriginöz çillenme izlenmişti. Fizik muayenede skolyoz saptanmadı. Psikomotor gelişimi yaşıtlarıyla uyumluydu.



Şekil 4.3. Olgu 1'in kızınının Sanger dizileme sonucunun *Integrative Genomics Viewer* (IGV) görüntüsü



Şekil 4.4. Olgu 1'in oğlunun Sanger dizileme sonucunun IGV görüntüsü

Olgu 2

15 yaş 1 aylık erkek olgu, aralarında akrabalık olmayan 39 yaşında anne ve 51 yaşında babanın 2. çocuklarıydı (G2P2). Olgunun babasında hipopigmente lezyonlar mevcuttu. Olguda postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu. Çillenme olup olmadığı bildirilmemişti. Göz muayenesinde fundus muayenesi normal saptanmış olup optik gliomu bulunmamaktaydı, ancak bilateral Lisch nodülü izlenmişti. Nöromotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumluydu. Bir dönem hiperaktivite için tedavi almıştı, ancak tedavi kesilmişti. Kraniyal MRG'de bilateral globus palliduslarda, talamusta ve bilateral hipokampusta T2 ve FLAIR sekanslarda diffüzyon artışı gösteren intens lezyonlar ve korpus kallozum normalden kalın izlenmişti. Tüm abdomen ultrasonografisi (USG) normal saptanmıştı. Olgudan çalışılan panel test sonucunda *NF1* geninde c.4725-2A>G heterozigot, patojenik (P) varyantı saptandı. Bu varyant Sanger dizileme ile doğrulandı. Olgunun ebeveynlerinden Sanger yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı.

Olgu 3

Olgumuz aralarında akrabalık olmayan 32 yaşında anne ve 42 yaşında babanın 11 yaş 7 aylık erkek çocuklarıydı. Annenin 3 gebeliğinden olan 2. çocuğuydu (G3P3). Olgunun babasında klinik olarak NF1 tanısı olduğu öğrenildi. Ayrıca 15 yaşında olan erkek kardeşinde sağ uyluk ön bölgede 4×8 cm boyutta CALM ve 1 yaş 6 aylık erkek

kardeşinde sol ön kolda 2×0.5 cm boyutta CALM gözlendi. Olgunun fizik muayenesinde 6 aylıkken başlangıç göstermiş multipl CALM izlendi. Ayrıca intertriginöz çillenmesi mevcuttu. Görme problemi ve Lisch nodülü olmadığı öğrenildi. Nöromotor gelişim basamakları yaşlılarıyla uyumluydu. Kraniyal MRG'de bilateral dentat nükleuslarda, brakium pontiste, bilateral serebral pedinkülde, beyin sapında, hipokampuslarda ve bilateral globus palliduslarda T2-FLAIR intens ve difüzyon artışı gösteren odaklar bulunmaktaydı. Çekilen EKO ile tüm abdomen ve renal USG normal saptanmıştı. Sınırdan boy kısalığı (-2.03 standart deviasyon [SDS]) vardı. RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.4084C>T (p.R1362*) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanarak NF1 tanısı kesinleştirildi. Anneden istenen tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlanırken babada aynı varyant saptandı. Olgunun 2 kardeşinden Sanger yöntemiyle tek nokta mutasyon analizi istenmesi planlandı.

Olgu 3'ün babası 42 yaşındaydı, ebeveynleri arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu ve aile öyküsü bulunmamaktaydı. Fizik muayenesinde nörofibrom, sol lomber bölgede minimal skolyoz izlenmişti. Kraniyal MRG'de sol pariyetal kemikte 4 mm boyutta T1-T2 hipointens görünüm izlenmiş olup nörofibrom lehine yorumlandı. Çekilen toraks bilgisayarlı tomografi (BT)'de anterior mediastendeki yağlı doku içerisinde dansite artışları gözlenmiş, rezidü timus dokusu şüphesi uyandırmıştı. Her iki akciğer apekte sekel fibrotik değişiklikler ve sol akciğer apeks düzeyinde nispeten homojen kontrast tutulumu gösteren düzgün sınırlı yer kaplayıcı lezyon izlenmişti. Benzer şekilde görüntüler dahilinde göğüs duvarında ve anterior abdominal duvarlarda çok sayıda homojen dansitede, düzgün sınırlı, pleksiform nörofibrom oldukları düşünülen lezyonlar mevcuttu. Çekilen EKO'da mitral kapak prolapsusu (MVP) gözlendi. Sanger yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda probanddaki varyant babada da saptandı.

Olgu 4

10 yaş 7 aylık erkek olgu aralarında akrabalık olmayan 65 yaşında baba ve 51 yaşında annenin tek çocuklarıydı (G1P1). Ailede benzer öykü bulunmamaktaydı. Olgunun 6 aylıkken başlayan multipl CALM ve intertriginöz çillenmesi mevcuttu. Göz muayenesinde bilateral Lisch nodülü izlenmişti. Nöromotor gelişim basamakları yaşlılarına göre hafif geriden seyretmişti. Olgunun okul başarısının orta derece olduğu

öğrenildi. Orbita MRG görüntülemesinde sol optik sinirde infraorbital seviyede sağ ile kıyaslandığında hafif kalınlaşma gözlenmişti. Kranial MRG’de bilateral talamusta internal kapsül posterior bacağına, globus palliduslarda, bilateral hipokampusta ve bilateral dentat nükleuslarda diffüzyon artışı gösteren T2 FLAIR intens hamartomatöz lezyonlar izlendi. Tüm abdomen USG normal saptanmıştı. RASopati panel testi sonucunda *NF1* geninde c.2352G>C (p.W784C) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleşti.

Olgu 5

29 yaşında erkek olgunun ebeveynleri arasında akrabalık olmadığı öğrenildi. Olgumuz 60 yaşındaki annenin 7 gebeliğinden olan 3. çocuklarıydı (G7P7). 65 yaşında olan babada multipl CALM mevcuttu. 25 yaşındaki kız kardeşinde ve 17 yaşındaki erkek kardeşinde CALM olduğu öğrenildi. Olguda multipl CALM, aksiller bölgede ve avuç içlerinde çillenme ve yüzde, kollarda yaygın nörofibromlar saptandı. İrişte bilateral Lisch nodülü, sol gözde pitozis ve bilateral yukarı çekik palpebral fissürleri mevcuttu. Fizik muayenesinde skolyoz ve bilateral ayak 2. ve 3. parmakları arasında kutanöz sindaktili izlendi. Kranial MRG’de sol frontal bölgede skalpta ciltaltı yağlı doku içerisinde fibrotik marjinali 3 adet nodüler lezyon ve sağ frontal subkortikal beyaz cevherde silik kontürlü 1 cm’den küçük, T2-FLAIR sekanslarda hiperintens nodüler odak saptandı. Orbita MRG’de sol gözde preseptal alanda pleksiform nörofibromlar ve sol preorbital alanda heterojen kalınlaşma izlendi. *NF1* geninde c.2498_2501del (p.S833Yfs*7) heterozigot, LP varyantının saptanmasıyla moleküler tanı NF1 olarak doğrulandı. Ayrıca saptanan varyant Sanger yöntemiyle doğrulandı.

Olgu 6

3 yaş 4 aylık erkek olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Baba 39 yaşında ve anne 37 yaşındaydı. Olgumuz annenin 2 gebeliğinden olan 2. çocuğuydu (G2P2). Aile öyküsünde herhangi özellik mevcut değildi. Postnatal dönemden itibaren multipl CALM, aksiller ve inguinal bölgede çillenmesi mevcuttu. Rölatif makrosefali (86 persantil [p], +1.1 SDS), sağ ayakta parmak pozisyon anomalisi, dudakta belirgin *cupid’s bow* izlendi. Göz muayenesinde herhangi bulgu saptanmamış olup Lisch nodülü gözlenmedi. Nöromotor gelişim basamaklarında hafif gecikme mevcuttu.

Kraniyal MRG'de bilateral talamusta, globus palliduslarda, serebral pedinküllerde, serebellumda dentat nükleuslarda bazal sisterna komşuluğundaki beyin parankiminde difüzyon artışı gösteren, postkontrast çalışmada kontrast tutulumu göstermeyen multipl hamartomatöz lezyonlar izlendi. NGS yöntemiyle çalışılan RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.795del (p.V266Ffs*15) heterozigot, muhtemel patojenik (LP) varyantı saptandı. Ebeveynlerden istenen tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı.

Olgu 7

39 yaşında kadın olgunun ebeveynleri aynı küçük yerleşim birimindendi. Olgunun babasında CALM ve kutanöz nörofibromlar mevcut olup lösemi nedeniyle eksitus olmuştu. 60 yaşındaki annenin 2 gebeliği olmuştu (G2P2), olgunun kardeşinde herhangi pozitif bulgu izlenmemişti. Olgunun tek gebeliğinden olan 5 yaşında sağlıklı bir kızı vardı. Olgunun fizik muayenesinde CALM, intertriginöz çillenme, kutanöz ve pleksiform nörofibrom mevcuttu. Kranial MRG'de sol talamusta temporal loba uzanım gösteren FLAIR sekansta hiperintens hamartomatöz olduğu düşünülen şüpheli görünüm izlendi. Ayrıca MRG kesitlerinde ciltte ensede nörofibroma ait görünümler saptandı. Olguda *NF1* geninde c.2850G>T (p.Q950H) heterozigot, LP varyantı saptandı. Varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı.

Olgu 8

15 yaş 1 aylık erkek olgunun ebeveynleri yakın yerleşim birimindendi. Baba 43, anne 42 yaşındaydı. 4 gebeliği olan annede (G4P4) ve olgunun 3 kardeşinde CALM mevcuttu. Olgunun fizik muayenesinde en büyüğü 8×8 cm boyutta multipl CALM, sırt ile yüzde çillenme ve bilateral Lisch nodülü saptandı. Kranial MRG'de bilateral globus palliduslarda, her iki talamusta, bilateral hipokampuslarda ve bilateral dentat nükleuslarda T2 ve FLAIR sekansta hiperintens hamartomatöz lezyonlar ve korpus kallozum normalden kalın izlenmişti. Ayrıca retroserebellar bölgede 2 cm genişlikte diffüzyon artışı gösteren araknoid kist mevcuttu. Renal USG'de dalak hilusunda 2 cm çapında dalak ile eş ekojenitede aksesuar dalak saptandı. *NF1* geninde c.2850G>T (p.Q950H) heterozigot, LP varyantı saptanan olgunun (Şekil 4.5) babasından istenen

Sanger dizileme tek nokta analizi normal sonuçlanırken annesinden ve kardeşlerinden de istenmesi planlandı. Olguda saptanan varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı.



Şekil 4.5. Olgu 8'in BAM formatında *forward* dizi NGS analiz görüntüsü (NF1)

Olgu 9

18 yaş 1 aylık kız olgunun 40 yaşındaki annesi ve 54 yaşındaki babası arasında 1. dereceden kuzen evliliği mevcuttu. Olgumuz annenin 5 gebeliğinden 2. çocuğuydu (G5P4). Olgunun babasında ve halasında CALM mevcuttu. Olgunun 21, 10 ve 5 yaşlarındaki 3 kardeşinde birer adet CALM vardı. Olguda postnatal dönemden itibaren multipl CALM, yüzde ve aksiller bölgede çillenme mevcuttu. Ayrıca muayenede nörofibrom saptandı. Ders başarısı normal aralıkta olup öğrenme güçlüğü gözlenmedi. Kraniyal MRG normal sonuçlandı. *NF1* geninde c.4522C>G (p.H1508D) heterozigot LP varyantı saptandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Olgu 9'un BAM formatında *forward* dizi NGS analiz görüntüsü (NF1)

Olgu 10

9 yaş 11 aylık kız olgunun ebeveynleri arasında 2. derece kuzen evliliği mevcuttu. Baba klinik olarak tanı aldığı NF1'e bağlı beyin tümörü nedeniyle eksitus olmuştu. Olgumuz 41 yaşındaki annenin 4 gebeliğinden 4. çocuğuydu (G4P4). Olguda sayıca 20'den fazla CALM mevcuttu. İntertriginöz çillenme veya nörofibrom saptanmadı. Torakal bölgede açıklığı sola bakan hafif skolyoz izlendi. Muayenede sol iriste 1 adet Lisch nodülü saptandı. Hafif öğrenme güçlüğü (statik psikomotor gerilik) mevcuttu. Kraniyal MRG'de bilateral serebral pedinküllerde, bilateral globus palliduslarda, talamus posterior kesimlerinde, hipokampuslarda, dentat nükleuslarda, solda brakium pontiste ve pons'ta T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens hamartomatöz lezyonlar izlendi, korpus kallozum normalden kalın olarak saptandı. Torakal vertebral MRG'de T12-L1 düzeylerinde sağ paravertebral alanda kas doku içerisinde T2 sekansta hiperintens lezyon izlenmiş olup nörofibrom lehine değerlendirildi. Renal USG'de sol böbrek orta zonda parankimal bant görünümü çift toplayıcı sistem açısından anlamlı olarak değerlendirildi. EKO'da santral jetli minimal mitral yetersizlik (MY) gözlemlendi. Olguda *NF1* geninde c.1885G>A (p.G629R) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Sanger yöntemiyle bu varyant doğrulandı.

Olgunun 14 yaş 8 aylık erkek kardeşinde multipl (>25 adet) CALM ve 3 adet nörofibromu mevcuttu, ancak intertriginöz çillenme bulunmamaktaydı. Göz muayenesinde bilateral Lisch nodülleri saptandı. Hafif öğrenme güçlüğü mevcuttu. Tartısı yaşitlarına göre geriden seyretmekteydi (-2.27 SDS) ve boyu kısaydı (-2.35 SDS). 17 yaşındaki erkek kardeşinde de NF1 açısından destekleyici bulgular olduğundan iki kardeşten Sanger yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda aynı varyant heterozigot olarak saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 11

3 yaş 2 aylık erkek olgu, 27 yaşında baba ve 26 yaşında annenin tek gebeliğinden olan çocuklarıydı (G1P1). Olgunun CALM, intertriginöz çillenmesi ve Lisch nodülü mevcuttu; ancak nörofibromu yoktu. İzole konuşmada gecikme mevcuttu ve kontrol muayenesinde 4 yaş 6 aylıkken en fazla 2 kelimelik cümlesi vardı, verilen komutları algılaması normal olarak değerlendirildi. Yapılan BAEP (*Brainstem Auditory Evoked*

Potentials) testinde beyin sapı işitsel yollarda bilateral normal ileti saptanmıştı. Muayenede skolyoz izlendi. Kraniyal MRG'de sağ serebral hemisfer ve her iki serebellar hemisfer derin beyaz cevherde T2A ve FLAIR sekanslarda hiperintens kontrast tutmayan odaklar mevcut olup NF açısından anlamlı olarak değerlendirildi. Vertebra MRG'de torakal düzeyde hidrosiringomyeli bulguları gözlemlendi. Tüm vücutta kasılma ve gözlerde kayma şeklinde nöbeti olmaktadır. Ancak çekilen elektroensefalografi (EEG) normal sonuçlandı. Orbita MRG'de bilateral optik sinirde minimal tortiyoz görünüme ve minimal kalınlık artışı izlenmesi nedeniyle istenen VEP (Görsel Uyandırılmış Potansiyeller) testinde ön görsel yollarda bilateral normal ileti saptandı. EKO'da hafif PS mevcuttu. Çalışılan RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.6950G>A (p.W2317*) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Olguda saptanan varyant Sanger yöntemiyle doğrulandı, ayrıca ebeveynlerden istenen tek nokta mutasyon analizi sonucunda babada aynı varyant heterozigot olarak saptandı.

Olgu 12

5 yaşında kız olgu, aralarında akrabalık olmayan 30 yaşında baba ve 25 yaşında annenin 2 gebeliğinden olan ilk çocuklarıydı (G2P3). Olgunun annesinde, 3 dayısında ve kız kardeşinde CALM olduğu öğrenildi. Olguda postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu. Nöromotor gelişim basamakları yaşlılarıyla uyumluydu. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.4577+2dup heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptandı. Bu varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı ve ebeveynlerden yapılan segregasyon analizi sonucunda annede aynı varyant raporlandı. Olgunun monozigotik ikiz olan kardeşlerinden biri preterm doğum eylemi nedeniyle akciğer yetmezliği sonrasında eksitus olmuştu.

Olgu 13

8 aylık Suriye kökenli erkek olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Baba 45 yaşında, anne 50 yaşındaydı. Olgumuz annenin 3 gebeliğinden olan 3. çocuğuydu. Fizik muayenesinde multipl CALM mevcuttu, tartısı ve boyu yaşlılarına göre geriden seyretmekteydi (sırasıyla -3.76 SDS ve -2.38 SDS). Kaba yüz görünümü, bitemporal darlık, basık burun kökü, uzun filtrum, mikrognati ve düşük kulaklar izlendi. Nöromotor gelişim basamaklarında yaşlılarına göre gecikme mevcuttu

ve henüz başını tutamıyordu. Yenidoğan döneminde hipokalsemi ve hipoglisemi saptanmış, buna bağlı olduğu düşünülen nöbet öyküsü mevcuttu. Kraniyal MRG’de T2 ve FLAIR sekanslarda bilateral paryetooksipital bölgede kortikal ve subkortikal sinyal artışları, aynı bölgede sağda difüzyon kısıtlaması ve sağ talamus posteriorunda difüzyon artışı gösteren odak izlendi. Tüm batın USG’de bilateral böbrek renal pelvisi ve kaliksleri minimal belirgin saptandı. RASopati panel testi sonucunda *NF1* geninde c.2540T>C (p.L847P) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Olguda Noonan benzeri dismorfik bulguları olduğundan tanı Nörofibromatozis-Noonan sendromu olarak kesinleştirildi.

Olgu 14

12 yaş 1 aylık erkek olgu yakın yerleşim biriminden 39 yaşında baba ve 31 yaşında annenin 3 gebeliğinden 2. çocuğuydu (G3P3). *NF1* açısından ailede herhangi özellik bulunmamaktaydı. Olguda postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu, intertriginöz çillenme izlendi; ancak nörofibrom saptanmadı. Lomber bölgede açıklığı sağa bakan minimal skolyoz mevcuttu. Olgunun ders başarısının orta düzey olduğu öğrenildi. Kraniyal MRG’de dentat nükleus, sağ brakium pontis, talamuslar, serebral pedinkül, bilateral hipokampus ve sol globus pallidusta difüzyon artışı gösteren T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens odaklar izlendi. Moleküler analiz sonucunda *NF1* geninde c.248A>C (p. Q83P) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak *NF1* tanısı kesinleşti.

Olgu 15

10 yaş 4 aylık erkek olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. 43 yaşındaki annenin tek gebeliğinden olan tek çocuğuydu (G1P1). 46 yaşındaki babada nörofibrom, çillenme ve CALM mevcuttu. Ayrıca 2 amcada ve babanın babasında cilt lezyonları bulunduğu öğrenildi. Babanın babası 34 yaşında lösemi nedeniyle eksitus olmuştu. Klinik *NF1* tanılı amcalardan biri 28 yaşında olup testis kanseri tanılıydı. Olguda postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu. İntertriginöz çillenme, rölatif makrosefali, bilateral Lisch nodülü, bilateral miyopi ve astigmatizm saptandı. Sol sternokleidomastoid kası arkası ve trapezius kası civarında 0.5 cm çapında kitle saptanmış olup nörofibrom olabileceği düşünülmüştü. Okul başarısının iyi olduğu öğrenildi. Grafide skolyoz saptanmadı. Kraniyal MRG’de bilateral globus palliduslarda, talamusta, dentat nükleuslarda, bilateral hipokampuslarda ve 4. ventrikül anterior kesiminde anterior

komşuluğunda tegmental bölgede, tektumda diffüzyon artışı gösteren T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens lezyonlar izlenmiş olup bulgular NF1 açısından anlamlı olarak değerlendirildi. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.7909C>T (p.R2637*) heterozigot, patojenik varyantı saptanmış olup bu varyant Sanger dizileme ile doğrulandı.

Olgu 16

14 yaş 4 aylık kız olgunun ebeveynleri arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. 4 gebelik öyküsü (G4P4) bulunan annesi, NF1 klinik tanısı almış olup 32 yaşında meme kanseri nedeniyle eksitus olmuştu. 44 yaşında olan babasında herhangi bir sağlık problemi bulunmamaktaydı. Olgunun teyzesinde, dayısında, annesinin babasında CALM olduğu öğrenildi. Olguda CALM, intertriginöz çillenme ve nörofibrom mevcuttu. Göz muayenesinde bilateral Lisch nodülü izlendi. Ders başarısının orta seviyede olduğu öğrenildi. Skolyoz grafisinde patoloji saptanmadı. Kraniyal MRG'de bilateral dentat nükleuslarda, brakium pontislerde, serebral pedinkül posterior ve anterior kesimlerde, talamus posteriorunda ve bilateral globus palliduslarda çok sayıda değişik boyutlarda hamartomatöz lezyon mevcut olup nörofibromatozis açısından anlamlı olarak değerlendirildi. Sağ periorbital yağlı doku posterolateral kesim komşuluğunda, sfenoid kemik medial yüz komşuluğunda konturları lobüle, sağ tarafta kavernoöz sinüse doğru uzanım gösteren, T1A ve FLAIR görüntülerde gri cevherler ile izointens, T2A görüntülerde hiperintens pleksiform nörofibrom izlendi. Ayrıca sağ temporal parankimde kısmi atrofi ile beraber anterior kesimde 1 cm genişlikte araknoid kist mevcuttu. Vertebra MRG'de torakal vertebra düzeyinde nöral foramenlerde kosta komşuluğundaki alanlarda paravertebral bölgelerde, posterior cilt altı kesimde; lomber bölgede tüm nöral foramenlerde; sakral bölgede nöral foramenlerle beraber posterior kesimlerde ve bir kısmı nöral foramenlerden abdomen içerisine doğru uzanım gösteren çok sayıda ve değişik boyutta nörofibrom izlendi. Tüm batin USG'si normal saptandı. Yapılan kardiyolojik değerlendirmesi (EKO) normal sonuçlandı. Ayrıca labium majusta nodüler lezyon saptanmış olup buna yönelik yapılan yüzeysel doku USG'sinde sağda labium majus üzerinde büyüğü 7.5×3.5 mm boyutta olan iki adet nonvaskülarize hipoekoik nodüler görünüm izlendi. RASopati panel testi sonucunda *NF1* geninde c.5570del (p.I1857Tfs*6) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 17

12 yaş 4 aylık kız olgu, aralarında akrabalık olmayan 49 yaşında baba ile 44 yaşında annenin 3 gebeliğinden olan ilk çocuklarıydı (G3P3). Annede meme kanseri öyküsü vardı. Olgunun ilk başvurusu baş ağrısı nedeniyle olmuştu, hemen hemen her gün olan yaklaşık 1 yıldır süren baş ağrısı öyküsü mevcuttu. Fizik muayenede CALM, intertriginöz çillenme ve sağ iriste Lisch nodülü mevcuttu. Psikomotor gelişim basamakları yaşitlarıyla uyumlu olup ders başarısının iyi olduğu öğrenildi. Baş çevresi 97 p (+1.89 SDS) olup rölatif makrosefali saptandı. Nöbet öyküsü bulunmamaktaydı. Kraniyal MRG'de sağda daha belirgin olmak üzere bilateral globus palliduslarda diffüzyon artışı gösteren milimetrik intens odaklar izlendi. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.5768C>G (p.T1923R) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptanmış olup NF1 tanısı kesinleşti.

Olgu 18

42 yaş erkek olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Olgunun annesinde NF1 klinik tanısı mevcut olup 38 yaşında akciğer kanseri nedeniyle eksitus olmuştu. Bir kız kardeşi 44 yaşında Hodgkin lenfoma nedeniyle eksitus olmuştu. Olguda postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu. Göz muayenesinde bilateral iriste Lisch nodülü saptandı. VEP testinde bilateral prekiyazmatik patoloji mevcuttu. Torakal bölgede açıklığı sola, lomber bölgede açıklığı sağa bakan skolyoz izlendi. Nörolojik muayenesinde sağ kol ve bacakta kas gücü 4/5'ti, bilateral alt ekstremitelerde daha belirgin olmak üzere derin tendon reflekslerinde (DTR) canlılık saptandı. Kraniyal MRG'de santral periferik BOS sahalarında hafif atrofik dilatasyon gözlemlendi. Sol paryetooksipital bölgede cilt altı dokuda yaklaşık 1 cm boyutta yumuşak doku kitlesi, sağ orbita içerisinde en büyüğü süperior rektus kası anteriorunda ekstrakonal yerleşimli yaklaşık 1 cm çapında 2 adet nodüler lezyon izlenmiş olup bu lezyonlar nörofibrom lehine değerlendirildi. Vertebra MRG'de kranioservikal bileşke düzeyinde bilateral foraminal kitle basısına bağlı myelopati, torakal ve lomber bölge olmak üzere tüm spinal kanalda foraminal, ekstraforaminal ve kauda ekuina lifleri arasında çok sayıda nörofibrom saptandı. L2-L3 seviyesinde anterolateral bölgede hafif dereceli tekal kese basısı mevcuttu. Ayrıca retroperiton, aksilla, paraspinal kaslar ve cilt altı yağlı doku ve pretrakeal alanda çok sayıda nörofibrom izlendi. RASopati paneline alınan olguda *NF1* geninde c.2110_2111dup (p.V705Wfs*44) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı

saptandı. Saptanan bu varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 19

32 yaşında erkek olgunun ebeveynleri aralarında akrabalık bulunmamaktaydı. Olgunun annesi NF1 klinik tanılı olup psikiyatrik bir bozukluğa bağlı olarak suisid sonrasında eksitus olmuştu. Babası akciğer kanseri nedeniyle tedavi almaktaydı. 2 kız kardeşinde ve onlardan birinin çocuklarında CALM bulunduğu öğrenildi. Olgunun eşiyle arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Olguda multipl CALM ve sırt bölgesinde nörofibrom mevcuttu. RASopati panel testi sonucunda *NF1* geninde c.5552dup (p.G1852Wfs*10) heterozigot, patojenik varyantı saptandı.

Olgunun 5 yaş 8 aylık oğlunun fizik muayenesinde CALM, rölatif makrosefali izlendi. Skolyoz saptanmadı. Psikomotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumluydu. Kranial MRG'sinde dentat nükleuslarda, beyin sapı posterior kesimde, serebral pedinkülde, hipokampuslarda, talamus posterior kesimlerde ve globus palliduslarda T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens, difüzyon artışı gösteren lezyonlar mevcut olup nörofibromatozis açısından anlamlı olarak değerlendirildi. Ayrıca korpus kallozum kalın olarak izlendi. Renal USG'si normal saptandı.

Olgunun 2 yaş 11 aylık kızında benzer şekilde multipl CALM ve rölatif makrosefali mevcut olup skolyoz bulunmamaktaydı. Psikomotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumluydu. Kranial MRG'de dentat nükleuslarda, beyin sapında, serebral pedinkülde, bilateral globus palliduslarda difüzyon artışı gösteren, kontrast tutmayan T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens lezyonlar izlendi. Orbita MRG ve üriner USG'si normal saptandı.

Olgunun 2 çocuğundan Sanger yöntemiyle çalışılan mutasyon analizinde olguda saptanan varyant çocuklarda doğrulandı.

Olgu 20

2 yaş 6 aylık kız olgu, 1. derece kuzen evliliği yapmış 28 yaşında anne ve 39 yaşında babanın tek çocuğuydu (G1P1). Olgunun annesinde, dayısında ve anneannesinde NF1 klinik tanısı mevcuttu, nörofibromları ve CALM bulunduğu öğrenildi. Hidrosefali,

nörofibrom ve CALM öyküsü mevcut dayı eksitus olmuştı. Olguda antenatal dönemde oligohidramniyoz öyküsü mevcuttu, yapılan fizik muayenede CALM, intertriginöz çillenme ve nörofibrom, dişlerde hipodonti saptandı. Göz muayenesinde normal göz bulguları mevcuttu, Lisch nodülü saptanmamıştı. Nöromotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumluydu. Minimal skolyoz gözlendi. Nöbet öyküsü bulunmamaktaydı. Kraniyal MRG'de dentat nükleuslarda, sol brakium pontiste, beyin sapında, serebral pedinkülde, hipokampuslarda, talamuslarda, sağ globus palliduslarda, mamiller cisimlerde T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens difüzyon artışı gösteren lezyonlar izlenmiş olup nörofibromatozis lehine değerlendirildi. Optik kiazma hipertrofik görünümde saptandı. Tüm batın USG'si normaldi. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.3739_3742del (p.F1247Ifs*18) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Olguda saptanan varyant Sanger dizileme ile doğrulandı. Anne ve babadan yapılan Sanger dizileme sonucunda annede aynı varyant saptandı.

Olgunun annesi 28 yaşındaydı. CALM, intertriginöz çillenme ve kutanöz nörofibromları mevcuttu. Göz muayenesinde ileri derecede miyopi ve Lisch nodülü saptandı. Öğrenme güçlüğü bulunmamaktaydı. Torakolomber bölgede S şeklinde skolyoz izlendi. Alt ekstremitede varis mevcuttu. Kraniyal MRG normaldi. Tüm abdomen USG normal saptandı.

Olgu 21

24 yaş kadın olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Annesinde cilt lezyonları bulunduğu öğrenildi. Olgunun eşiyle aralarında 2. derece akrabalık bulunmaktaydı ve tek gebeliğinden bir oğlu (G1P1) mevcuttu. Olgunun fizik muayenesinde CALM, intertriginöz çillenme, nörofibrom ve Lisch nodülü gözlendi. Doğuştan itibaren karbonküllü mevcuttu ve olgunun gebeliğinde oligohidromaniyoz öyküsü vardı. Moleküler analiz sonucunda *NF1* geninde c.7468G>T (p.E2490*) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptandı.

Olgunun 1 aylık kızında multipl CALM mevcut olup muayenede kaba yüz, kısa boyun, yukarı çekik palpebral fissürler izlendi. NF1 açısından tek nokta mutasyon analizi planlandı.

Olgu 22

8 yaş 10 aylık kız olgu, aralarında akrabalık olmayan 41 yaşında baba ile 33 yaşında annenin 9 gebeliğinden 5. çocuğuydu (G9P9). Aile öyküsünde özellik bulunmamaktaydı. Olguda CALM mevcuttu. Göz muayenesinde Lisch nodülü saptanmadı; ancak sağ optik sinir temporalı hafif soluk gözlendi. Baş ağrısı şikayeti mevcuttu. Fizik muayenede boy kısalığı (-2.93 SDS), makrosefali (+3.61 SDS), kaba ve üçgen yüz, hipertelorizm, yukarı çekik palpebral fissürler, kısa filtrum saptandı. Kraniyal MRG'de sol serebellar pedinkül seviyesinde yaklaşık 13 mm'lik bir alanda T2 ve FLAIR sekanslarda difüzyon kısıtlaması gösteren bir saha gözlenmiş olup hamartamatöz lezyona ait olduğu düşünüldü. MR spektroskopide lezyon kesiminde nöron miktarında azalma saptandı. Çekilen EKO ve tüm abdomen USG'de herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Olguda *NF1* geninde c.4217_4220del (p.G1406_S1407delinsV) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptandı. Bu varyant Sanger dizileme ile doğrulandı ve segregasyon analizi sonucunda ebeveynler normal sonuçlandı.

Olgu 23

8 yaş 9 aylık erkek olgu aralarında 1. derece kuzen evliliği olan 45 yaşında baba ile 39 yaşında annenin 4 gebeliğinden olan 3. çocuğuydu (G4P4). Olgunun bir abisinde cilt lezyonu bulunduğu ve kız kardeşinin sekundum ASD nedeniyle opere olduğu öğrenildi. Olguda postnatal dönemden itibaren CALM mevcuttu. Fizik muayenede nörofibrom saptanmadı. Psikomotor gelişim basamaklarında hafif gecikme gözlenmiş olup okul başarısı kötüydü, öğrenme güçlüğü mevcuttu. Kemik surveyde skolyoz veya olası herhangi bir iskelet patolojisi izlenmedi. Kraniyal MRG'de sağ tarafta dentat nükleusda, bilateral globus palliduslarda, hipotalamus kesiminde T2A ve FLAIR sekanslarda intens diffüzyon artışı gösteren odaklar izlenmiş olup nörofibromatozis açısından anlamlı olarak değerlendirildi. Vertebra ve orbita MRG normal saptandı. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.2542G>C (p.G848R) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile doğrulandı. Ebeveynlerden çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal saptandı.

Olgu 24

52 yaşında kadın olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Annesinde epilepsi öyküsü ve bir erkek kardeşinde nörofibrom lehine değerlendirilen cilt

altı nodüler lezyonları olduğu öğrenildi. Olgunun eşiyle arasında akrabalık bulunmamaktaydı, 5 gebeliğinden 3 yaşayan çocuğu mevcuttu (G5P4A1), hidrosefali ve spina bifida okülta bulunan bir oğlu postnatal 4 aylıkken eksitus olmuştu. Olgunun fizik muayenesinde CALM veya intertriginöz çillenme saptanmadı; ancak bilateral alt ekstremitede yaygın nörofibromlar mevcuttu. Kraniyal MRG'de her iki frontal subkortikal beyaz cevherde nonspesifik birkaç adet milimetrik gliotik odak dikkati çekmiş olup bilateral frontoparyetal beyaz cevherde belirginleşmiş perivasküler boşluklar izlendi. Vertebra MRG'de T7-T8 düzeyinde anterior subaraknoid mesafeyi daraltan diskal bulging ve lomber lordozda azalma dışında bulgu saptanmadı. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.6664A>G (p.T2222A) heterozigot, ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen (VUS) varyantı saptandı.

Olgu 25

5 yaş kız olgunun ebeveynleri arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. Baba 33, anne 35 yaşındaydı. Olgumuz annenin 2 gebeliğinden olan ilk çocuğuydu (G2P2). Aile öyküsünde özellik bulunmamaktaydı. Olgunun postnatal 1 aylıktan itibaren CALM ve intertriginöz çillenmesi mevcuttu. Nörofibrom ve Lisch nodülü saptanmadı. Optik gliomu olan olgunun sol göz kapağında ödem izlendi. Psikomotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumluymuştu. 40-50 derece skolyoz ve içe basma gözlendi. Kraniyal MRG'de sol temporal anteromedial kesimde yaklaşık 2.3 cm genişliğinde diffüzyon artışı gösteren araknoid kist izlenmiş, bilateral brakium pontislerde, bilateral dentat nükleuslarda, tektumda, medulla spinaliste (bulbusta), serebral pedinkül posterior kesimlerinde, bilateral globus palliduslarda, bilateral hipokampuslarda, bilateral talamus posteriorunda T2 ve FLAIR sekanslarda intens, diffüzyon artışı gösteren çok sayıda odak izlendi. Ayrıca sağ optik kiazma düzeyinde yaklaşık 1.5×1 cm boyutta T2 ve FLAIR sekanslarda hiperintens optik gliom açısından anlamlı lezyon saptandı. RASopati panelinde *NF1* geninde c.3152del (p.G1051Efs*11) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Ebeveynlerden istenen Sanger dizi analizi sonucu normal saptandı.

Olgu 26

40 yaş kadın olgunun ebeveynlerinin yakın yerleşim biriminden olduğu öğrenildi. Olgumuz 68 yaşındaki annenin 5 gebeliğinden 2. çocuğuydu (G5P5). CALM ve

nörofibromları olan klinik NF1 tanılı baba 55 yaşında lenfoma nedeniyle eksitus olmuştu. Olgunun NF1 moleküler tanısı almış olan 37 yaşındaki kız kardeşinde multipl CALM mevcuttu ve onun 16 yaşındaki kızında CALM, öğrenme güçlüğü, optik gliom, tibiada psödoartroz, serebellum tümörü ve böbrek yetmezliği olduğu öğrenildi. Olgunun 35 yaşındaki erkek kardeşinde nörofibrom ve CALM mevcuttu. Olgunun fizik muayenesinde CALM, intertriginöz çillenme ve vücutta yaygın olarak kutanöz ve pleksiform nörofibromlar ile bilateral Lisch nodülleri saptandı. Öğrenme güçlüğü bulunmamaktaydı. Olgunun baş ağrısı şikayeti mevcuttu, nöbet öyküsü olmadığı öğrenildi. Kranial MRG ve tüm abdomen USG'de herhangi patoloji saptanmadı. *NF1* geninde c.574C>T (p.R192*) heterozigot, patojenik varyantı saptanan olgunun NF1 tanısı kesinleşti. Ayrıca olgunun 20 yaşındaki kızında CALM, kifoskolyoz ve öğrenme güçlüğü, 12 yaşındaki kızında ise CALM ve öğrenme güçlüğü mevcuttu. Olgunun çocuklarından tek nokta mutasyon analizi planlandı.

Olgu 27

9 yaş 7 aylık kız olgu, yakın yerleşim biriminden 38 yaşında baba ile 41 yaşında annenin tek gebeliğinden olan dizigotik ikiz çocuklarından biriydi (G1P2). Babada CALM ve epilepsi öyküsü olduğu öğrenildi. Olgunun ikiz kardeşinde de CALM mevcuttu. Olgunun babasının babasında CALM ve nörofibrom, 2 halasında ve bir halasının oğlunda CALM bulunduğu öğrenildi. Olguda doğumdan birkaç ay sonra fark edilip zamanla artış gösteren multipl (>20), farklı büyüklüklerde, gövde, kol ve bacaklarda yerleşim gösteren CALM mevcuttu. Aksiller çillenme veya nörofibrom saptanmadı. Psikomotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumlu, okul başarısı iyiydi. Nöbet öyküsü bulunmamaktaydı. Olgunun fizik muayenesinde tartısı 97 p (+1.9 SD), boyu 95 p (+1.71 SD) ve baş çevresi 69 p (+0.5 SD) olarak saptandı. Sol göz için ezotropanya nedeniyle opere olmuştu. Strabismus nedeniyle kapama tedavisi uygulamaktaydı. Kemik survey, tüm batın ve renal USG normal olarak sonuçlandı. Kranial MRG'de sol internal kapsül posterior bacağında fokal intens odaklar izlendi. EKG'de normal sinüs ritmi ve EKO'da patent foramen ovale (PFO) saptandı. Olgudan çalışılan RASopati panel testi sonucunda *NF1* geninde c.5610-2A>G heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptandı. Olguda saptanan varyant Sanger yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi ile doğrulandı. Klinik bulguları olan ikiz kardeşten

çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda aynı varyant saptanarak tanısı NF1 olarak kesinleşti. Ayrıca babada aynı varyant saptanmış olup annede varyant saptanmadı.

Olgu 28

4 yaş 3 aylık erkek olgu, aralarında akrabalık bulunmayan 44 yaşında baba ve 47 yaşında annenin 5 gebeliğinden olan son çocuklarıydı (G5P5). Olgunun bir abisinde nöromotor ve bilişsel gerilik ve hidrosefali (2 kez şant operasyonu geçirmişti), başka bir abisinde bilişsel gerilik ve epilepsi öyküsü mevcuttu. Olguda en büyüğü 2×2 cm boyutta, sırt ve umblikus etrafında olan, vücutta yaygın, multipl (>6) CALM, umblikus çevresinde 1 adet 2×2 cm nevüs anemikus saptandı. Psikomotor gelişim basamakları yaşıtlarıyla uyumluydu. Renal doppler USG normal saptandı. Antropometrik ölçümlerinden tartısı 45 p, boyu 9 p (-1.32 SD) ve baş çevresi 87 p (+1.15 SD) olarak izlendi. Görme ve işitme muayenesi normal saptandı. RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.1541_1542del (p.Q514Rfs*43) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 29

17 yaş kız olgunun ebeveynleri arasında derecesi bilinmeyen akrabalık olduğu öğrenildi. Olgunun ablasında CALM mevcuttu. Olguda CALM, sağ alt batında nörofibrom ve sol iriste 3 adet, sağda 1 adet Lisch nodülü izlendi. İntertriginöz çillenme saptanmadı. Öğrenme güçlüğü bulunmamaktaydı. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.7062+2T>G heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 30

25 yaş erkek olgunun tüm vücutta yaygın CALM ve birkaç adet nörofibrom şüpheli lezyonu mevcut olup lezyonlardan alınan punch biyopsi sonucu nörofibrom ile uyumlu gelmiştir. Göz muayenesinde herhangi bir patoloji saptanmadı. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.2071_2074dup (Y692Sfs*9) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 31

9 yaş erkek olgu tüm vücutta yaygın multipl CALM nedeniyle başvurdu. Olgunun babasında NF1 klinik tanısı olduğu bildirildi. Olgunun fizik muayenesinde rölatif makrosefali saptandı. Kranial MRG'de supratentorial kesitlerde, her iki globus pallidus düzeyi derin gri cevherde ve sol serebellar hemisferde T2A ve FLAIR sekanslarda fokal hiperintensiteler izlendi. RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.2409+2dup heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleşti.

Olgu 32

29 yaş kadın olgunun fizik muayenesinde vücutta yaygın olarak CALM ve aksiller çillenmesi mevcuttu. Nörofibromu ve öğrenme güçlüğü bulunmamaktaydı. Olgunun babasında benzer cilt lezyonları olduğu öğrenildi. Moleküler analiz sonucunda *NF1* geninde c.3132C>A (p.Y1044*) heterozigot, patojenik varyantı saptandı.

Olgu 33

21 yaş erkek olguda multipl CALM ve aksiller çillenme mevcuttu. Panel test sonucunda *NF1* geninde c.7439_7451del (p.H2480Pfs*5) heterozigot, patojenik varyantı saptanmış olup tanı NF1 olarak kesinleştirildi.

Olgu 34

47 yaş erkek olgunun fizik muayenesinde CALM, intertriginöz çillenme ve Lisch nodülü saptandı. Öğrenme güçlüğü bulunmamaktaydı. RASopati paneli sonucunda *NF1* geninde c.2329T>A (p.W777R) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleşti.

Olgu 35

17 yaş kadın olgu, 10 yıldır özellikle karın bölgesinde ve sırtta daha belirgin olan multipl CALM mevcudiyeti nedeniyle tarafımıza başvurdu. 8-9 yıldır tekrarlayan oral aftları olduğu öğrenildi. Ön tanıda NF1 düşünülerek RASopati paneli çalışıldı. Sonucunda *NF1* geninde c.2503C>T (p.Q835*) heterozigot, patojenik varyantı saptandı.

Olgu 36

7 ay 3 günlük kız olgunun ebeveynleri arasında 1. derece kuzen evliliği olduğu bildirildi. Multipl (>10) CALM nedeniyle tarafımıza başvuran olgunun babasında ve babaannesinde de benzer lezyonlar ve epilepsi mevcuttu. RASopati paneline alınan olgunun sonucunda *NFI* geninde c.2880dup (V961Cfs*14) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 37

24 yaş erkek olgunun ebeveynleri arasında derecesi bilinmeyen akrabalık olduğu öğrenildi. Olgunun 5 kardeşinde de benzer öykü mevcuttu. Bulguları hakkında detaylı bilgiye ulaşılamayan olgunun kraniyal MRG'sinde NF1 lehine bulgu saptanmıştı. Panel teste alınan olgunun sonucunda *NFI* geninde c.5352T>A (p.Y1784*) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptandı.

Olgu 38

13 yaş erkek olgunun fizik muayenesinde CALM ve intertriginöz çillenme saptandı. Olgunun 44 yaşındaki annesinde de aksiller ve inguinal çillenme mevcuttu. Ayrıca annesinde hipotiroidi ve astım öyküsü olduğu öğrenildi. Olgu meme başında kitle nedeniyle takipliydi. RASopati paneline alınan olguda *NFI* geninde c.4783C>T (p.Q1595*) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi. Olgunun annesinden tek nokta mutasyon analizi planlandı.

Olgu 39

3 yaş kız olgunun aile öyküsünde özellik bulunmamaktaydı. Fizik muayenesinde CALM ile aksiller ve inguinal çillenmesi mevcuttu. Panel test sonucunda *NFI* geninde c.6852_6855del (p.Y2285Tfs*5) heterozigot, patojenik varyantı saptanmış olup NF1 tanısı kesinleştirildi.

Olgu 40

7 yaş erkek olgunun CALM ile tüm ciltte yaygın aksiller ve inguinal çillenmesi mevcuttu. Hafif bilişsel geriliği ve boy kısalığı saptandı. Kraniyal MRG'de supratentorial kesitlerde, her iki globus pallidus internada ve beyin sapı mezensefalon sağ yarımda T2A

sekansta hiperintens lezyonlar izlenmiş olup NF1 lehine değerlendirildi. Moleküler analizde *NF1* geninde c.4600C>T (p.R1534*) heterozigot, patojenik varyantı saptandı.

Olgu 41

9 yaş erkek olguda CALM ve bilişsel gerilik saptandı. Kraniyal MRG'de sağ serebellar bölgede hamartom izlendi. RASopati panel testi çalışılan olguda *NF1* geninde c.7570del (p.L2524Wfs*24) heterozigot, muhtemel patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleşti.

Olgu 42

40 yaş kadın olgunun baş dönmesi şikayeti mevcuttu. Kraniyal MRG'de intrakraniyal schwannoma saptandı. Olgudan çalışılan panel test sonucunda *NF1* geninde c.7549C>T (p.R2517*) heterozigot, patojenik varyantı saptanarak NF1 tanısı kesinleştirildi.

NF1 geninde varyant saptanan olguların klinik bulgularının özeti tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. NF1 ve NF-Noonan sendromu olgularının klinik bulgularının özeti

Olgu No	NIH Tam Kriterleri							Ek bulgular							
	CALM (>=6)	Çillenme	Nörofibrom	Lisch nodülü	Optik gliom	Kemik bulguları	Aile öyküsü	Kardiyak bulgu	Skolyoz	MRG bulgusu	Psikiyatrik bulgu	Baş ağrısı/Baş dönmesi	Nöbet	Batın USG bulgusu	Diğer
1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
2	+	BY	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
3	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	
4	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
5	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	Ayakta bilateral sindaktili
6	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	Rölatif makrosefali
7	+	+	+	BY	BY	BY	+	BY	BY	+	BY	+	-	-	Pektus ekskavatum
8	+	+	BY	+	-	-	+	BY	-	+	+	-	-	+	
9	+	+	+	BY	BY	-	+	BY	-	-	-	+	-	-	
10	+	-	+	+	BY	BY	+	+	+	+	+	+	-	+	
11	+	+	BY	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	
12	+	BY	BY	BY	BY	-	+	BY	-	BY	-	BY	-	BY	

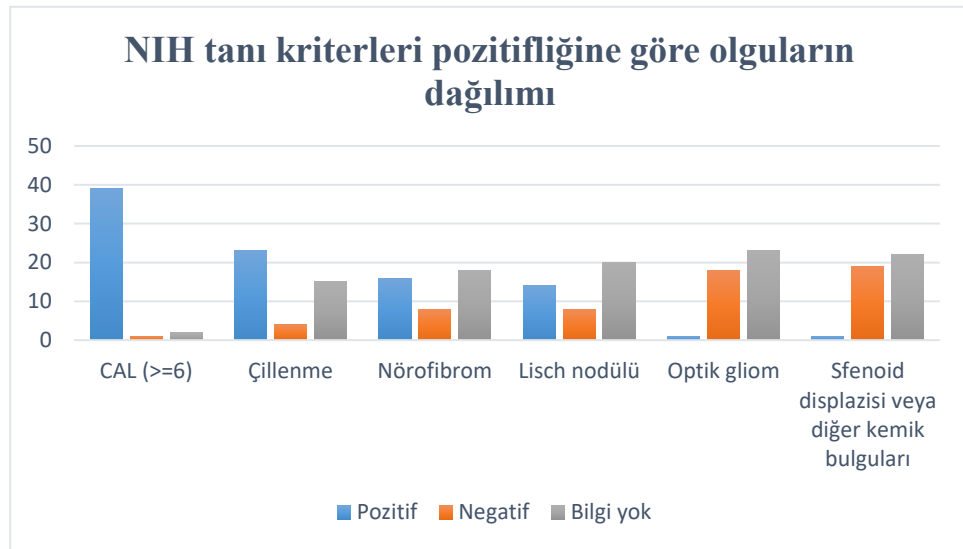
13*	+	BY	BY	BY	BY	BY	-	BY	-	+	+	-	+	+	Pektus karinatum, Noonan benzeri fasiyal dismorfizm
14	+	+	-	BY	BY	-	-	-	+	+	-	-	-	BY	Kanat skapula
15	+	+	+	BY	BY	-	+	BY	-	+	-	-	-	-	Rölatif makrosefali
16	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	Pitozis, kamptodaktili (PIF eklemde kontraktür), sfenoid kanat displazisi
17	+	+	BY	+	-	BY	-	BY	BY	+	-	+	-	-	Rölatif makrosefali, pitozis
18	+	BY	+	+	-	-	+	BY	+	+	-	-	-	-	Kas gücünde azalma, Multipl sinir kılıfı tümörü
19	+	BY	+	BY	BY	BY	+	BY	BY	BY	BY	-	-	BY	
20	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
21	+	+	+	+	BY	BY	+	BY	BY	BY	-	+	-	BY	
22	+	BY	BY	-	-	BY	-	-	BY	+	-	+	-	-	Makrosefali, kaba yüz

23	+	BY	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	Rölatif makrosefali, pektus ekskavatum
24	-	-	+	BY	BY	-	BY	BY	-	-	-	-	-	BY	
25	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Ayakta içe basma
26	+	+	+	+	-	-	+	BY	+	-	-	+	-	-	
27	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	Strabismus
28	+	BY	BY	BY	BY	BY	-	BY	BY	BY	-	-	-	-	Rölatif makrosefali
29	+	-	+	+	-	BY	+	BY	BY	BY	-	-	-	BY	
30	+	BY	+	-	-	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
31	+	BY	BY	BY	BY	BY	+	BY	BY	+	BY	BY	BY	BY	Rölatif makrosefali
32	+	+	+	BY	BY	BY	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
33	+	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
34	+	+	BY	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
35	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	Tekrarlayan oral aft
36	+	BY	BY	BY	BY	BY	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
37	BY	BY	BY	BY	BY	BY	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
38	+	+	BY	BY	BY	BY	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	Meme başında kitle
39	+	+	BY	BY	BY	BY	-	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	
40	+	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	+	+	BY	BY	Boy kısalığı

41	+	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	+	+	BY	BY	BY	
42	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	BY	+	BY	BY	İntrakraniyal schwnnoma
Toplam	39/40	23/27	16/24	14/22	1/19	1/20	23/34	6/15	11/22	23/27	10/29	11/29	2/29	3/23	

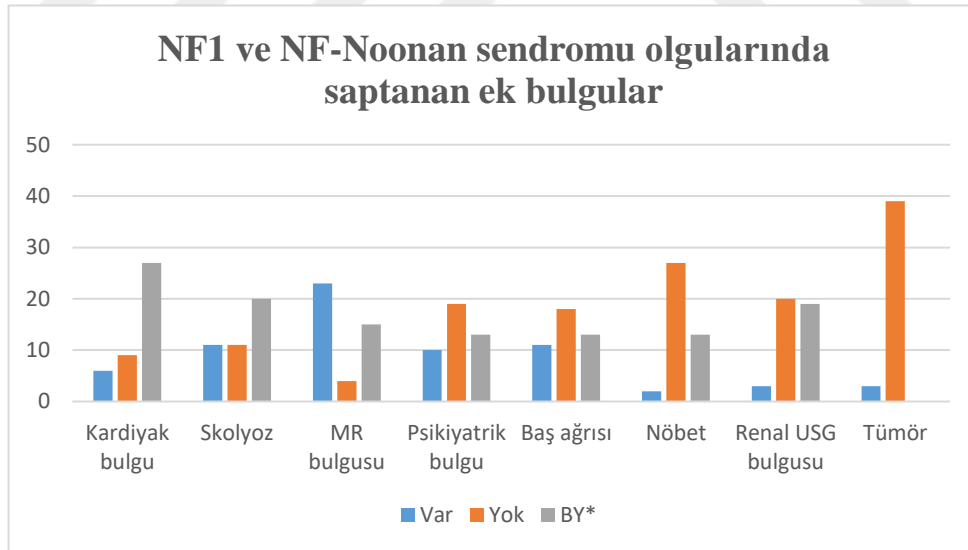
BY: Bilgi yok, * Olgu 13'ün tanısı NF-Noonan sendromu olarak kesinleştirilmiştir.

NF1 tanılı olguların NIH kriterleri için pozitiflik oranı şekil 4.7’de belirtilmiştir.



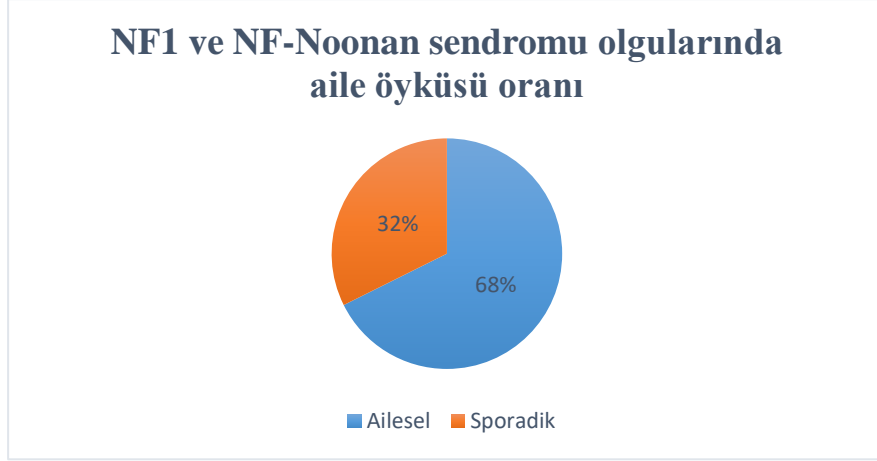
Şekil 4.7. NF1 ve NF-Noonan sendromu tanılı olgularda NIH tanı kriterleri pozitifliğine göre olguların durumu

Olgularda ek destekleyici bulgular saptanmış olup olgu sayısına göre dağılımı şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. NF1 ve NF-Noonan sendromu tanılı olgulardaki destekleyici klinik bulgular

NF1 ve NF-Noonan sendromu tanılı olguların % 68’i ailesel özellikte saptanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. NF1 ve NF-Noonan sendromu olgularında aile öyküsü oranı

4.2.2. *NF1* Dışındaki Genlerde Varyant Saptanan Olguların Değerlendirilmesi

Olgu 43

1 ay 11 günlük erkek hasta sendromik yüz görünümü ile tarafımıza yönlendirildi. Anne (31 yaş) ve babanın (32 yaş) yakın yerleşim biriminden olduğu öğrenildi. Annenin 6 abortus öyküsü ve olgumuz dışında 7 yaşında sağlıklı bir kız çocuğu mevcuttu (G8P2A6). Prenatal dönemde antenatal hidronefroz ve polihidramniyoz saptandı. Progresif gelişme geriliği, boy kısalığı, kare yüz görünümü, epikantus, aşağı çekik palpebral fissürler, uzun kirpikler, hipertelorizm, sinofiri, antevort burun delikleri, düşük kulaklar, mikrognati, uzun filtrum, kısa boyun, diastazis rekti, pektus ekskavatum, ayırık meme başları ve sağda retraktıl testis izlendi. Kapiller hemanjiom mevcuttu. Tartısı 14 p (-1.04 SDS), boyu 10 p (-1.25 SDS) ve baş çevresi 85 p (+1.04 SDS) olarak ölçüldü. Kontrol muayenesinde persantil kaybı saptanmış olup 7 yaş 6 aylık iken yapılan muayenesinde tartısı <3 p (-2.37 SDS), boyu <3 p (-3.17 SDS) ve baş çevresi 31 p (-0.49 SDS)'e geriledi. Olgunun agresyonları olduğu öğrenildi. EKO'sunda midmuskuler küçük VSD, artmış interventriküler septum (İVS) kalınlığı, sol ventrikül arka duvarı hipertrofisi, mitral kleft, 1. ve 2. derece MY ve subaortik darlık saptandı. Kraniyal MRG'de 3. ve lateral ventriküller kısmen dilate izlendi. Tüm abdomen ve renal USG'de sol böbrekte hidronefroz ve pelviyektazi mevcuttu. Koagülasyon parametrelerinden FVII (prokonvertin): 58.7 (70-120), d-dimer: 1.23 (0-0.55) olarak saptandı. FVIII, FIX, FXI, FXII ve FXIII düzeyleri normal aralıkta bulundu. Görme ve işitme muayenesinde herhangi patoloji saptanmadı. Psikomotor gelişim basamaklarında gecikmesi mevcuttu.

Ön tanıda RASopati düşünülen olgudan yapılan panel test sonucunda *RAF1* geninde c.782C>T (p.P261L) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı (Şekil 4.10). Saptanan varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Yapılan klinik korelasyon sonucunda olgunun tanısı Noonan sendromu tip 5 olarak kesinleşti. Yapılan segregasyon analizinde annede varyant saptanmazken babada olgudaki heterozigot, patojenik varyantın aynısı saptandı.

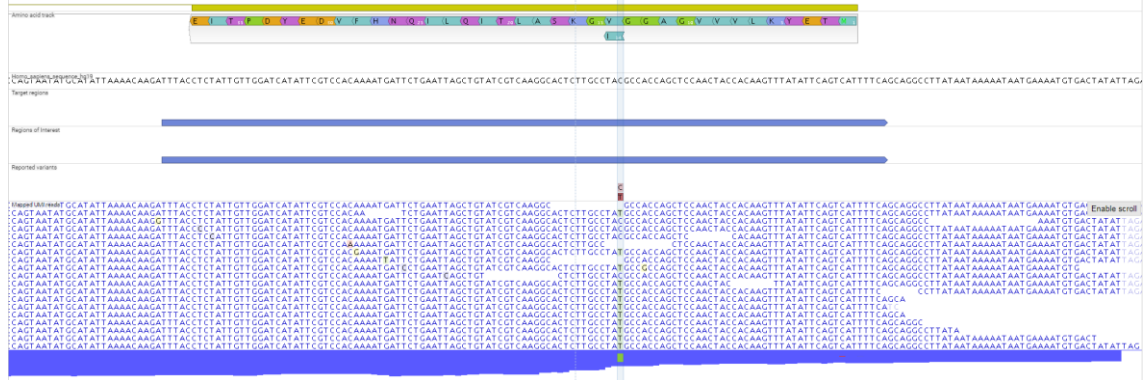


Şekil 4.10. Olgu 43'ün BAM formatında *reverse* dizi NGS analiz görüntüsü (*RAF1*)

Olgu 44

9 yaş 1 aylık erkek olgunun anne (39 yaş) ve babası (45 yaş) 2. derece kuzen evliliği yapmıştı. Olgumuz annenin 4 gebeliğinden son çocuğuydu (G4P4). Beslenme güçlüğü, strabismus, nöromotor gerilik ve fasiyal dismorfizm nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Psikomotor gelişim basamaklarında gecikme mevcut olup okul başarısı kötüydü. Yapılan fizik muayenesinde tartısı <3 p (-3.46 SDS), boyu <3 p (-3.25 SDS), baş çevresi 23 p (-0.73 SDS) olarak ölçüldü. Skafosofali, uzun ve dar yüz yapısı, üçgen yüz, geniş alın, hipertelorizm, mikrognati, klinodaktili, yele boyun, pektus ekskavatum saptandı. Kemik surveyde herhangi patolojiye rastlanmadı. Kraniyal MRG'de supratentoriyal alanda 4., 3. ve lateral ventriküller hafif dilate (hidrosefali) ve sol serebellar hemisferde venöz anjiom izlendi. Beyaz cevher hacmi paryetooksipital bölgelerde azalmış olarak değerlendirildi. Görme ve işitme muayenesinde herhangi patoloji saptanmadı. İstenen tüm abdomen USG sonucunda splenomegali saptandı ve mesane duvar kalınlığı hafif artmış olarak değerlendirildi ayrıca pelviste solid kistik yer kaplayıcı oluşum izlendi. Koagülasyon parametrelerinden FXII (Hageman faktörü): 56.9 (70-150), fibrinojen: 368.53 (150-350) olarak saptandı. Bunların dışında FV, FVII, FVIII,

FIX, FXI, FXIII, vW antijen, aPTT, PT, INR normal saptandı. RASopati ön tanısıyla değerlendirilen olgudan panel test istenmiş olup *KRAS* geninde c.40G>A (p.V14I) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Bu mutasyon Noonan sendromu tip 3 tanısı ile uyumlu olarak değerlendirildi. Çalışılan Sanger dizileme yöntemiyle saptanan varyant doğrulandı. Ebeveynlerden Sanger yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı.



Şekil 4.11. Olgu 44'ün BAM formatında *reverse* dizi NGS analiz görüntüsü (*KRAS*)

Olgu 45

1 ay 26 günlük erkek olgu, aralarında akrabalık olmayan 28 yaşında anne ve 27 yaşında babanın ilk çocukları idi. Anne gebeliğin ilk ayında abortus riski nedeniyle progesteron kullanmış olup prenatal dönemde herhangi bir özellik saptanmamıştı. Postnatal fizik muayenede kardiyak üfürüm saptanması üzerine yapılan ekokardiyografide atriyoventriküler septal defekt (AVSD), sekundum tip ASD saptanmış. Kontrol muayenesinde nöromotor gelişim basamaklarında hafif gecikme izlendi. 1 yaş 10 aylıkken yapılan antropometrik ölçümlerinde tartısı 10 p (-1.26 SDS), boyu <3 p (-2.12 SDS) ve baş çevresi 46 p (-0.09 SDS) olarak hesaplandı. Geniş alın, kare yüz yapısı, yüksek damak, laterale doğru kalınlaşan kaşlar, renkli göz paterni, geniş ve deprese burun kökü, glabellada kapiller hemanjiom, hipertelorizm, displastik kulaklar, bilateral kulak lobülünde çentikler izlendi. Ayakta pes planovalgus deformitesi, gövdede yaygın cutis marmoratus görünümü, omuzda dermal melanozis ve sakral gamzesi mevcuttu. Sağda kriptorşidizm saptanan olgu, 1 yaş 6 aylıkken sağ orşiopeksi operasyonu geçirdi. Kontrol amaçlı bakılan skrotal USG'de sağ testis parankimi hafif kabalaşmış olarak görüldü. Kemik grafisi normal saptanmış olup skolyoz veya ek iskelet anomalisi saptanmadı. Komplet AVSD nedeniyle opere olmuş olgunun kontrol EKO'sunda 1-

2.derece MY, 1.derece TY, hafif PS saptandı. 2 yaşında iken ishal öyküsü nedeniyle yapılan fizik muayenesinde hepatosplenomegali gözlenmiş olup batin USG görüntülemesinde hafif-orta derece hepatomegali ve splenomegali saptandı. İstene hematolojik parametreler sonucunda mikrositer anemi, trombositopeni, vWF antijeni düşük saptandı, faktör düzeylerinde (FVIII, FIX, FXI, FXII, FXIII) herhangi bir anormallik saptanmadı. Görme ve işitme muayenesinde herhangi patoloji izlenmedi. Yapılan periferik kandan kromozom analizi 46, XY olarak sonuçlanmış olup ön tanıda Noonan sendromu düşünüldüğü için istenen RASopati panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.417G>C (p.E139D) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptanarak tanı Noonan sendromu tip 1 olarak kesinleşti (Şekil 4.12). Olgudan ve ebeveynlerden Sanger yöntemiyle tek nokta mutasyon analizi istenmiş olup olguda sonuç doğrulanırken, anne ve babada olgudaki varyant saptanmadı.



Şekil 4.12. Olgu 45'in BAM formatında *forward* dizi NGS analiz görüntüsü (*PTPN11*)

Olgu 46

18 yaş 8 aylık erkek olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Olgunun babası mesane kanserinden dolayı eksitus olmuştu. Olgu 45 günlük iken fizik muayenede kardiyak üfürüm saptanmıştı. 7 yaşındayken glomkom tanısı alan olguda kardiyak takiplerinde pulmoner arterde dilatasyon saptandı. Dismorfik yüz özellikleri nedeniyle tarafımıza yönlendirilen olguda ön tanıda Noonan sendromu düşünüldü. Son fizik muayenesinde tartısı <3 p (-5.68 SDS), boyu <3 p (-2.79 SDS) ve baş çevresi <3 p (-4.13 SDS) olarak ölçüldü. Üçgen yüz yapısı, hipertelorizm, sağ gözde pitozis, aşağı çekik palpebral fissürler, yüksek damak, dişte maloklüzyon, düşük, küçük ve arkaya yerleşimli kulaklar izlendi. Kısa ve yele boyun, skolyoz, pektus karinatum, ayakta brakidaktili, distal laksisite artışı gözlemlendi. İşitme testlerinde herhangi anormallik

saptanmadı. Torakal bölgede açıklığı sola bakan skolyoz mevcuttu. Faktör düzeylerinde (FV, FVII, FXI, FXII, FXIII), protein C ve protein S değerlerinde düşüklük saptandı. Kontrol kardiyak değerlendirilmede ekokardiyografide 1. derece pulmoner yetmezlik (PY), sol pulmoner arterde anevrizmatik dilatasyon, EKG’de sağ dal bloğu saptandı. Pulmoner MR anjiyografide sol pulmoner arter başlangıcında ana pulmoner arterde fuziform tarzda dilatasyon izlendi. Kraniyal MRG’de ve tüm abdomen USG’de herhangi bir patoloji gözlenmedi. Göz muayenesinde miyopi ve glokom saptandı. Kontrol muayenesinde batın BT’de splenomegali ve batın içerisinde yaygın kısa aksı 1 cm’den küçük konglomere lenf nodları ve komşuluğunda mezenterik yağlı dokuda nodüleriteler ile çıkan kolon distalinde hepatik fleksura düzeyinde belirgin simetrik kalınlaşma ve ödemli görünüm dikkati çekti. Bu sonuçla beraber yapılan kolonoskopi normal sonuçlandı. İstenen RASopati panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.922A>G (p.N308D) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Bu sonuç ile Noonan sendromu tip 1 tanısı kesinleşti. Sanger dizileme yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda varyant doğrulandı.



Şekil 4.13. Olgu 46’nın BAM formatında *forward* dizi NGS analiz görüntüsü (*PTPN11*)

Olgu 47

4 yaşında kız olgu aralarında akrabalık olmayan 41 yaşında baba ile 41 yaşında annenin 5 gebeliğinden olan son çocuğuydu (G5P3A2). Annenin 4. gebelik haftasında (GH) gerçekleşen 2 abortus öyküsü mevcuttu. Annede gestasyonel diabetes mellitus öyküsü olduğu öğrenildi. Yenidoğan döneminde hipotoni ve emme güçlüğü, kardiyak anomali, anemi ve göbek altında granülomu saptanmıştı. Psikomotor gelişim basamaklarında gecikme mevcuttu. Son fizik muayenesinde tartısı 23 p (-0.73 SDS), boyu

<3 p (-2.74 SDS), baş çevresi 4 p (-1.7 SDS) olarak ölçüldü. Üçgen yüz yapısı, pitozis, hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, düşük ve arkaya yerleşimli kulaklar, görece küçük sol kulak, yapışık ve *uplifted* kulak lobülü, yüksek damak saptandı. Kısa ve yele boyun, düşük arka saç çizgisi, yünlü saç yapısı, 15 derece kısıtlı dirsek ekstansiyonu, brakidaktili, düz tabanlık, fırlak topuk, sakral sinüs ve kalkan göğüs izlendi. Konuşmada gecikme, artikülasyon problemi, psikososyal gelişme geriliği, ince ve kaba motor faaliyetlerde gecikme, hafif bilişsel gerilik mevcuttu. 4 yaşındayken balon valvüloplasti yapılmıştı. Son çekilen ekokardiyografide sol ventrikül hipertrofisi, apikal musküler küçük VSD, interatriyal septum (İAS) anevrizması, valvüler PS, amplatzer septal oklüzyon (ASO) ile kapatılmış ASD mevcuttu. Sol ventrikül sistolik fonksiyonları normaldi. Kraniyal MRG'de sağ lateral ventrikül temporal hornunda ve sağ paryetal bölgede gliotik sinyal değişikliklerinin eşlik ettiği kistik görünüm izlendi. Tüm batın USG'de sol böbrek alt polde ve sağ böbrek üst polde milimetrik boyutta kortikomedüller yerleşimli birkaç adet ekojenite izlenmiş olup nefrokalsinozis lehine değerlendirildi. Ciltte kolay morarma şikayeti mevcuttu. İstenen koagülasyon parametreleri sonucunda FXI, FV, FXII, FXIII, FVII ve protein C düzeyleri hastanın yaşına göre düşük bulundu. Ayrıca takiplerinde ilerleyen yaşla beraber hafif düzelmiş, sınırdan trombositopeni izlendi. Göz muayenesinde psödo ekzotropya mevcut olup işitme testleri normal saptandı.

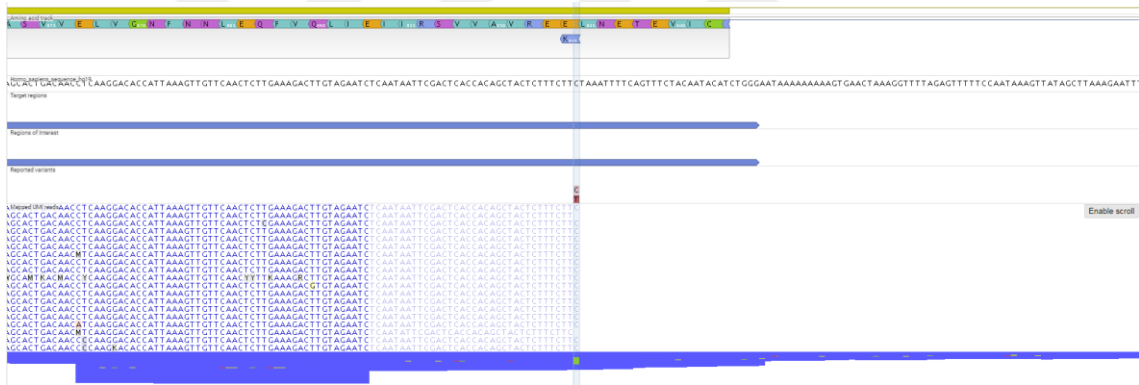
Çalışılan panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.182A>G (p.D61G) heterozigot, patojenik varyantı saptanmış olup tanı Noonan sendromu Tip 1 ile uyumlu olarak değerlendirildi. Olgudaki nokta mutasyonu Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Ebeveynlerden yapılan segregasyon analizinde anne ve babada varyant saptanmadı.

Olgu 48

5 yaş 4 aylık erkek olgu, boy kısalığı ve dismorfik görünüm nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. 30 yaşındaki baba ile 30 yaşındaki annenin arasında akrabalık bulunmadığı öğrenildi. Olgumuz annenin 2 gebeliğinden olan ilk çocuğuydu. Antenatal dönemde polihidramniyoz öyküsü mevcut olup yapılan takiplerde makrosefali ve ekstremitelerde kısalık olduğu söylenmiş. Postnatal dönemde inmemiş testis, makrosefali, dismorfik yüz görünümü, pektus ekskavatum ve hipotoni bulguları mevcuttu. 1 yaşındayken inmemiş testis nedeniyle bilateral orşiopeksi operasyonu geçirmişti. Nöromotor gelişim basamakları yaşlarıyla uyumluydu. 5 yaşında yapılan EKO'da hafif transvers arkus aorta hipoplazisi izlendi. Fizik muayenesinde tartısı 6 p (-1.5 SDS), boyu 3 p (-1.88 SDS)

ve baş çevresi 58 p (0.22 SDS) olarak hesaplandı. Pitozis, pektus ekskavatum, skolyoz saptandı. İşitme muayenesi normal saptandı. Göz muayenesinde sağ gözde pitozis, ambliyopi ve miyopi tanısı aldı. Tüm abdomen ve renal USG’de sağ böbrekte kortikal kist saptandı ve intrahepatik safra yolları belirgin olarak izlendi. Skrotal USG’de ise her iki testis inguinal kanal distal kesimde ve sol testis parankimi sağa göre hipoekoik gözlemlendi. Kontrol EKO’sunda hafif transvers arkus aorta ve istmus hipoplazisi ve inen aortada hafif sistolik gradient saptandı. Olası koagülasyon bozukluğu açısından istenen parametrelerden Faktör V, VII, XII, XIII değerlerinde hafif düşüklük saptandı. Skolyoz grafisinde lomber bölgede açıklığı sağa bakan skolyoz tespit edildi.

Çalışılan panel test sonucunda *SOS1* geninde c.2536G>A (p.E846K) heterozigot, patojenik varyantı saptandı. Olguda saptanan varyant Sanger yöntemiyle doğrulandı. Tanı Noonan sendromu tip 4 olarak kesinleşti. Anne ve babadan Sanger yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda iki ebeveyn de normal olarak sonuçlandı.



Şekil 4.14. Olgu 48’in BAM formatında *reverse* dizi NGS analiz görüntüsü (*SOS1*)

Olgu 49

Aralarında akrabalık bulunmayan anne (26 yaş) ve babanın (24 yaş) tek çocuğu olan 7 ay 11 günlük kız olgu, dismorfik görünümü nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Antenatal dönemde 36. GH’de intrauterin gelişme geriliği saptanmış, preeklampsi nedeniyle 38 GH’de sezaryen (C/S) doğum öyküsü mevcuttu. Nöromotor gelişim basamakları yaşlılarıyla uyumluydu. Yapılan ekokardiyografide supralavvüler PS saptandı. 7 aylıkken yapılan fizik muayenesinde tartısı <3 p (-2.41 SDS), boyu <3 p (-2.11 SDS) ve baş çevresi <3 p (-2 SDS) olarak saptandı. Ön fontanel 3×2 cm boyutta,

arka fontanel kapalı idi. Hipertelorizm, kaşların medialinde seyreklik, düşük yerleşimli kulaklar ve katlantılı kulak heliksi, uzun filtrum, ince üst dudak ve pektus ekskavatum deformitesi saptandı. Görme ve işitme taramalarında patoloji saptanmadı. Kontrol EKO'da interatriyal septumda sekundum yerleşimli iki adet biri 3 mm, diğeri ortalama 6 mm çapında soldan sağa şantlı defektler ve supravavüler PS izlendi. Olgudan RASopati ön tanısıyla panel test çalışıldı. Sonucunda *PTPN11* geninde c.844A>G (p.I282V) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Klinik korelasyon ve çalışılan Sanger dizileme analizi ile beraber kesin tanı Noonan sendromu tip 1 olarak doğrulandı.

Olgu 50

JMML klinik tanısı mevcut 1 yaş 25 günlük erkek olgu, aralarında akrabalık bulunmayan 34 yaşında baba ve 29 yaşındaki annenin 2. gebeliğinden olan 2. çocuğuydu (G2P2). Antenatal dönemde takipsiz olgunun aile öyküsünde özellik bulunmamaktaydı. Nöromotor gelişim basamakları yaşlılarıyla uyumluydu. Sık sık (10 günde bir) ishal-kabızlık atakları olmaktaydı.

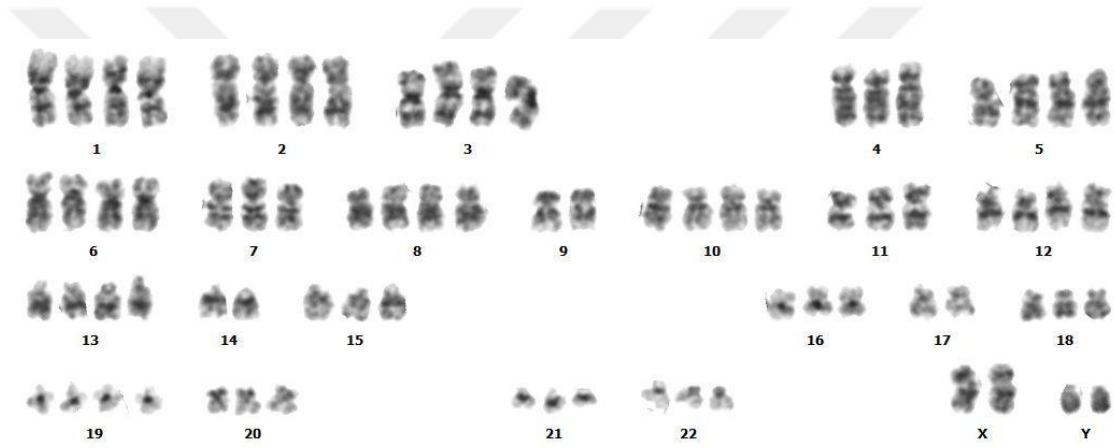
Fizik muayenesinde tartısı 87 p (+1.15 SDS), boyu 98 p (+2.2 SDS) ve baş çevresi 18 p (-0.88 SDS) olarak hesaplandı. Strabismus, lateralde seyrek kaşlar, uzun kirpikler, belirgin burun kemeri, antevort burun delikleri, kısa kolumella, minimal mikrognati, düşük ve arkaya yerleşimli kulaklar izlendi. Olguda atopik dermatit, sakral bölgede dermal melanozis, el ve ayakta fetal parmak yastıkçıkları mevcuttu. Genital muayenesinde testisler bilateral skrotumdaydı. Kardiyak değerlendirmesi normal olup EKO'su normal saptandı. Tüm abdomen USG ve beyin BT normal saptandı.

Olgunun rutin bakılan kan değerlerinde lökositoz ve trombositopeni saptanmış (Aralıklı olarak bakılan beyaz küresi 25500/μl ve 32000/μl [4300-10300/μl], platelet değeri 17000/μl [150000-400000/μl]). Alınan beyin omurilik sıvısından (BOS) yapılan yaymalarda kanamalı zeminde atipik parçalı görünümde kromatin paterni kabalaşmış hücreler, bir kısmı dejenere nötrofil lökositler ve arada seyrek lenfomonositer hücreler izlendi. Periferik yaymasında atipik hücreler saptandı. JMML ön tanısıyla değerlendirilen olgunun kemik iliği örneğinden çalışılan kromozom analizinde 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13 ve 19. kromozomlar tetrazomik ve 4, 7, 11, 15, 16, 18, 20, 21 ve 22. kromozomlar trizomik, ayrıca gonozomal kromozomlarda XXYY paterni izlendi (Şekil 4.11).

Akabinde çalışılan pediatrik AML FISH panelinde % 20 oranında trizomi 5 ve % 20 oranında tetrazomi 5; % 15 oranında trizomi 7 ve % 15 oranında tetrazomi 7 gözlemlendi.

Kontrollerinde olgunun nötrofil değeri 500/μl olarak saptandı ve tekrarlayan ateş, öksürük ve pnömoni şikayetleri olmaktadır. Tekrarlayan ishal atakları devam etmekteydi. Son hastaneye yatışı alt solunum yolu enfeksiyonu nedeni olmuştu. JMML ile takipli olguda AML'ye dönüşüm olmuştu ve genel durumu kötüydü. Solunum sıkıntısı da gözlenen olgu solunum yetmezliği nedeniyle 1 yaş 6 aylıkken eksitus olmuştu.

Çalışılan RASopati panel testi sonucunda *NRAS* geninde c.34G>A (p.G12S) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı, sonucu Noonan sendromu tip 6 olarak kesinleşti.



Şekil 4.15. Kemik iliği örneğinden çalışılan karyotip analizi



Şekil 4.16. Olgu 50'nin BAM formatında *reverse* dizi NGS analiz görüntüsü (*NRAS*)

Olgu 51

11 yaş 2 aylık, aralarında akrabalık bulunmayan baba (44 yaş) ve annenin (51 yaş) 6 gebeliğinden sonuncusu olarak (G6P6) doğan erkek olgu, boy kısalığı ve sendromik görünüm nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Annede guatr, babada psikoz, bilişsel gerilik ve ablada epilepsi öyküsü olduğu öğrenildi. Nöromotor gelişimi yaşitlarıyla uyumlu olup ders başarısı kötüydü, öğrenme güçlüğü ve birkaç kez febril konvülsiyon öyküsü mevcuttu. Yapılan fizik muayenesinde tartısı <3 p (-2.66 SDS), boyu <3 p (-3.11 SDS), baş çevresi <3 p (-2.14 SDS) idi. Üçgen yüz yapısı, hipertelorizm, derin yerleşimli gözler, yüksek damak, minimal mikrognati, düşük ve arkaya yerleşimli kulaklar gözlemlendi. Kısa ve yele boyun, düşük omuzlar, kısa 5. parmak orta falanksı, minimal pektus ekskavatum, postnatal büyüme ve gelişme geriliği saptandı. Ağzı açık uyuma, horlama şikayetiyle gittiği kulak-burun-boğaz muayenesinde nazal septum sağa deviye, tonsiller grade 3, adenoid % 40 olarak değerlendirildi. Göz muayenesinde glokom izlendi. Kardiyovasküler sistem muayenesi normal saptanmış olup EKO'su normaldi, EKG'de normal sinüs ritmi gözlemlendi. Kraniyal MRG normal izlendi. Büyüme gelişme geriliği mevcut olgunun kemik yaşı 2 yaş geriden takip etmekteydi. Epifizleri açık olan olguya BH tedavisi başlandı. Olguda olası hematolojik patolojiler açısından çalışılan koagülasyon parametrelerinden; FV, FVII, FVIII, FIX, FXI, FXII, FXIII, antitrombin III, protein S normal saptanırken protein C hafif düşük (% 62.8 [70-140]) olarak saptandı. Çekilen renal doppler USG normal sonuçlandı.

Periferik kandan çalışılan kromozom analizi 46,XY olarak sonuçlandı. Noonan sendromu ön tanısıyla değerlendirilen olgudan istenen panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.853T>C (p.F285L) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Olguda saptanan varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı ve kesin tanı Noonan sendromu tip 1 olarak belirlendi. Ebeveynlerden Sanger dizileme yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı.

Olgu 52

1. derece kuzen evliliğinden doğan (anne 33 yaşında, baba 34 yaşında) 6 yaş 1 aylık erkek olgu, boy kısalığı ve sendromik görünüm nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Olgumuz 2 gebeliği olan annenin ilk çocuğuydu (G2P2). Babada boy kısalığı (167 cm) ve silik dismorfik bulgular mevcuttu. Antenatal USG takiplerinde üst ve alt ekstremitelerde kısalık saptanmıştı. Postnatal muayenede üst ve alt ekstremitelerde

kısalık teyit edilmişti. Nöromotor gelişim basamakları yaşlılarıyla uyumluydu. Olgunun fizik muayenesinde tartısı <3 p (-2.37 SDS), boyu <3 p (-4.64 SDS), baş çevresi 28 p (-0.57 SDS) olarak ölçüldü. Pektus ekskavatum deformitesi mevcuttu. Hipertelorizm, basık burun kökü, antevort burun delikleri, uzun filtrum, ince üst dudak, düşük kulaklar saptandı. Kısa ve yeke boyun ve elde brakidaktili izlendi. Olguda postnatal büyüme ve gelişme geriliği mevcuttu. Göz muayenesinde strabismus, ambliyopi ve miyopi saptandı. Kemik surveyde bilateral femur proksimal epifizleri hipoplazik olarak değerlendirildi. Kemik yaşı 2 yaş geriden takip etmekteydi. Büyüme hormonu eksikliği tanısı konulan olguya BH başlandı. Kardiyak muayenesinde patoloji gözlenmedi, EKO'su normaldi. Koagülasyon parametrelerinden FV, FVII, FXII, FXIII, protein C düzeyleri düşük izlendi. Periferik kandan çalışılan kromozom analizi 46, XY olarak sonuçlandı. RASopati panel testi sonucunda *SOS1* geninde c.1074+5G>T, heterozigot, ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen varyantı saptandı. Varyant Sanger yöntemiyle doğrulanmış olup tanı Noonan sendromu tip 4 olarak kesinleşti. Ebeveynlerden Sanger dizileme yöntemiyle çalışılan tek nokta mutasyon analizinde anne normal olarak sonuçlandı, babada aynı heterozigot varyant saptandı.

Babanın klinik bulguları daha silik olmakla beraber Noonan sendromu tip 4 ile uyumluydu. Boy kısalığı mevcuttu. İnguinal herniden dolayı opere olmuştu. Operasyon sırasında herhangi bir kanama bozukluğu tespit edilmemişti. Fasiyal dismorfizmi (belirgin ve keçe kulaklar, kaba yüz görünümü, sağ lomber bölgede CALM) mevcuttu.



Şekil 4.17. Olgu 52'nin BAM formatında *reverse* dizi NGS analiz görüntüsü (*SOS1*)

Olgu 53

13 yaş 7 aylık olgu, 1. derece kuzen evliliği yapmış 44 yaşındaki anne ve 45 yaşındaki babanın 6. çocuğu idi (G6P6). Nöromotor gelişim basamakları yaşitlarıyla uyumluydu. Öğrenme güçlüğü bulunmamaktaydı, ders başarısı orta düzeydeydi. EKO'da HKMP, sol ventrikül çıkım darlığı (LVOTO), sol atrium dilatasyonu, minimal MVP izlendi. Kemik surveyde kemik yapılarında belirgin osteopeni, sol tibia proksimal diyafiz medial kesimde benign kortikal defekt saptandı. Strabismus nedeniyle opere olmuştu. Ayrıca göz muayenesinde miyopi saptandı. Koagülasyon parametrelerinden Faktör VII % 55.3 (70-120), faktör V % 62.5 (70-120), protein S % 43.4 (60-130) olarak değerlendirildi. Torakolomber bölgede S şeklinde skolyoz ve torakal bölgede kifoz izlendi. Yapılan fizik muayenesinde; tartısı <3 p (-4.45 SDS), boyu <3 p (-5.56 SDS) ve baş çevresi 3.36 p (-1.83 SDS) olarak ölçüldü. Büyüme ve gelişme geriliği mevcuttu. *Puffy eyes*, düşük kulaklar, yele boyun, pektus karinatum, elde bilateral 5. parmakta klinodaktili ve elde verrular saptandı. Parmak ucunda yürümesi, bilateral aşıl tendonunda kısalık ve pes ekinovarus mevcuttu, bilateral ayak bileği dorsifleksiyonu kısıtlıydı. Ayak parmaklarında brakidaktili izlendi.

Periferik kandan kromozom analizi 46,XX olarak, moleküler karyotipleme (8×60K) normal sonuçlandı. Ön tanıda düşünülen multipl lentiginlerle giden Noonan sendromu açısından istenen panel test sonucunda *RAF1* geninde c.770C>T (p.S257L), heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanarak olgunun tanısı MLNS tip 2 olarak kesinleşti. Ebeveynlerden çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı.



Şekil 4.18. Olgu 53'ün BAM formatında *reverse* dizi NGS analiz görüntüsü (*RAF1*)

Olgu 54

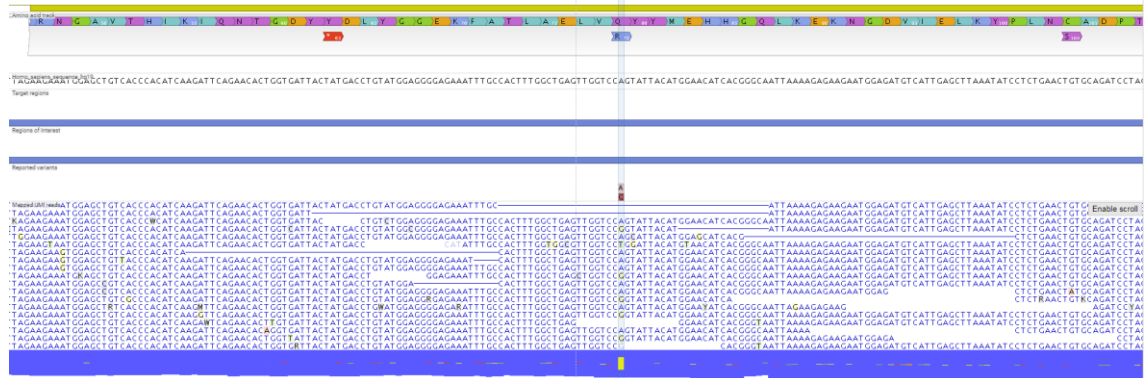
31 yaşında erkek olgu, 1. derece kuzen evliliği yapmış anne (48 yaş) ve babanın (56 yaş) 6. çocuğuydu (G6P6). Olgunun eşinin 40 GH doğum sonrası mekonyum aspirasyonu nedeniyle postnatal kalp atımı durmuş, eksitus çocuk öyküsü olduğu öğrenildi. Ayrıca olgu tarafımıza başvurduğunda eşinin 12 GH gebelik öyküsü mevcuttu. Olgunun antropometrik ölçümlerinden tartısı <3 p (-2.03 SDS), boyu <3 p (-2.63 SDS), baş çevresi 12 p (-1.13 SDS) olarak hesaplandı. Hipertelorizm, sağ gözde pitozis, geniş burun köprüsü, geniş filtrum, yüksek damak, minimal retrognati, skolyoz gözlendi. Kardiyak problemlerden dolayı kullandığı ilaçlar nedeniyle 30 yaşındayken kronik böbrek yetmezliği gelişmişti. Ancak kontrol EKO'sunda normal sol ventrikül sistolik fonksiyonu saptandı. Göz muayenesinde miyopi ve konjenital strabismus izlendi. Ayrıca ara ara kabızlık ve şişkinlik şikayeti olmaktaydı. Olgudan çalışılan panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.205G>C (p.E69Q) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı ve tanı Noonan sendromu tip 1 olarak kesinleşti. Anne ve babadan çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı.

Olguya tanı konduğunda eşi gebe olmasına rağmen prenatal tanı istemediğini belirtti. Postnatal 3 ay 27 günlükken yapılan muayenede tartısı 3 p (-1.8 SD), boyu <3 p, -2.49 SD), baş çevresi <3 p (-3.58 SD) olarak hesaplandı. Strabismus, hipertelorizm, basık burun kökü, antevort burun delikleri, çadır şeklinde üst dudak, yüksek damak mevcuttu. Ayak parmaklarında fetal parmak yastıkçıkları gözlendi. Omfalosel nedeniyle opere olmuştu. Genital muayenede sağda kriptorşidizm, solda hidrosel izlendi. Yapılan ekokardiyografik değerlendirme normal olarak saptandı. Lomber bölgede açıklığı sağa bakan skolyoz gözlendi. Çalışılan tek nokta mutasyon analizi sonucunda babasında saptanan varyant doğrulandı ve tanı Noonan sendromu tip 1 olarak kesinleşti.

Olgu 55

12 yaş 1 aylık olgu, aralarında akrabalık olmayan 45 yaşındaki baba ile 37 yaşındaki annenin 3 gebeliğinden ilk çocuklarıydı (G3P3). Annede hipotiroidi tanısı mevcuttu. Postnatal başlangıçlı büyüme ve gelişme geriliği gözlenmişti. Okul başarısının iyi olduğu öğrenildi. Antropometrik ölçümlerinden tartısı <3 p (-2.54 SDS), boyu <3 p (-2.22 SDS) ve baş çevresi <3 p (-2.67 SDS) olarak ölçüldü. Üçgen yüz, pitozis, aşağı çekik palpebral fissürler, düşük ve arkaya yerleşimli kulaklar, yüksek damak, düşük arka saç çizgisi izlendi. Kısa ve yele boyun, üstte pektus karinatum altta pektus ekskavatum deformitesi, toraksta asimetri, skapular asimetri, ayırık meme başları, el ve ayak

parmaklarında araknodaktili, sağ el ve ayak 5. parmakta klinodaktili, ayak 4. ve 5. parmaklarında medial deviasyon saptandı. İleri derecede skolyoz mevcuttu. İşitme muayenesi normal iken göz muayenesinde strabismus ve optik atrofiye gidış gözlendi. Koagülasyon parametrelerinden FVII % 61.5 (70-120), FXII % 41.9 (70-150), FXI % 48.3 (50-150), protein C % 63.8 (70-140), protein S % 44.8 (60-130) olarak saptandı. EKO'da hafif PS ve servikal aortik ark mevcuttu. Sol ventrikül sistolik fonksiyonları normaldi. RASopati panel testi sonucunda *PTPN11* geninde c.236A>G (p.Q79R) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Olgudaki varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanarak klinik tanısı Noonan sendromu tip 1 olarak kesinleştirildi. Anneden çalışılan tek nokta mutasyon analizi normal sonuçlandı. Babadan segregasyon analizi planlandı. Tüm batın USG'de patoloji saptanmadı. Kraniyal ve hipofiz MRG bulguları normaldi.



Şekil 4.19. Olgu 55'in BAM formatında *forward* dizi NGS analiz görüntüsü (*PTPN11*)

Olgu 56

6 yaş 4 aylık kız olgu, aralarında akrabalık bulunmayan ebeveynlerin 3. çocuğu idi (G3P3). Postnatal dönemde büyüme ve gelişme geriliği ve nöromotor gelişim basamaklarında gecikme gözlendi. Ayrıca artikülasyon problemi mevcuttu. Fizik muayenede kalpte üfürüm tespit edilmiş, yapılan EKO'da VSD ve PS varlığı doğrulanmıştı. 5 yaşında kalp defekti nedeniyle opere olmuştu. Yapılan fizik muayenede tartısı <3 p (-2.97 SDS), boyu <3 p (-4.54 SDS) ve baş çevresi <3 p (-3.98 SDS) olarak saptandı. Üçgen yüz yapısı, yünlü saç paterni, hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, karmaşık dişler, hipodonti, düşük ve arkaya yerleşimli kulaklar, derin ve oluklu filtrum izlendi. Kısa boyun, torakal asimetri, elde brakidaktili ve distal interfalangeal

eklemlerde laksisite artışı, dizlerde bilateral ekstansiyon ve laksisite artışı gözlemlendi. Olguda çabuk morarma öyküsü mevcuttu. Koagülasyon parametrelerinden; FV, FVIII, FIX, FXI, FXII, antitrombin 3, protein C, protein S normal değerlerde saptanırken FVII % 68.6 (70-120), FXIII % 60.9 (70-140) olarak saptandı. Boy kısalığı için BH tedavisi almaktaydı. Tüm abdomen USG'de herhangi patoloji saptanmadı. İşitme ve görme muayenesi normal sonuçlandı. Kranial MRG normal olup spinal MRG'de lomber lordoz düzleşmiş olarak izlendi. İstenen panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.182A>G (p.D61G) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptanarak Noonan sendromu tip 1 tanısı kesinleşti. Olgudaki varyant Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Ebeveynlerden yapılan segregasyon analizi sonucunda anne ve baba normal saptandı.

Olgu 57

3 ay 28 günlük erkek olgunun annesinde 8. GH'da 2 abortus öyküsü mevcuttu (G8P6A2). Doğduğunda ağlaması olmaması ve morarma görülmesi üzerine 37 gün yenidoğan yoğun bakım ünitesinde interne edildi. Ağlaması ve emmesi zayıftı. Henüz baş tutması mevcut değildi. Fizik muayenede tartısı <3 p (-3.92 SDS), boyu <3 p (-3.43 SDS) ve baş çevresi <3 p (-5.04 SDS) olarak ölçüldü. Hipotoni, solunum sıkıntısı, kuru cilt, aşağı çekik palpebral fissürler, mikrognati, düşük kulaklar ve pektus ekskavatum izlendi. Genital muayenede hipospadias ve inmemiş testis gözlemlendi. EKO'sunda PFO ve VSD saptandı. Kranial MRG'de bilateral lateral ventriküller hafif dilate görünümdeydi. Göz muayenesinde patoloji saptanmadı. RASopati paneli sonucunda *SOS2* geninde c.2690A>G (p.Lys897Arg) heterozigot, ACMG kriterlerine göre VUS varyantı saptandı. Yapılan klinik korelasyon sonucunda tanı Noonan sendromu tip 9 olarak kesinleşti.

Olgu 58

19 yaşındaki kız olgunun ebeveynleri arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. 7 kardeşi olan olgunun bir kız kardeşi 1.5 yaşında eksitus olmuştu. Kardiyoloji tarafından HKMP, LVOTO, PS nedeniyle takipliydi. Fizik muayenesinde tartısı 15 p (-1.02 SDS), boyu 55 p (0.15 SDS) ve baş çevresi <3 p (-2.92 SDS) olarak ölçüldü. Hipertelorizm, pitozis, strabismus, omuz düşüklüğü ve pektus karinatum izlendi. Çalışılan panel test sonucunda *SOS1* geninde c.1654A>G (p.R552G) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Tanı Noonan sendromu tip 4 olarak doğrulandı.

Olgu 59

4 yaş kadın olgunun ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Olgunun kardeşinde kardiyak patoloji olup operasyon öyküsü mevcuttu. Kraniyal MRG normal saptandı. Olguda ön tanıda Noonan sendromu düşünülerek çalışılan panel test sonucunda *PTPN11* geninde c.417G>C (p.E139D) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı ve kesin tanı Noonan sendromu tip 1 olarak kesinleştirildi.

Olgu 60

39 yaş kadın olgunun süregelen 24+2 GH gebeliğinde (G4P3Y3A0) yapılan kontrol muayenelerinde fetal anomali düşünüldü. Yapılan transabdominal USG’inde bilateral plevral efüzyon, hafif TY ve tek umbilikal arter izlendi. Antenatal muayenede polihidramniyoz, NT artışı, hidrops fetalis mevcut olan fetusta yapılan amniyosentez ile çalışılan RASopati panel testi sonucunda, *RIT1* geninde c.246T>G (p.F82L) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Sonuç Noonan sendromu tip 8 ile uyumlu olarak değerlendirildi. Aile gebelik terminasyonu istemediğinden postnatal muayene önerildi.

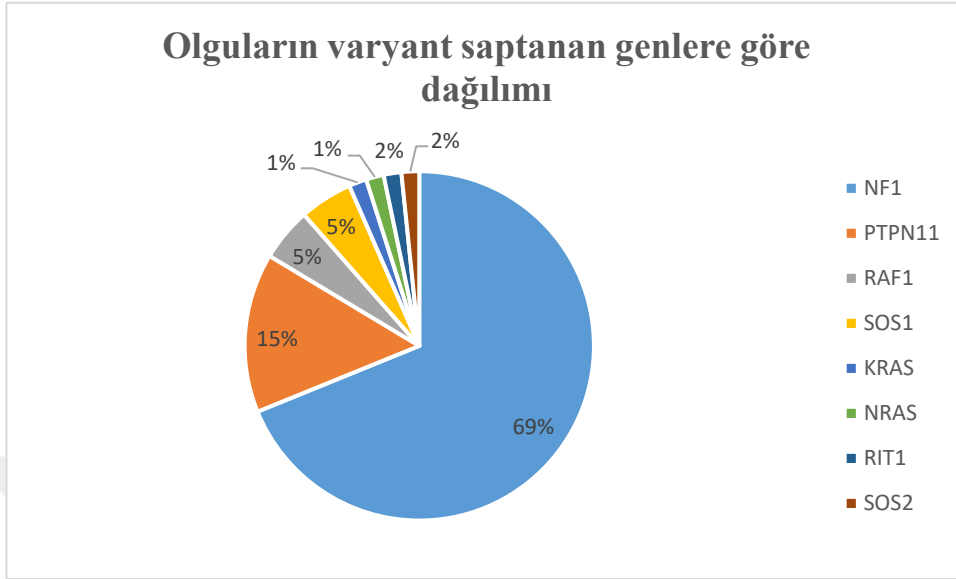
Olgu 61

37 yaş kadın olgunun süregelen 11+6 GH gebeliğinde (G4P3Y3A0) fetusta tüm boynu ve kafayı halo tarzında içine alan geniş septalı kistik higroma saptandı. 18 yıllık evli olan bireyler arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. Aile öyküsünde herhangi bir özellik bulunmamaktaydı. İn vitro fertilizasyon yöntemiyle oluşmuş bir gebelik olduğu öğrenildi. Annenin gebelikte antibiyotik kullanım öyküsü mevcuttu. RASopati ön tanısıyla çalışılan panel test sonucunda *RAF1* geninde c.770C>T (p.S257L) heterozigot, ACMG kriterlerine göre patojenik varyantı saptandı. Terminasyon istemeyen aileye postnatal muayene önerildi.

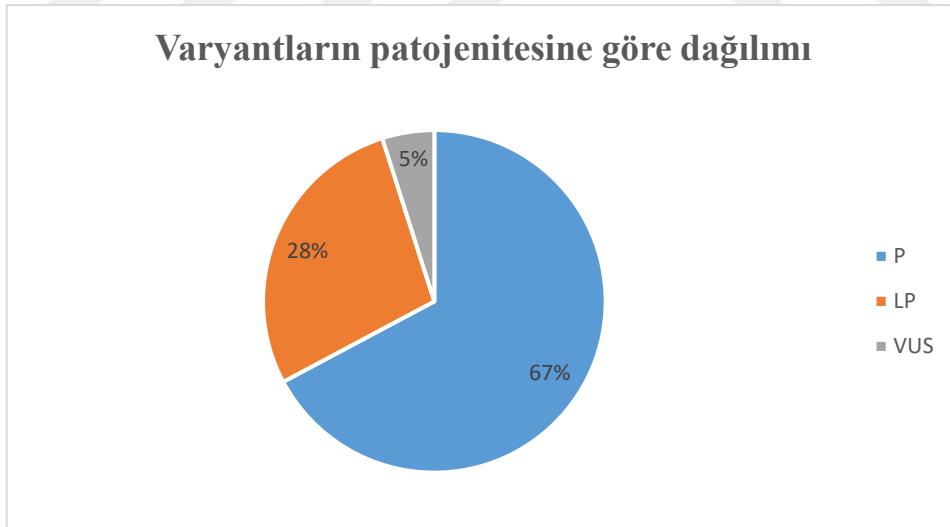
4.3. Olguların Moleküler Analiz Sonuçları

İndeks olguların 42 tanesinde (41 farklı varyant) *NF1* geninde, 9 olguda *PTPN11* geninde 7 farklı varyant, 3 olguda *RAF1* geninde 2 farklı varyant, 3 olguda *SOS1* geninde, 1 olguda *KRAS*, 1 olguda *NRAS*, 1 olguda *SOS2* ve 1 olguda *RIT1* geninde varyant saptandı (Şekil 4.20). Saptanan varyantlar ACMG kriterlerine göre değerlendirildiğinde

41 tanesinin patojenik (Class I), 17 tanesinin muhtemel patojenik (Class II) ve 3 tanesinin klinik önemi bilinmeyen (Class III) sınıflamada olduğu belirlendi (Şekil 4.21).



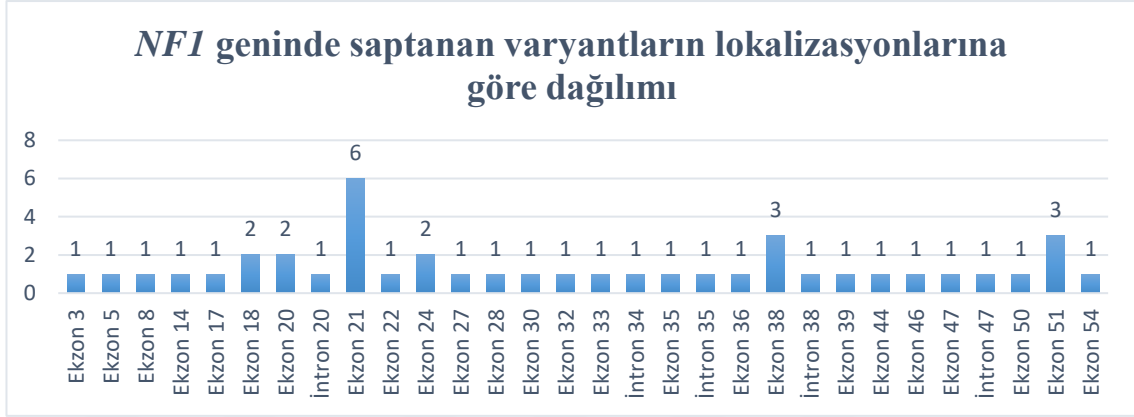
Şekil 4.20. Olguların varyant saptanan genlere göre dağılımı



Şekil 4.21. Olgularda saptanan varyantların patojenitesine göre dağılımı

NF1 geninde saptanan varyantların çoğunluğu ekzon 21’de yer almaktayken *PTPN11* genindeki varyantların çoğunluğu ekzon 3 üzerindedir (Şekil 4.22 ve şekil 4.23). *RAF1* geninde saptanan 3 varyantın tamamı ekzon 7 üzerinde yer almaktaydı, bunlardan

2 tanesi aynı varyanttı. *SOS1* geni üzerindeki tüm varyantlar farklı lokalizasyonlarda bulunmaktaydı (ekzon 10, ekzon 16 ve intron 8 üzerinde). *KRAS* genindeki varyant ekzon 2 üzerinde, *NRAS* genindeki varyant ekzon 2’de, *SOS2* genindeki varyant ekzon 17’de ve *RIT1* genindeki varyant ekzon 5 üzerinde yer almaktaydı.



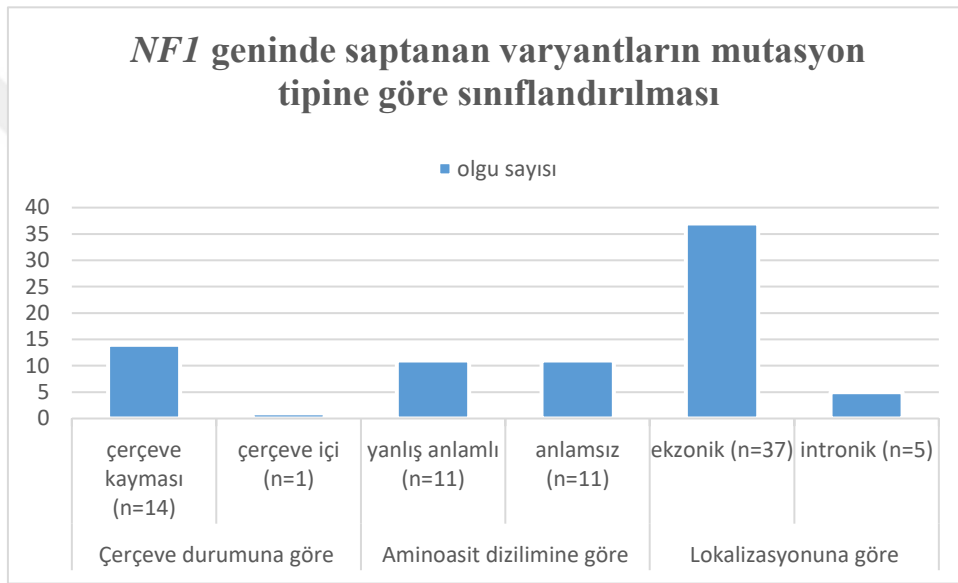
Şekil 4.22. *NF1* geninde saptanan varyantların lokalizasyonlarına göre dağılımı



Şekil 4.23. *PTPN11* geninde saptanan varyantların lokalizasyonlarına göre dağılımı. Ekzon 4’teki varyantlar farklı olgulardaki aynı varyantlardı. Ekzon 3’te bulunan mutasyonların 2 tanesi aynı varyanta sahip farklı olgulardan kaynaklanmaktaydı.

NF1 geninde saptanan mutasyonların 14 tanesi çerçeve kayması iken 1 tanesi çerçeve içi mutasyonuydu. Aminoasit dizilimine göre değerlendirildiğinde 11’i yanlış anlamlı, 11’i anlamsız mutasyonlardı. Lokalizasyonuna göre ise 37 tanesi ekzonik, 5 tanesi intronik karakterdeydi (Şekil 4.24). Ayrıca mutasyonların 6 tanesi *splice* bölgede yer almakta olup bunların 5’i intronik, 1’i ekzonik mutasyondur.

SOS1 genindeki varyantların 2’si aynı olup bunlar yanlış anlamlı iken diğer varyant ise *splice* bölgeyi etkileyen intronik bir varyanttı. *PTPN11*, *RAF1* (3 varyanttan 2 tanesi aynıydı), *KRAS*, *NRAS*, *SOS2* ve *RIT1* genlerindeki tüm varyantlar yanlış anlamlı olarak saptandı (Tablo 4.3).



Şekil 4.24. *NF1* geninde saptanan varyantların mutasyon tipine göre sınıflandırılması

Tablo 4.3. Olguların mutasyon tipine göre dağılımı

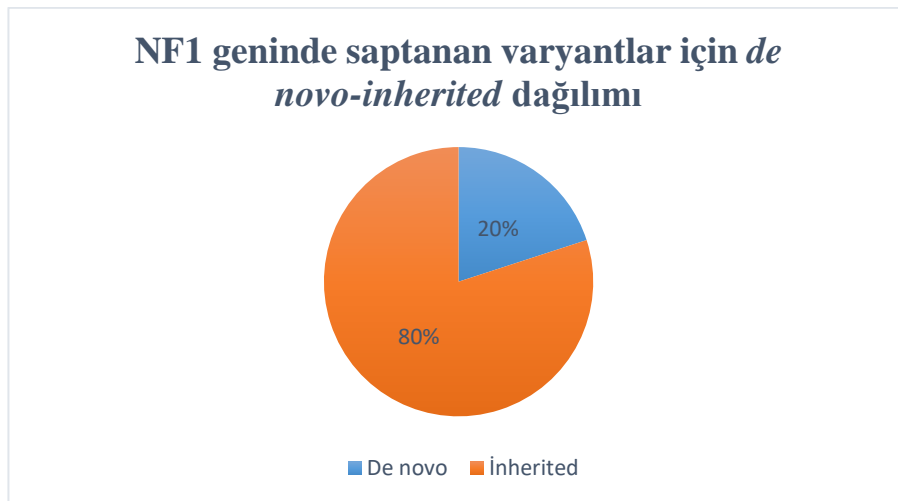
Mutasyon tipi	Aminoasit dizilimine göre		Çerçeve durumuna göre		Lokalizasyonuna göre	
	Yanlış anlamlı	Anlamsız	Çerçeve içi	Çerçeve dışı	Ekzonik	İntronik
Olgu sayısı	29	11	1	14	55	6

Daha önce literatürde bildirilmemiş (novel) mutasyon sayısı 20 olarak saptandı. Bunların 19 tanesi *NF1* geninde iken 1 tanesi *SOS1* geninde yer almaktaydı. Kalan 41 varyant daha önce literatürde bildirilmiş olan varyantlardı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Novel ve literatürde daha önce bildirilmiş varyantların genlere göre dağılımı

NF1 olgularında yeterli bilgi edinilen 25 olgunun 20'sinde (% 80) varyant 1.derece akrabalarından en az birinde gözlenirken 5 olguda (% 20) varyant sadece probandda (*de novo*) gözlenmiştir (Şekil 4.26). NF1 dışında kalan olgular için bilgi sahibi olduğumuz 10 olgunun 8'i varyanta *de novo* olarak sahip olurken 2 olguda ebeveynlerde aynı varyant saptanmıştır.



Şekil 4.26. *NF1* geninde saptanan varyantlar için *de novo*-inherited dağılımı

Tablo 4.4. Saptanan varyantların moleküler özellikleri

Olgu	Varyant	Tipi	gnomAD	Zigosite	ACMG*	dbSNP (rs no)	Literatür	In silico veri tabanları	Lokalizasyonu
1	NF1(NM_0010424 92.3):c.3529dup (p.A1177fs*18)	Çerçeve kayması, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 27, fonksiyonel domainlerin dışında
2	NF1(NM_0010424 92.3):c.4725-2A>G	İntronik, splice bölge	% 0	het	P	-	(179), (180), (181), (22)	ClinVar (VCF001073883.1): P, CADD: 36 (zararlı), MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	İntron 35
3	NF1(NM_0010424 92.3):c.4084C>T (p. R1362*)	Anlamsız	% 0	het	P	rs1378545 60	(182), (22), (183), (184)	ClinVar (VCF000000344.18): P, CADD: 38 (zararlı), SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 30
4	NF1(NM_0010424 92.3):c.2352G>C (p. W784C)	Yanlış anlamlı	% 0	het	P	rs1994747 78	(185)	ClinVar (VCF000068319.3): P/LP, CADD: 29.2 (zararlı), SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 20
5	NF1(NM_0010424 92.3):c.2498_2501del (p.S833Yfs*7)	Çerçeve kayması	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 21
6	NF1(NM_0010424 92.3):c.795del (p.V266Ffs*15)	Çerçeve kayması	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 8

7	NF1(NM_0010424 92.3):c.2850G>T (p.Q950H)	Yanlış anlamlı, <i>splice</i> bölge	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: 32 (zararlı), SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 21
8	NF1(NM_0010424 92.3):c.2850G>T (p.Q950H)	Yanlış anlamlı, <i>splice</i> bölge	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: 32 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 21
9	NF1(NM_0010424 92.3):c.4522C>G (H1508D)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	rs1393895 345	-	ClinVar (VCV000996411.1): VUS, CADD: 32 (zararlı), PolyPhen: muhtemelen zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 33, RasGAP domaininde
10	NF1(NM_0010424 92.3):c.1885G>A (G629R)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs1994747 38	(186), (187), (188)	ClinVar (VCV000068308.23): P, CADD: 32 (zararlı), PolyPhen: muhtemelen zarar verici, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 17
11	NF1(NM_0010424 92.3):c.6950G>A (W2317*)	Anlamsız, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs2069790 543	-	ClinVar (VCV000848870.2): P, CADD: 44 (zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 47, fonksiyonel domainlerin dışında
12	NF1(NM_0010424 92.3):c.4577+2dup	İntronik, <i>splice</i> bölge, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	rs2067666 266	-	ClinVar (VCV000846370.2): VUS, CADD:-, PolyPhen:-, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	İntron 34

13	NF1(NM_0010424 92.3):c.2540T>C (L847P)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs1994747 47	(188), (189), (190), (191), (192), (193), (194)	ClinVar (VCV000068323.22): P/LP, CADD: 26.7 (zararlı), PolyPhen: muhtemelen zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 21
14	NF1(NM_0010424 92.3):c.248A>C (p. Q83P)	Yanlış anlamlı	% 0	het	P	rs1060500 360	(22)	ClinVar (VCV000641956.1): P, CADD: 25.5 (zararlı), SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 3
15	NF1(NM_0010424 92.3):c.7909C>T (R2637*)	Anlamsız, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs7862013 67	(195), (191), (196), (197), (198)	ClinVar (VCV000184261.19): P/LP, CADD: 39 (zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 54, fonksiyonel domainlerin dışında
16	NF1(NM_0010424 92.3):c.5570del (p. I1857Tfs*6)	Çerçeve kayması	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: - SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 38
17	NF1(NM_0010424 92.3):c.5768C>G (T1923R)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	rs7862038 24	(199), (91)	ClinVar (VCV000404539.4): LP/VUS, CADD: 32 (zararlı), PolyPhen: muhtemelen zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 39
18	NF1(NM_0010424 92.3):c.2110_2111d up (V705Wfs*44)	Çerçeve kayması, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 18
19	NF1(NM_0010424 92.3):c.5552dup (G1852Wfs*10)	Çerçeve kayması, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	-	(179), (200)	ClinVar: -, CADD: 34 (zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 38

20	NF1(NM_0010424 92.3):c.3739_3742del (F1247Ifs*18)	Çerçeve kayması, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs1064794 276	(201), (22), (179), (200), (202)	ClinVar (VCV000420078.10): P, CADD: 33 (zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 28, RasGAP domaininde
21	NF1(NM_0010424 92.3):c.7468G>T (E2490*)	Anlamsız, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: 48 (zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 51
22	NF1(NM_0010424 92.3):c.4217_4220del (G1406_S1407delin sV)	Çerçeve içi, fonksiyon kaybı	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: polimorfizm	Ekzon 32, RasGAP domaininde
23	NF1(NM_0010424 92.3):c.2542G>C (G848R)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs1060500 368	(203), (204), (205), (206), (207), (208), (209), (210), (211), (212)	ClinVar (VCV000404588.7): P/LP, CADD: 26.9 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 21
24	NF1(NM_0010424 92.3):c.6664A>G (T2222A)	Yanlış anlamlı	% 0.00005	het	VUS	rs7459454 81	(213)	ClinVar (VCV000185829.12): VUS/LB, CADD: 16.7 (muhtemelen zararlı), PolyPhen: B, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 44
25	NF1(NM_0010424 92.3):c.3152del (G1051Efs*11)	Çerçeve kayması	% 0	het	P	-	-	ClinVar (VCV001685975.1): P, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 24

26	NF1(NM_0010424 92.3):c.574C>T (R192*)	Anlamsız	% 0	het	P	rs3975146 41	(214), (215), (216), (217), (188), (218), (207), (219), (191)	ClinVar (VCV000040093.22): P, CADD: 35 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 5
27	NF1(NM_0010424 92.3):c.5610-2A>G	İntronik, <i>splice</i> bölge	% 0	het	P	rs1135402 876	(199), (22), (181), (220)	ClinVar (VCV000457756.1): LP, CADD: 34 (zararlı), SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	İntron 38
28	NF1(NM_0010424 92.3):c.1541_1542d el (Q514Rfs*43)	Çerçeve kayması, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs2676066 00	(221), (200), (222), (223), (224), (225)	ClinVar (VCV000000346.34): P, CADD: 29.3 (zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 14
29	NF1(NM_0010424 92.3):c.7062+2T>G	İntronik, <i>splice</i> bölge	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: 33, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	İntron 47
30	NF1(NM_0010424 92.3):c.2071_2074d up (Y692Sfs*9)	Çerçeve kayması	% 0	het	P	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 18
31	NF1:(NM_0010424 92.3):c.2409+2dup	İntronik, <i>splice</i> bölge	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: -	İntron 20
32	NF1:(NM_0010424 92.3):c.3132C>A (Y1044*)	Anlamsız	% 0	het	P	-	-	ClinVar (VCV001366138.1): P, CADD: 36 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 24

33	NF1:(NM_0010424 92.3):c.7439_7451del (H2480Pfs*5)	Çerçeve kayması	% 0	het	P	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: -	Ekzon 50
34	NF1:(NM_0010424 92.3):c.2329T>A (W777R)	Yanlış anlamlı	% 0	het	P	rs8766588 53	(226), (227), (228), (229), (230), (231)	ClinVar (VCV000230937.6): LP, CADD: 22.2 (zararlı), SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 20
35	NF1:(NM_0010424 92.3):c.2503C>T (Q835*)	Anlamsız	% 0	het	P	rs1555614 207	(232)	ClinVar (VCV000523904.4): P, CADD: 37 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 21
36	NF1:(NM_0010424 92.3):c.2880dup (V961Cfs*14)	Çerçeve kayması	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: -, SIFT: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 22
37	NF1:(NM_0010424 92.3):c.5352T>A (Y1784*)	Anlamsız	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, CADD: 38 (zararlı), SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 38
38	NF1:(NM_0010424 92.3):c.4783C>T (Q1595*)	Anlamsız	% 0	het	P	rs1597753 263	(202)	ClinVar (VCV000649568.3): P, CADD: 41 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 36
39	NF1:(NM_0010424 92.3):c.6852_6855del (Y2285Tfs*5)	Çerçeve kayması	% 0	het	P	rs1555535 032	(233), (234)	ClinVar (VCV000216866.19): P, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 46
40	NF1:(NM_0010424 92.3):c.4600C>T (R1534*)	Anlamsız	% 0	het	P	rs7607035 05	(228), (235), (236), (237), (238), (239), (240), (241)	ClinVar (VCV000220152.38): P/LP, CADD: 37 (zararlı), SIFT: zarar	Ekzon 35

								verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	
41	NF1(NM_0010424 92.3):c.7570del (L2524Wfs*24)	Çerçeve kayması	% 0	het	LP	-	-	ClinVar: -, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 51
42	NF1(NM_0010424 92.3):c.7549C>T (R2517*)	Anlamsız	% 0	het	P	rs8664451 27	(242), (243), (244), (245), (246), (22), (247), (238)	ClinVar (VCV000230467.47): P, CADD: 40 (zararlı), MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 51
43	RAF1(NM_002880. 4):c.782C>T (p.P261L)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs3975168 28	(29), (248), (231), (249), (250), (251)	ClinVar (VCV000120246.9): P/LP, CADD: 26.6 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 7
44	KRAS(NM_004985 .5):c.40G>A (p.V14I)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs1048943 65	(30), (252), (40), (253), (254), (255), (256)	ClinVar (VCV000012589.31): P, CADD: 26.1 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 2, P- loop_NTPase domaininde
45	PTPN11(NM_0028 34.5):c.417G>C (p.E139D)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs3975075 20	(35), (257), (258), (259), (260), (261), (262), (254), (122), (263), (264), (256)	ClinVar (VCV000040513.37): P, CADD: 25.0 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 4, SH2 domaininde
46	PTPN11(NM_0028 34.5):c.922A>G (p.N308D)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0.003	het	P	rs2893338 6	(25), (35), (265), (266), (258), (259), (112), (267), (268), (264), (269), (270), (271),	ClinVar (VCV000013326.66): P, CADD: 23.6 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: zarar verici , MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 8, PTPc domaininde

							(272), (273), (274), (256), (195)		
47	PTPN11(NM_002834.5):c.182A>G (p.D61G)	Yanlış anlamlı	% 0	het	P	rs121918461	(25), (275), (265), (276), (254), (277), (260), (278), (259), (279)	ClinVar (VCV000013330.28): P, CADD: 28.2 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 3
48	SOS1(NM_005633.4):c.2536G>A (p.E846K)	Yanlış anlamlı	% 0	het	P	rs397517159	(26), (27), (280), (281), (282), (256), (283)	ClinVar (VCV000040706.18):P, CADD: 25.9 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 16
49	PTPN11(NM_002834.5):c.844A>G (p.I282V)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs397507529	(25), (35), (257), (284), (259), (285), (264), (272)	ClinVar (VCV000040525.39): P, CADD: 23.4 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 7, PTPc domaininde
50	NRAS(NM_002524.5):c.34G>A (p.G12S)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs121913250	(286), (287), (288), (289), (290), (291), (292), (293), (31), (294), (295)	ClinVar (VCV000177778.12): P, CADD: 26.0 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 2, P- loop_NTPase domaininde
51	PTPN11(NM_002834.5):c.853T>C (p.F285L)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs397507531	(35), (296), (261), (297), (256), (298)	ClinVar (VCV000040528.21): P, CADD: 32.0 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 7, PTPc domaininde
52	SOS1(NM_005633.4):c.1074+5G>T	İntronik, <i>splice</i> bölge	% 0	het	VUS	-	-	ClinVar: -, CADD: 18.1 (muhtemelen zararlı), PolyPhen: -, SIFT: -,	İntron 8, fonksiyonel

								MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	domainlerin dışında
53	RAF1(NM_002880.4):c.770C>T (p.S257L)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs80338796	(28), (29), (248), (130), (299), (256), (300), (301)	ClinVar (VCV000013957.51): P, CADD: 24.6 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 7, CR2 domain
54	PTPN11(NM_002834.5):c.205G>C (p.E69Q)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kaybı	% 0	het	P	rs397507511	(257), (279), (302), (256)	ClinVar (VCV000040498.24): P, CADD: 25.5 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 3, SH2 domaininde
55	PTPN11(NM_002834.5):c.236A>G (p.Q79R)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs121918466	(25), (35), (303), (257), (266), (304), (305), (306), (260), (256)	ClinVar (VCV000013340.25): P, CADD: 26.0 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 3, SH2 domaininde
56	PTPN11(NM_002834.5):c.182A>G (p.D61G)	Yanlış anlamlı	% 0	het	P	rs121918461	(25), (275), (265), (276), (254), (277), (260), (278), (259), (279)	ClinVar (VCV000013330.28): P, CADD: 28.2 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 3
57	SOS2(NM_006939.4):c.2690A>G (p.K897R)	Yanlış anlamlı	% 0.000003	het	VUS	-	-	ClinVar: -, CADD: 13.8 (muhtemelen zararlı), SIFT: tolere edilebilir, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 17
58	SOS1(NM_005633.4):c.1654A>G (p.R552G)	Yanlış anlamlı	% 0.0004	het	P	rs137852814	(307), (26), (27), (280)	ClinVar (VCV000012871.31): P, CADD: 27 (zararlı), SIFT: zarar	Ekzon 10

								verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	
59	PTPN11(NM_002834.5):c.417G>C (p.E139D)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs3975075 20	(35), (257), (258), (259), (260), (261), (262), (254), (122), (263), (264), (256)	ClinVar (VCV000040513.37): P, CADD: 25.0 (zararlı), PolyPhen: muhtemel zarar verici, SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 4, SH2 domaininde
60	RIT1(NM_006912.6):c.246T>G (F82L)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs7308810 14	(308), (309), (310), (311), (312), (313)	ClinVar (VCV000181522.25): P/LP, CADD: 23.2 (zararlı), SIFT: zarar verici, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 5
61	RAF1(NM_002880.4):c.770C>T (p.S257L)	Yanlış anlamlı, fonksiyon kazanımı	% 0	het	P	rs8033879 6	(28), (29), (248), (130), (299), (256), (300), (301)	ClinVar (VCV000013957.51): P, CADD: 24.6 (zararlı), PolyPhen: B, SIFT: zararlı, MutationTaster: hastalık yapıcı mutasyon	Ekzon 7, CR2 domain

E: erkek, K: kadın, P: patojenik, LP: muhtemel patojenik, VUS: klinik önemi bilinmeyen mutasyon, LB: muhtemel benign, B: benign

*ACMG sınıflandırması *Qiagen QCI Interpret* ve *VarSome* veritabanı kriterlerine göre oluşturulmuştur.

5. TARTIŞMA

RASopati grubu hastalıklar en sık görülen sendrom gruplarından biri olup bu gruptaki hastalıklardan en sık gözleneni 1000-2500 canlı doğumda 1 görülme sıklığıyla Noonan sendromudur. Bunu 3000 doğumda 1 sıklığa sahip NF1 takip etmektedir (5, 6). Sık görülen bu sendrom grubunda sendrom tiplerinin dağılımında NF1 ve Noonan sendromu büyük çoğunluğu oluşturmaktadır. Bunun dışındaki RASopati tipleri daha nadir görülmektedir.

NF1 geni 58 ekzonlu ve 350 kb boyutta büyük bir gen olduğundan bu gen üzerinde çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır. Bunların % 85-90'ını nokta mutasyonları, % 5-10'unu mikrolezyonlar, % 2'sini de ekzon delesyonları ve replikasyonları oluşturmaktadır (190). *NF1* geninde saptanan patojenik varyantlar 2022 Ağustos ayında HGMD veritabanında 2852 olarak saptanmış olup 2852 varyantın 825'i yanlış anlamlı veya anlamsız, 444'ü *splice* bölge, 4 tanesi düzenleyici bölge, 781 tanesi küçük delesyonlar, 321 tanesi küçük insersiyonlar, 57'si küçük indel mutasyonları, 353'ü büyük delesyonlar, 51 tanesi büyük insersiyon veya duplikasyonlar, 15 tanesi kompleks yeniden düzenlenmeler ve 1 tanesi tekrar varyasyonları şeklindedir. Bu mutasyonlardan sadece bazıları için klinik seyir ve genetik danışma açısından oldukça önemli olan genotip-fenotip korelasyonu yapılabilmektedir.

Castellanos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada klinik RASopati şüphesi taşıyan olgular ve multipl CALM'e sahip olgular yeni nesil dizileme tabanlı panel teste alınmış ve test sonuçları, tanı oranı ve çıkan mutasyon spektrumu değerlendirilmiştir (314). Klinik olarak RASopati şüphesi olan 48 olgu ve birden fazla CALM sahibi 102 olgu özel olarak tasarlanmış bir NGS paneli kapsamında çalışmaya alınmış ve iki olgu grubunda mutasyonel spektrum ve bunların oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Klinik olarak RASopati şüphesi olan 48 hastadan 21'inde patojenik varyant saptanmış, bunların % 10'unu *NF1* varyantları oluşturmuştur. Ayrıca, multipl CALM mevcut olguların % 50'sinden fazlasında esas olarak *NF1* geninde ve aynı zamanda *SPRED1*'de patojenik mutasyonlar belirlenmiştir. Böylece klinik olarak NF1 tanılı olgulardan farklı olarak geniş *NF1* mutasyonel spektrumu ortaya konulmuştur.

NF1 geninde saptanan patojenik varyantların çoğunluğu ekzon 21'de yerleşik olup literatür bilgisiyle tutarlı olarak olgu serimizdeki varyantların % 14'ü ekzon 21'de bulunmuştur.

Toplamda 4000'e yakın varyant saptanmış olmasına rağmen Bettegowda ve arkadaşlarının çalışmalarında şimdiye kadar NF1 ile ilgili net olarak sadece 4 tane genotip-fenotip korelasyonu saptanabilmiştir (315). Genotip-fenotip korelasyonları, NF1 tanılı olguların çok küçük bir oranını oluşturmakta olup bunların % 5.9'unu mikrodelesyonlar, % 0.78'ini p.Met992del varyantı, yaklaşık % 0.9-1.2'sini p.Arg1809 yanlış anlamlı varyantı ve % 1.6'sını 844-848 kodonlarındaki missense varyantları oluşturur (315). Genel olarak düşünüldüğünde NF1 tanılı olguların yaklaşık % 10'unda klinik seyir ile ilgili daha öngörülebilir danışmanlık verme şansı mevcuttur (315). Trevisson ve arkadaşlarının 2019 yılındaki çalışmasında ise NM_000267.3:c.3112A>G, (p.Arg1038Gly) patojenik varyantını taşıyan 2 farklı aileden 7 olguda hafif klinik bulunduğu ve tüm olguların CALM taşıdığı ancak nörofibrom veya NF1 ile ilişkili diğer bulguların ve Noonan sendromu bulgularının gözlenmediği raporlanmıştır (316). Ancak bizim olgu serimizde bu varyanta sahip olgu bulunmamaktadır. Ayrıca 2020 yılında Koczkowska ve arkadaşlarının 281 olguyu içeren geniş bir kohort çalışmasında *NF1* geninde yanlış anlamlı p.Met1149, p.Arg1276 veya p.Lys1423 mutasyonlarına sahip olguların klasik NF1 olgularına göre daha yüksek oranda (yaklaşık % 25) Noonan benzeri fenotipe sahip oldukları belirtilmiştir (317). p.Arg1276 ve p.Lys1423 patojenik yanlış anlamlı varyantlar, PS dahil olmak üzere klasik NF1 olgularına kıyasla yüksek kardiyovasküler anomali prevalansı ile ilişkilendirilmiş, ayrıca p.Arg1276 varyantının yüksek bir spinal nörofibrom prevalansına sahip olduğu gösterilmiştir (317). Bunun yanında p.Met1149 varyantı taşıyan olguların, dışarıdan görünen pleksiform nörofibromlar, semptomatik spinal nörofibromlar veya semptomatik optik yol gliomları olmaksızın genel olarak pigmenter bulgularla karakterize hafif bir fenotipe sahip olduğu belirtilmiştir (317). Çalışma grubumuzda bu varyantları taşıyan olgularımız da bulunmamaktaydı.

NF1 geninde kodon 844-848 ile ilgili yanlış anlamlı varyantlar için bir genotip-fenotip korelasyonu mevcuttur. Majör yüzeysel pleksiform nörofibromlar ve semptomatik spinal nörofibromlar, klasik NF1'den etkilenen kohortlara kıyasla bu bireylerde daha sık olup olguların yaklaşık yarısında optik yol gliomları ve/veya iskelet anormallikleri bildirilmiştir ve bu bölgede varyant saptanan olgularda, genel olarak NF1'den etkilenen popülasyonla karşılaştırıldığında daha yüksek malignite yatkınlığı söz konusu olup, yapılan bir çalışmada çok yüksek sayıda nörofibroma sahip on kişiden dokuzunun kodon 847'de bir yanlış anlamlı mutasyon taşıdığı gözlenmiştir (205). Olgu 13'te L847P

varyantı saptanmış olup olgu bize başvurduğunda 8 aylıktı, Suriye kökenliydi ve kontrollerine başvurmamıştı. Bununla birlikte nöbet öyküsü, kraniyal MRG bulgusu, nöromotor geriliği, gelişme geriliği, boy kısalığı, abdomen USG’de karaciğerde grade I artışı ve bilateral renal pelvis ve kalikslerinde belirginleşme saptanmıştı. Ayrıca servikal lenfadenopati nedeniyle takipliydi. Olguda mevcut dismorfik bulgular göz önünde bulundurularak tanısı NF-Noonan sendromu olarak belirlendi. Erken yaşta tanı alan olguya ileride malignite gelişme riski açısından sıkı takip önerildi.

Koczkowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kodon 844-848 mutasyonları arasında en sık tekrarlananlar p.Leu847Pro ve p.Gly848Arg değişimleri olmuştur. Bunun sebebinin insan *NF1* geninde kodon 845-853'ün kodlanmasıyla oluşan genomik dizi, iki palindromik yapının bir parçası olup bu iki varyantın bu palindromun döngüsünde yer almasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (205).

Koczkowska ve arkadaşlarının aynı çalışmasında multipl spinal dorsal kök nörofibromları bulunan tüm NF1 tanılı olgularda, sistein-serinden zengin domainde (CSRD) yer alan c.2542G>C (p.Gly848Arg) ve c.2543G>A (p.Gly848Glu) spesifik yanlış anlamlı patojenik varyantları mevcut bulunmuştur (205). Bununla birlikte c.2542G>C varyantının patojenik bir mutasyon olduğuna dair net kanıtlara rağmen, fare modelleri üzerinde yapılan son iki çalışmada, insanlarda tanımlanan fenotip gözlenmemiş ve optik gliom veya pleksiform nörofibrom saptanmamıştır (203, 204). Çalışma grubumuzdan olgu 23’te yanlış anlamlı c.2542G>C varyantı mevcut olup spinal ve orbita MR normal olarak saptanmıştı ve nörofibrom veya optik gliom bulunmamaktaydı.

Daha büyük kohort gruplarıyla desteklenmesi beklenmekle birlikte yapılan kohort çalışmalarında 50 yaşın üzerindeki meme kanseri ile ilişkili NF1 olgularının daha fazla oranda anlamsız varyantlara sahip olduğu gözlenmiştir (315). Literatürle uyumlu olarak olgu 38’de meme kanseri mevcut olup anlamsız bir varyant saptanmıştır.

Olgu 24, klinik verisi yeterli olan NF1 olgularımız arasında CALM bulunmayan tek hastaydı. Olguda saptanan c.6664A>G, (p.T2222A) VUS varyantı Sanger dizileme ile doğrulanmıştı ancak olgunun ebeveynleri eksitus olduğundan segregasyon çalışması yapılamadı. Bu varyantın popülasyon frekansı (*Genome Aggregation Database-European*) % 0.00005423 olarak saptanmış ve ClinVar veritabanında yer alan bilgilere göre bu varyant daha önce birkaç laboratuvar tarafından klinik önemi bilinmeyen varyant olarak raporlanmıştır. Bu kodondaki treonin amino asidi orta derecede korunmuş olup

bazı *in silico* tahmin araçlarında (PolyPhen-2, SIFT) bu varyantın tolere edilebilir olduğu belirtilmiştir. Ancak CADD tahmin aracında muhtemel zararlı (skoru 16.7) olduğu bildirilmiş, MutationTaster veritabanında ise amino asit dizisini değiştirdiğinden hastalık yapıcı olarak raporlanmıştır. Bununla birlikte, bu varyantla ilgili klinik ve fonksiyonel verilerin eksikliğinden dolayı, klinik önemi kesin olarak belirlenememektedir.

NF1'de penetrans tam veya en azından 5 yaşından önce tama yakın olmasına rağmen klinik seyir aynı aile içinde bile değişkenlik gösterebilmektedir. (7). Bunun nedeni olarak yaşa bağlı belirtiler, belirli hücrelerdeki ikinci vuruşların zamanlaması ve sayısı, allelik ve allelik olmayan heterojenite, epistaksis, hücresel heterojenite, epigenetik, modifiye edici lokuslar ve çevresel ve stokastik faktörler gibi birçok etken sayılabilmektedir (190, 315). Çalışmamızda *NF1* geninde varyant saptanan olguların yaş ortalaması 17.4 iken *NF1* geni dışındaki genlerde varyant saptanan olguların yaş ortalaması 7.4 olarak saptandı. Bunun sebebinin NF1'deki değişken ekspresiviteye yol açan etkenler olduğu düşünülmüştür. Diğer bir neden olarak, NF1 olgularında hayati öneme sahip kardiyak bulguların diğer RASopati tiplerine göre daha az sıklıkta gözlenmesi nedeniyle geç hastane başvurusu ve diğer RASopati tipleri gibi belirgin dismorfik bulgular izlenmemesi sayılabilir.

Çalışma grubumuzda RASopati tanısı almış 61 indeks olgunun 41 tanesi NF1, 1 tanesi Nörofibromatozis-Noonan sendromu, 17 tanesi Noonan sendromu, 1 tanesi MLNS tanısı almıştır. Antenatal olarak *RAFI* geninde varyant saptanan bir olgu için ise postnatal muayene sonrasında MLNS tip 2 veya Noonan sendromu tip 5 arasında klinik tanının belirlenmesi planlanmıştır. Literatür sıklığına göre en sık görülen RASopati grubu hastalık Noonan sendromu iken bizim çalışma grubumuzun % 67'si NF1 tanısı almış olup sıklık olarak Noonan sendromunun önüne geçmiştir. Bu farklılığın, NF1 dışındaki RASopati grubu hastalıklar için olan farkındalığın azlığı ve genetik değerlendirme gerekliliğinin anlaşılmamış olması veya silik dismorfik bulguların gözden kaçması nedeniyle yeterince yönlendirme yapılmaması olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, indeks olgu tanı aldıktan sonra aile segregasyonu sonucu tanı alan NF1 olguları yine diğer RASopati tiplerine göre daha fazla olarak saptanmıştır. Literatürde NF1 tanılı olgular için *de novo* mutasyon oranı % 42 olarak belirtilmektedir (7). Çalışmamızda NF1 moleküler tanısı almış olgular için anamnezi yeterli olan 34 olgunun 23'ü (% 68) ailesel olarak saptandı. Bu oranın literatüre göre daha yüksek olması

olgu sayısının az olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca bölgesel olarak Türkiye'nin doğu ve güneydoğu kesimlerinde NF1 sıklığının artmış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla ilgili olarak yapılacak daha büyük kohort gruplarının yer aldığı araştırmalar konuyu aydınlatmakta faydalı olacaktır.

Germline NF1 mutasyonlarının % 80'i paternal kaynaklı olup, mikrolezyonların çoğunda kaynak maternal olarak görünmektedir (318). Çalışma grubumuzda, ailesel olarak saptanan 23 olgunun 20'sinde varyantın üst kuşaktan aktarıldığı bunların da 12'sinin (% 60) paternal, 8 tanesinin (% 40) maternal kaynaklı olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5.1. NF1 bulgu sıklıklarının literatürle karşılaştırılması

Bulgular	Ferner ve Gutman (80)	Bizim çalışmamız
CALM	> % 99	% 97,5
İntertriginöz çillenme	% 85	% 85
Kutanöz/subkutanöz/pleksiform nörofibrom	% 99 / % 15 / % 60	% 66 (tüm nörofibrom tipleri)
Lisch nodülü	% > 95	% 63
Optik gliom	% 15	% 5
Sfenoid kanat displazisi	% 1	% 5
Kardiyak bulgu	% 2	% 40
Skolyoz	% 10	% 50
MRG bulgusu	% 68 (319) / % 83 (320)	% 85
Öğrenme güçlüğü	% 60	% 28
Nöbet	% 6-7	% 6
Malign periferik sinir kılıfı tümörü	% 2-5	% 2
Meme kanseri	5 kat artmış risk	% 2

Tablo 5.1'de gösterildiği gibi, çalışma grubumuz CALM, intertriginöz çillenme, nörofibrom, kranial MRG bulgusu, nöbet öyküsü, malign periferik sinir kılıfı tümörü sıklığı açısından literatürle benzerlik göstermektedir. Ancak Lisch nodülü, optik gliom, öğrenme güçlüğü, meme kanseri oranı beklenenden daha az orana sahiptir. Çalışma grubumuzdaki yaşları küçük olguların, öğrenme güçlüğü, kanser gelişimi gibi ileri yaşlarda bilgi verici olabilecek durumlar açısından değerlendirilememiş olması bu farklılığa neden olarak görünmektedir. Bu olguların takip edilmesi ve ilerleyen yaşla beraber ilgili durumlar açısından tablonun netleşmesinin sağlanması planlanmıştır. Lisch

nodülü ve optik gliom açısından bakıldığında olgu sayısının sınırlı kalmasının ve kliniği mevcut olguların gerekli kontrolleri aksatmalarının, olguların geç tanı almasına sebep olduğu kanaatine varılmıştır.

Bunların dışında sfenoid kanat displazisi, skolyoz ve kardiyak bulgu oranı literatüre göre oldukça yüksek saptanmıştır. Bizim olgu serimizde olduğu gibi Tekdemir'in 2018 yılında yaptığı uzmanlık tezi çalışmasında NF1 olgularında kardiyak tutulumun literatürde belirtilenin aksine daha sık görüldüğü ve olguların kliniğiyle korelasyon göstermediği, bu sebeple de tüm NF1 tanılı olguların tanı anında ve takiplerinde mutlaka kardiyak açıdan değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (321). Bununla beraber Türk toplumlarında daha büyük kohort gruplarında yapılacak benzer çalışmalarla bu oranların netleştirilmesi gerekmektedir.

Noonan sendromunun yaklaşık % 50'si sporadik olup ailesel olguların çoğu otozomal dominant kalıtılmaktadır (322). Çalışmamızda Noonan sendromu tanılı 17 olgunun 9 tanesinden segregasyon analizi yapılmış olup sadece 2 tanesinde varyant babadan kalıtılmıştır. Kalan 7 olguda mutasyon ilk kez olguda ortaya çıkmış, bunlardan birinde olgu varyantı oğluna aktarmıştır. Ailesel kalıtılan vakalarda erkek çocuklarda Noonan sendromu görülme riskinin daha fazla olduğu bilinmektedir (111). Bizim ailesel olan 2 olgumuz da erkek cinsiyetteydi.

Noonan sendromlu olgularda konjenital kalp hastalığı (KKH) % 80, hipertrofik kardiyomyopati (HKMP) % 20 sıklıkla görülmektedir (116). Çalışma grubumuzda 17 Noonan sendromu tanılı olgu mevcut olup bunlardan bilgi sahibi olduğumuz 15'inin 3'ünde kardiyak sistem normal (% 20) olarak değerlendirilmiş, birinde HKMP tespit edilmiş (% 6), 12'sinde konjenital kalp hastalığı bulunmuştur (% 80). Olgu 58'de HKMP mevcut olup aynı zamanda PS da saptanmıştır. KKH görülme riski literatürle benzer saptanmış, HKMP literatüre kıyasla daha az oranda gözlenmiştir. Erken yaşta tanı alan olguların ilerleyen yaşla HKMP geliştirme riski açısından takibi planlanmıştır.

PTPN11 geninde patojenik varyant saptanan 9 olgunun tamamının tanısı Noonan sendromu tip 1 olarak kesinleşmiştir.

PTPN11 geninde varyant saptanmış Noonan sendromu olgularında kardiyak bulgu olarak HKMP görülme riski çok düşükken konjenital kalp hastalığı, özellikle de PS görülme ihtimali çok daha yüksektir. Bizim olgularımız arasındaki 9 adet *PTPN11* varyantı saptanmış olgular içinden yeterli klinik veriye sahip olduğumuz 8 tanesi

değerlendirildi. Bunlardan sadece 1 tanesinin kardiyak patolojisi bulunmamakta olup 5 tanesinde PS saptanırken, literatürle uyumlu olarak hiçbirinde HKMP gözlenmemiştir.

PTPN11 geninde saptanan bazı varyantlar için daha önce genotip-fenotip korelasyonu yapılmıştır. Niihori ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada *PTPN11* geninin 61, 71, 72 ve 76. kodonlarındaki *germline* patojenik varyantlar, lösemi kliniği ile ilişkili bulunmuş ve bu olgular özellikle JMML için yüksek risk altında olarak değerlendirilmiştir (305). Aynı varyanta sahip olan olgu 47 ve olgu 56'da D61G mutasyonu saptanmıştı. Bu olgularda henüz lösemi lehine bir klinik ve laboratuvar bulgusu saptanmamış, ancak olası maligniteler açısından takip altına alınmıştır.

Olgu 46'da saptanan *PTPN11* geni 8. ekzonda yerleşik olan c.922A>G (p.Asn308Asp) varyantı *hot spot* bölgede bulunduğundan çok sık gözlenmektedir. Jongmans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en sık varyant olarak saptanmıştır ve bu varyanta sahip olguların sağlıklı bireylerle benzer şekilde tipik bir eğitim alma olasılıklarının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (322). Bizim olgumuzun da mental durumunda herhangi bir problem gözlenmemiştir. Ayrıca *PTPN11* geninde ekzon 3 ve ekzon 8 mutasyonların en sık saptandığı bölgeler olarak bildirilmiştir (322). Bizim olgularımız arasında 4 olguda (2 varyant aynı olmak üzere) ekzon 3'te varyant saptanmıştı. Literatürden farklı olarak ekzon 8'de ise sadece 1 varyant saptanmıştı.

PTPN11 varyantı mevcut olgularda boy kısalığı da büyük oranda görülmekte olup bizim çalışmamızdaki veri sahibi olduğumuz 8 *PTPN11* varyantı saptanmış olgunun hepsinde boy kısalığı izlenmiştir.

PTPN11 geninde saptanan c.218C>T patojenik varyantı artmış JMML riski ile ilişkilendirilmiştir (322). Ancak bizim olgularımız arasında bu varyant mevcut değildi.

Olgu 45 ve 59'da saptanan varyanta sahip, daha önce literatürde bildirilmiş olgulardan biri 27 yaşında, infant dönemde beslenme problemleri yaşamış, PS nedeniyle opere olmuş, hafif bilişsel gerilik mevcut, çocuklukta fasiyal dismorfizmi ve boy kısalığı görülen, multipl nevüslere sahip, 18 yaşında düşük grade hipotalamik gliom nedeniyle obstrüktif hidrocefali gelişmiş bir kadındı (322). Jongmans ve arkadaşları tarafından bildirilen diğer olgu ise konjenital urakal kist, doğumdan hemen sonra sebebi belirlenemeyen konvülziyon öyküsüne, boy kısalığı ve tipik yüz görünümüne sahip, kardiyak anomalisi olmayan, bilişsel gerilik görülen, küçük bir hemanjiom dışında cilt bulgusu olmayan 9 yaşında bir kızdı (322). Olgu 45'te daha önce bildirilmiş olgularla

klirik açıdan tam anlamıyla benzerlik kurulamayan biçimde AVSD, sekundum ASD, glabellada kapiller hemanjiom, gövdede yaygın cutis marmoratus görünümü, omuzda dermal melanozis gibi cilt bulguları ve kontrollerinde hafif psikomotor gerilik izlenmişti.

BRAF, KRAS, LZTR1, MAP2K1, MRAS, NRAS, RAF1, RASA2, RIT1, RRAS2, SOS1 veya *SOS2* genlerinde saptanan varyantlarla ilgili daha önce yapılmış herhangi genotip-fenotip korelasyonu bulunmamaktadır. Bununla birlikte Noonan sendromu tipine ve mutasyon saptanan gene bağlı olarak klinik seyir ile ilgili danışmanlık vermek mümkün olabilmektedir.

Kardiyak bulgular açısından bakacak olursak *LZTR1* mutasyonlu olgularda HKMP sıklığının yüksek olduğu grlmştir (112). *MRAS* geninde mutasyon saptanan 6 olgunun tamamında hipertrofik kardiyomiyopati saptanmıştır (41). *RIT1* ile ilişkili NS'li olgularda HKMP oranı % 70-75, *RAF1* geninde heterozigot patojenik varyant saptanan Noonan sendromu tanılı olgularda HKMP riski yaklaşık % 85 iken, genel olarak Noonan sendromu tanılı olgularda % 18'dir (308, 311, 323). Ayrıca *RAF1* ile ilişkili NS hastalarının üçte birinde nevüsler, lentigin ve/veya *CALM* saptanırken *RIT1* geninde patojenik varyant saptanan olgularda ise kıvrıcık sa paterni, hiperpigmentasyon ile el ve ayak i yüzeylerindeki izgilenmelerde artış gibi ektodermal bulgular siktir (112).

Olgu 43'te NS tip 5 ve MLNS tip 2 allelik hastalıkları ile ilişkili olan *RAF1* geninde varyant saptanmıştır. Olguda kardiyak açıdan 1. ve 2. derece MY, sol ventrikül hipertrofisi ve subaortik darlık dışında artmış İVS kalınlığı ve sol ventrikül arka duvar hipertrofisi izlenmiştir. Kapiller hemanjiom dışında lentigin veya ek cilt bulgusu bulunmayan olguda NS tip 5 tanısı kesinleştirilmiştir.

Olgu 53 ve 61'de *RAF1* geninde aynı varyant saptanmıştır. MLNS tanılı olgu 53 HKMP, LVOTO tanısı almış ve elde, n kolda ve yüzde multipl verru vulgaris mevcuttu. Olgu 61 ise ileri yaş annenin süregelen 11+6 GH gebeliği olup kistik higroma dışında ek bilgi mevcut değildi.

RIT1 geninde saptanan tek varyant olgu 60'a ait olup ileri yaş annenin 24+2 GH süregelen gebeliğinde bakılan transabdominal USG'de bilateral pleural efüzyon, hafif triküspit yetmezliği, tek umblikal arter, polihidramniyoz, nukal translusensi artışı ve hidrops fetalis bulguları saptanmıştı. Bunun dışında kardiyak, ektodermal veya bilişsel açıdan bilgi sahibi olmadığımızdan postnatal muayene ve takip önerilmiştir.

SOS1 ve *SOS2* genlerindeki patojenik varyant saptanmış olgularda ise boy kısalığı daha az görülürken ektodermal bulgular sık gözlenmektedir. Bununla beraber *SOS2* ilişkili patojenik varyantlarda lenfatik sistem patolojileri % 50'den fazla sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (324).

Olgu 48, 52 ve 58'de *SOS1* geninde varyant saptanmıştır. Olgu 48'de boy alt sınırdadır (3 p, -1.88 SD) olarak saptanmış ve sırtta keratozis pilaris benzeri lezyonlar gözlenmişti. Olgu 52'de ektodermal bulgu gözlenmemiş, ancak aynı varyanta sahip ve kliniği daha hafif olan babada ciltte CALM saptanmıştı. Bilişsel gerilik bulunmamaktaydı ve normal sınırlarda boya sahipti. Olgu 58'in boyu da literatür verileriyle uyumlu olarak normal sınırlardaydı.

Olgu 57'de *SOS2* geninde varyant saptanmış olup 2 aylık olguda gelişme geriliği mevcuttu. Ektodermal bulgu henüz gözlenmemişti. Dolayısıyla olgunun bilişsel gelişim, cilt bulguları ve boy açısından özellikle takip edilmesi planlanmıştır.

KRAS mutasyonlarında bilişsel yetersizlik daha sık ve daha ağır olarak karşımıza çıkmakta iken *RIT1* geni ilişkili NS'li olgularda bilişsel yetersizlik daha az oranda bulunur (252, 311). Olgu 44'te *KRAS* geninde varyant saptanmış olup bu verilerle tutarlı olarak nöromotor ve bilişsel gerilik izlenmiştir. Ayrıca literatürde *KRAS* mutasyonu saptanan 2 olguda kraniyosinostoz görülmüştür (325).

BRAF ve *MAP2K1* mutasyonlarında ektodermal bulgular sıklıkla gözlenmektedir (39, 40, 326).

JMML gelişiminde onkojenik RAS yolağında yer alan genlerin *germline* veya somatik mutasyonları (*PTPN11*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS* ve *NF1*) JMML sürücü mutasyonlarının çoğunluğunu (> % 90) oluşturmaktadır (327). İlk olarak 2007 yılında Oliveira ve arkadaşları tarafından *NRAS* genindeki *germline* bir varyantın otoimmün lenfoproliferatif sendroma neden olduğu raporlanmıştır (328). 2 yıl sonra bir *germline* *NRAS* mutasyonunun JMML'ye neden olduğu ilk ve tek olarak De Filippi ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (329). *NRAS* geninde kodon 12, 13 ve 61 onkojenik kodonlar olarak isimlendirilmekte olup bu kodonlarda yer alan somatik mutasyonlar kanser gelişimi ve ciddiyeti açısından artmış bir risk oluşturmaktadır. Bu kodonlarda *germline* varyant saptanan olgularda da benzer şekilde artmış bir kanser riski söz konusudur (42). 2017 yılında Mason-Suares ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2 olguda, olgu 50'de saptanan G12S varyantı saptanmış olup bu olgulardan biri hidrops fetalis, prematürite ve

ek komplikasyonlar nedeniyle 2 günlükken eksitus olmuş, diğeri ise olgu 50'ye benzer şekilde JMML tanısı almış ve postnatal 30 günlükken eksitus olmuştur (295).

Multipl lentiginlerle seyreden Noonan sendromuna (MLNS) % 5'ten daha az sıklıkla *RAF1* genindeki patojenik varyantlar neden olmakta olup bu varyantların tamamı 6, 13 ve 16. ekzonlarda saptanmıştır (29). Ancak olgu 53'te *RAF1* genindeki patojenik varyant ekzon 7'de mevcut olup literatürdeki olgulardan farklı bulunmuştur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

RASopati grubu hastalıklar en sık görülen sendrom gruplarından biri olup RAS-MAPK yolağında etkili olan genlerde saptanan *germline* patojenik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla yolakta yer alan bir gende patojenik varyant saptanan olguların klinik bulguları arasında bazı klinik ortak özellikler bulunmaktadır. Bununla birlikte bu grup sendromların kendi içinde ayırt edilmesini sağlayan spesifik bulguları ve farklı gen mutasyonları bulunmaktadır. Saptanan gene ve varyanta göre hastalığın klinik seyri değişebilmektedir. Bu açıdan klinik korelasyon ve moleküler analiz önem arz etmektedir.

NF1'de penetrans tam olmasına rağmen aynı aile içinde bile klinik farklılıklar görülebilmekte ve tanı atlanabilmektedir. Bu sebeple bulgular hafif olsa da zamanla farklı ek bulgular gelişebileceği, doğumda CALM olmasa veya sayıca az olsa bile lezyonlarda artış gözlenebileceği ve ilerleyen yaşla birlikte özellikle malignite gibi durumlar görülebileceği göz önünde bulundurularak mutlaka takip önerilmelidir.

RASopati olgularında ailesel kalıtım azımsanamayacak kadar fazla olduğundan aile üyelerinde klinik sorgulanmalı ve segregasyon analizi mutlaka yapılmalı, olası silik dismorfik bulguya sahip olgular gözden kaçırılmamalıdır.

Çalışmamızda 2016-2021 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğinde RASopati tanısı almış 61 olgunun klinik bulguları ve moleküler sonuçları değerlendirilmiştir. 41 patojenik, 17 muhtemel patojenik ve 3 VUS varyant saptanmıştır. Tanılı olguların 41 tanesi NF1, 1 tanesi Nörofibromatozis-Noonan sendromu, 17 tanesi Noonan sendromu, 1 tanesi MLNS tanısı almış ve 1 antenatal olguda *RAF1* geninde patojenik varyant saptanmış ancak kesin klinik tanı için postnatal muayene önerilmiştir. En sık olarak NF1, 2. sıklıkla Noonan sendromu tanılı olgu mevcut olup çalışma grubunun çoğunluğunu iki sendrom oluşturmuştur.

Moleküler analiz yapılmış olması, genetik danışmanlık ve olguların olası klinik bulgu gelişimini takip açısından fayda sağlamıştır. Ayrıca moleküler tanı almış olmaları genotip-fenotip korelasyonu olan varyantlara sahip olguların yönetimi açısından oldukça önemli değere sahiptir.

RASopati ön tanısıyla değerlendirilen olgular için tasarlanmış hedefli panel testler, maddi açıdan ve zamansal olarak oldukça kullanışlı olmakla birlikte tanıya ulaşmada yeterince kapsayıcı olmakta ve gereksiz test isteminin önüne geçmektedir.

KAYNAKLAR

1. Riller Q, Rieux-Laucat F. RASopathies: from germline mutations to somatic and multigenic diseases. *Biomedical Journal*. 2021.
 2. Niemeyer CM. RAS diseases in children. *Haematologica*. 2014;99(11):1653.
 3. Rauen KA. The rasopathies. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:355.
 4. Tajan M, Paccoud R, Branka S, Edouard T, Yart A. The RASopathy family: consequences of germline activation of the RAS/MAPK pathway. *Endocrine reviews*. 2018;39(5):676-700.
 5. Rodríguez F, Gaete X, Cassorla F. Etiology and Treatment of Growth Delay in Noonan Syndrome. *Frontiers in endocrinology*. 2021;12.
 6. Friedman JM. Neurofibromatosis 1. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
7. Choi J, An S, Lim SY. Current concepts of neurofibromatosis type 1: pathophysiology and treatment. *Archives of craniofacial surgery*. 2022;23(1):6-16.
 8. Jafry M, Sidbury R. RASopathies. *Clinics in Dermatology*. 2020;38(4):455-61.
 9. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294(5545):1299-304.
 10. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170(1):17-33.
 11. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012;16(1):103-19.
 12. McKay M, Morrison D. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007;26(22):3113-21.
 13. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2007;1773(8):1263-84.

14. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current opinion in genetics & development*. 2009;19(3):230-6.
15. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*. 2006;24(1):21-44.
16. Fowlkes JL, Thrailkill KM, Bunn RC. RASopathies: The musculoskeletal consequences and their etiology and pathogenesis. *Bone*. 2021;152:116060.
17. Zenker M, Edouard T, Blair JC, Cappa M. Noonan syndrome: improving recognition and diagnosis. *Archives of Disease in Childhood*. 2022.
18. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 1990;249(4965):181-6.
19. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*. 1990;62(1):187-92.
20. Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, et al. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics*. 1990;7(4):555-65.
21. Evans D, Howard E, Giblin C, Clancy T, Spencer H, Huson S, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *American journal of medical genetics Part A*. 2010;152(2):327-32.
22. Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanché H, et al. NF 1 Molecular Characterization and Neurofibromatosis Type I Genotype–Phenotype Correlation: The French Experience. *Human mutation*. 2013;34(11):1510-8.
23. Giugliano T, Santoro C, Torella A, Del Vecchio Blanco F, Grandone A, Onore ME, et al. Clinical and genetic findings in children with neurofibromatosis type 1, Legius syndrome, and other related neurocutaneous disorders. *Genes*. 2019;10(8):580.
24. Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Salamon J, Well L, Farschtschi S, Rosenbaum T, et al. Clinical characterization of children and adolescents with NF1 microdeletions. *Child's Nervous System*. 2020;36(10):2297-310.
25. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2001;29(4):465-8.

26. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2007;39(1):75-9.
27. Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2007;39(1):70-4.
28. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2007;39(8):1013-7.
29. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics*. 2007;39(8):1007-12.
30. Schubert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2006;38(3):331-6.
31. Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, et al. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2010;42(1):27-9.
32. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nature genetics*. 2009;41(9):1022-6.
33. Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature genetics*. 2010;42(9):794-800.
34. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;87(2):250-7.
35. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, Van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;70(6):1555-63.
36. Yamamoto GL, Aguená M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, et al. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. *Journal of medical genetics*. 2015;52(6):413-21.

37. Aoki Y, Niihori T, Inoue S, I, Matsubara Y. Recent Advances in RASopathies J Hum Genet. 2016;61(1):33-9.
38. Brasil AS, Pereira AC, Wanderley LT, Kim CA, Malaquias AC, Jorge AA, et al. PTPN11 and KRAS gene analysis in patients with Noonan and Noonan-like syndromes. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2010;14(3):425-32.
39. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. Human mutation. 2009;30(4):695-702.
40. Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype–phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. Journal of medical genetics. 2007;44(12):763-71.
41. Pires LVL, Bordim RdA, Maciel MBR, Tanaka ACS, Yamamoto GL, Honjo RS, et al. Atypical, severe hypertrophic cardiomyopathy in a newborn presenting Noonan syndrome harboring a recurrent heterozygous MRAS variant. American Journal of Medical Genetics Part A. 2021;185(10):3099-103.
42. Garren B, Stephan M, Hogue JS. NRAS associated RASopathy and embryonal rhabdomyosarcoma. American Journal of Medical Genetics Part A. 2020;182(1):195-200.
43. Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, et al. Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. Human molecular genetics. 2014;23(16):4315-27.
44. Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, et al. Grouping of multiple-lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. The American Journal of Human Genetics. 2002;71(2):389-94.
45. Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns J-P. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. Journal of medical genetics. 2002;39(8):571-4.
46. Koudova M, Seemanova E, Zenker M. Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence. European journal of medical genetics. 2009;52(5):337-40.

47. Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, et al. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(2):407-11.
48. Yu S, Graf WD. BRAF gene deletion broadens the clinical spectrum neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes. *Journal of Child Neurology*. 2011;26(12):1593-6.
49. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, et al. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nature genetics*. 2005;37(10):1038-40.
50. Estep AL, Tidyman WE, Teitell MA, Cotter PD, Rauen KA. HRAS mutations in Costello syndrome: detection of constitutional activating mutations in codon 12 and 13 and loss of wild-type allele in malignancy. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140(1):8-16.
51. Gripp KW, Lin AE, Stabley DL, Nicholson L, Scott Jr CI, Doyle D, et al. HRAS mutation analysis in Costello syndrome: genotype and phenotype correlation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140(1):1-7.
52. Kerr B, Delrue M-A, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I, et al. Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. *Journal of medical genetics*. 2006;43(5):401-5.
53. Bertola D, Buscarilli M, Stabley DL, Baker L, Doyle D, Bartholomew DW, et al. Phenotypic spectrum of Costello syndrome individuals harboring the rare HRAS mutation p. Gly13Asp. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2017;173(5):1309-18.
54. Gripp KW, Hopkins E, Sol-Church K, Stabley DL, Axelrad ME, Doyle D, et al. Phenotypic analysis of individuals with Costello syndrome due to HRAS p. G13C. *American journal of medical genetics Part A*. 2011;155(4):706-16.
55. Gripp KW, Aldinger KA, Bennett JT, Baker L, Tusi J, Powell-Hamilton N, et al. A novel rasopathy caused by recurrent de novo missense mutations in PPP1CB closely resembles Noonan syndrome with loose anagen hair. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;170(9):2237-47.
56. Maruwaka K, Nakajima Y, Yamada T, Tanaka T, Kosaki R, Inagaki H, et al. Two Japanese patients with Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair 2. *American journal of medical genetics Part A*. 2022;188(7):2246-50.

57. Spurlock G, Bennett E, Chuzhanova N, Thomas N, Jim H-P, Side L, et al. SPRED1 mutations (Legius syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype. *Journal of medical genetics*. 2009;46(7):431-7.
58. Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nature genetics*. 2007;39(9):1120-6.
59. Umutesi HG, Hoang HM, Johnson HE, Nam K, Heo J. Development of Noonan syndrome by deregulation of allosteric SOS autoactivation. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(39):13651-63.
60. Bunda S, Heir P, Srikumar T, Cook JD, Burrell K, Kano Y, et al. Src promotes GTPase activity of Ras via tyrosine 32 phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(36):E3785-E94.
61. Kano Y, Gebregiworgis T, Marshall CB, Radulovich N, Poon BP, St-Germain J, et al. Tyrosyl phosphorylation of KRAS stalls GTPase cycle via alteration of switch I and II conformation. *Nature communications*. 2019;10(1):1-14.
62. Motta M, Fidan M, Bellacchio E, Pantaleoni F, Schneider-Heieck K, Coppola S, et al. Dominant Noonan syndrome-causing LZTR1 mutations specifically affect the Kelch domain substrate-recognition surface and enhance RAS-MAPK signaling. *Human Molecular Genetics*. 2019;28(6):1007-22.
63. Umeki I, Niihori T, Abe T, Kanno S-i, Okamoto N, Mizuno S, et al. Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with Noonan syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes. *Human Genetics*. 2019;138(1):21-35.
64. Dumaz N, Marais R. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(32):29819-23.
65. Molzan M, Ottmann C. Synergistic binding of the phosphorylated S233-and S259-binding sites of C-RAF to one 14-3-3 ζ dimer. *Journal of molecular biology*. 2012;423(4):486-95.
66. Molzan M, Schumacher B, Ottmann C, Baljuls A, Polzien L, Weyand M, et al. Impaired binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(19):4698-711.
67. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(5):281-98.

68. Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrançois M, Sicheri F, Therrien M. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*. 2009;461(7263):542-5.
69. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*. 2006;311(5765):1287-90.
70. Anastasaki C, Estep AL, Marais R, Rauen KA, Patton EE. Kinase-activating and kinase-impaired cardio-facio-cutaneous syndrome alleles have activity during zebrafish development and are sensitive to small molecule inhibitors. *Human molecular genetics*. 2009;18(14):2543-54.
71. Hall BE, Yang SS, Boriack-Sjodin PA, Kuriyan J, Bar-Sagi D. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(29):27629-37.
72. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*. 2001;412(6847):647-51.
73. Stowe IB, Mercado EL, Stowe TR, Bell EL, Oses-Prieto JA, Hernández H, et al. A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes & development*. 2012;26(13):1421-6.
74. Hirata Y, Brems H, Suzuki M, Kanamori M, Okada M, Morita R, et al. Interaction between a Domain of the Negative Regulator of the Ras-ERK Pathway, SPRED1 Protein, and the GTPase-activating Protein-related Domain of Neurofibromin Is Implicated in Legius Syndrome and Neurofibromatosis Type 1*♦. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(7):3124-34.
75. Gutmann DH, Ferner RE, Listerick RH, Korf BR, Wolters PL, Johnson KJ. Neurofibromatosis type 1. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):1-17.
76. Uusitalo E, Leppävirta J, Koffert A, Suominen S, Vahtera J, Vahlberg T, et al. Incidence and mortality of neurofibromatosis: a total population study in Finland. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(3):904.
77. Cimino PJ, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1. *Handbook of clinical neurology*. 2018;148:799-811.
78. Ozarslan B, Russo T, Argenziano G, Santoro C, Piccolo V. Cutaneous findings in neurofibromatosis type 1. *Cancers*. 2021;13(3):463.
79. Nguyen R, Dombi E, Widemann BC, Solomon J, Fuensterer C, Kluwe L, et al. Growth dynamics of plexiform neurofibromas: a retrospective cohort study of 201 patients with neurofibromatosis 1. *Orphanet journal of rare diseases*. 2012;7(1):1-6.

80. Ferner RE, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnosis and management. *Handb Clin Neurol*. 2013;115:939-55.
81. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009;61(1):1-14.
82. Miraglia E, Moliterni E, Iacovino C, Roberti V, Laghi A, Moramarco A, et al. Cutaneous manifestations in neurofibromatosis type 1. *La Clinica Terapeutica*. 2020;171(5).
83. Touzé R, Manassero A, Bremond-Gignac D, Robert MP. Long-term follow-up of choroidal abnormalities in children with neurofibromatosis type 1. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2021;49(5):516-9.
84. Friedrich RE, Nuding MA. Optic Pathway Glioma and Cerebral Focal Abnormal Signal Intensity in Patients with Neurofibromatosis Type 1: Characteristics, Treatment Choices and Follow-up in 134 Affected Individuals and a Brief Review of the Literature. *Anticancer Res*. 2016;36(8):4095-121.
85. Vogel AC, Gutmann DH, Morris SM. Neurodevelopmental disorders in children with neurofibromatosis type 1. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2017;59(11):1112-6.
86. Domon-Archambault V, Gagnon L, Benoît A, Perreault S. Psychosocial features of neurofibromatosis type 1 in children and adolescents. *Journal of child neurology*. 2018;33(3):225-32.
87. Kongkriangkai AM, King C, Martin LJ, Wakefield E, Prada CE, Kelly-Mancuso G, et al. Substantial pain burden in frequency, intensity, interference and chronicity among children and adults with neurofibromatosis Type 1. *American journal of medical genetics Part A*. 2019;179(4):602-7.
88. Kaspiris A, Savvidou OD, Vasiliadis ES, Hadjimichael AC, Melissaridou D, Iliopoulou-Kosmadaki S, et al. Current Aspects on the Pathophysiology of Bone Metabolic Defects during Progression of Scoliosis in Neurofibromatosis Type 1. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(2):444.
89. Sivasubramanian R, Meyers KE. Hypertension in children and adolescents with turner syndrome (TS), neurofibromatosis 1 (NF1), and williams syndrome (WS). *Current hypertension reports*. 2021;23(4):1-9.
90. Terry AR, Jordan JT, Schwamm L, Plotkin SR. Increased risk of cerebrovascular disease among patients with neurofibromatosis type 1: population-based approach. *Stroke*. 2016;47(1):60-5.

91. Pinna V, Daniele P, Calcagni G, Mariniello L, Criscione R, Giardina C, et al. Prevalence, type, and molecular spectrum of NF1 mutations in patients with neurofibromatosis type 1 and congenital heart disease. *Genes*. 2019;10(9):675.
92. Lin AE, Birch PH, Korf BR, Tenconi R, Niimura M, Poyhonen M, et al. Cardiovascular malformations and other cardiovascular abnormalities in neurofibromatosis 1. *American journal of medical genetics*. 2000;95(2):108-17.
93. Nguyen R, Mir T, Kluwe L, Jett K, Kentsch M, Mueller G, et al. Cardiac characterization of 16 patients with large NF1 gene deletions. *Clinical genetics*. 2013;84(4):344-9.
94. Júnior SFA, Zanetti G, de Melo ASA, Souza Jr AS, Souza LS, Meirelles GdSP, et al. Neurofibromatosis type 1: State-of-the-art review with emphasis on pulmonary involvement. *Respiratory Medicine*. 2019;149:9-15.
95. Jutant E-M, Girerd B, Jaïs X, Savale L, O'Connell C, Perros F, et al. Pulmonary hypertension associated with neurofibromatosis type 1. *European Respiratory Review*. 2018;27(149).
96. Zessis NR, Gao F, Vadlamudi G, Gutmann DH, Hollander AS. Height growth impairment in children with neurofibromatosis type 1 is characterized by decreased pubertal growth velocity in both sexes. *Journal of child neurology*. 2018;33(12):762-6.
97. Ning X, Farschtschi S, Jones A, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF, Friedman JM. Growth in neurofibromatosis 1 microdeletion patients. *Clinical genetics*. 2016;89(3):351-4.
98. Viridis R, Street M, Bandello M, Tripodi C, Donadio A, Villani A, et al. Growth and pubertal disorders in neurofibromatosis type 1. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 2003;16:289-92.
99. Hannah-Shmouni F, Stratakis CA. Growth hormone excess in neurofibromatosis 1. *Genetics in Medicine*. 2019;21(5):1254-5.
100. Cambiaso P, Galassi S, Palmiero M, Mastronuzzi A, Del Bufalo F, Capolino R, et al. Growth hormone excess in children with neurofibromatosis type-1 and optic glioma. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2017;173(9):2353-8.
101. Evans DGR, O'hara C, Wilding A, Ingham SL, Howard E, Dawson J, et al. Mortality in neurofibromatosis 1: in North West England: an assessment of actuarial survival in a region of the UK since 1989. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19(11):1187-91.

102. Martin E, Coert JH, Flucke UE, Slooff WBM, van de Sande MA, van Noesel MM, et al. Neurofibromatosis-associated malignant peripheral nerve sheath tumors in children have a worse prognosis: a nationwide cohort study. *Pediatric Blood & Cancer*. 2020;67(4):e28138.
103. Seminog OO, Goldacre MJ. Risk of benign tumours of nervous system, and of malignant neoplasms, in people with neurofibromatosis: population-based record-linkage study. *British journal of cancer*. 2013;108(1):193-8.
104. Niemeyer CM, Flotho C. Juvenile myelomonocytic leukemia: who's the driver at the wheel? *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;133(10):1060-70.
105. Ejerskov C, Raundahl M, Gregersen PA, Handrup MM. Clinical features and disease severity in patients with mosaic neurofibromatosis type 1: a single-center study and literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2021;16(1):1-9.
106. Yang Y-D, Jiang F, Li D-Z. Neurofibromatosis type 1 due to possible maternal mosaicism in a family with two affected siblings. *Congenital anomalies*. 2020;60(5):156-7.
107. Kluwe L, Friedrich RE, Farschtschi SC, Hagel C, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF. Null phenotype of neurofibromatosis type 1 in a carrier of a heterozygous atypical NF1 deletion due to mosaicism. *Human Mutation*. 2020;41(7):1226-31.
108. Legius E, Brems H. Genetic basis of neurofibromatosis type 1 and related conditions, including mosaicism. *Child's Nervous System*. 2020;36(10):2285-95.
109. Stumpf D. Neurofibromatosis. Conference statement, National Institute of Health development conference. *Arch Neurol*. 1988;45:575-8.
110. Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome. *The Lancet*. 2013;381(9863):333-42.
111. Tartaglia M, Cordeddu V, Chang H, Shaw A, Kalidas K, Crosby A, et al. Paternal germline origin and sex-ratio distortion in transmission of PTPN11 mutations in Noonan syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;75(3):492-7.
112. Roberts AE. Noonan Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

113. Van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2007;2(1):1-6.
114. Yart A, Edouard T. Noonan syndrome: an update on growth and development. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 2018;25(1):67-73.
115. Seo GH, Yoo H-W. Growth hormone therapy in patients with Noonan syndrome. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*. 2018;23(4):176.
116. Linglart L, Gelb BD, editors. Congenital heart defects in Noonan syndrome: Diagnosis, management, and treatment. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2020: Wiley Online Library.
117. Sharland M, Burch M, McKenna W, Paton M. A clinical study of Noonan syndrome. *Archives of disease in childhood*. 1992;67(2):178-83.
118. Prendiville TW, Gauvreau K, Tworog-Dube E, Patkin L, Kucherlapati RS, Roberts AE, et al. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Archives of disease in childhood*. 2014;99(7):629-34.
119. Pierpont EI. Neuropsychological functioning in individuals with Noonan syndrome: a systematic literature review with educational and treatment recommendations. *Journal of Pediatric Neuropsychology*. 2016;2(1):14-33.
120. Pierpont EI, Tworog-Dube E, Roberts AE. Attention skills and executive functioning in children with Noonan syndrome and their unaffected siblings. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2015;57(4):385-92.
121. Rodríguez FA, Castellón L, Moreno R, Paez E, Aracena Álvarez MI. Noonan syndrome with multiple Giant cell lesions, management and treatment with surgery and interferon alpha-2a therapy: Case report. *Birth Defects Research*. 2020;112(10):732-9.
122. Derbent M, Oncel Y, Tokel K, Varan B, Haberal A, Yazıcı AC, et al. Clinical and hematologic findings in Noonan syndrome patients with PTPN11 gene mutations. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(11):2768-74.
123. van Nierop JW, van Trier DC, van der Burgt I, Draaisma JM, Mylanus EA, Snik AF, et al. Cochlear implantation and clinical features in patients with Noonan syndrome and Noonan syndrome with multiple lentigines caused by a mutation in PTPN11. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2017;97:228-34.
124. Smpokou P, Zand DJ, Rosenbaum KN, Summar ML. Malignancy in Noonan syndrome and related disorders. *Clin Genet*. 2015;88(6):516-22.
125. Stuurman KE, Joosten M, van der Burgt I, Elting M, Yntema HG, Meijers-Heijboer H, et al. Prenatal ultrasound findings of rasopathies in a cohort of 424 fetuses:

update on genetic testing in the NGS era. *Journal of Medical Genetics*. 2019;56(10):654-61.

126. Voron DA, Hatfield HH, Kalkhoff RK. Multiple lentigines syndrome: case report and review of the literature. *The American journal of medicine*. 1976;60(3):447-56.

127. Coppin BD, Temple IK. Multiple lentigines syndrome (LEOPARD syndrome or progressive cardiomyopathic lentiginosis). *Journal of medical genetics*. 1997;34(7):582-6.

128. Digilio MC, Sarkozy A, De Zorzi A, Pacileo G, Limongelli G, Mingarelli R, et al. LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(7):740-6.

129. Galazka P, Jain R, Muthukumar L, Sanders H, Bush M, Jan MF, et al. Familial LEOPARD Syndrome With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2020;135:168-73.

130. Gelb BD, Tartaglia M. Noonan Syndrome with Multiple Lentigines. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. *GeneReviews* is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

131. Legius E, Stevenson D. Legius Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. *GeneReviews* is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

132. Denayer E, Chmara M, Brems H, Kievit AM, Van Bever Y, Van den Ouweland AM, et al. Legius syndrome in fourteen families. *Human mutation*. 2011;32(1):E1985-E98.

133. Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, et al. Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1–like syndrome. *Jama*. 2009;302(19):2111-8.

134. Laycock-van Spyk S, Jim H, Thomas L, Spurlock G, Fares L, Palmer-Smith S, et al. Identification of five novel SPRED1 germline mutations in Legius syndrome. *Clinical genetics*. 2011;80(1):93-6.

135. Denayer E, Descheemaeker MJ, Stewart DR, Keymolen K, Plasschaert E, Ruppert SL, et al., editors. Observations on intelligence and behavior in 15 patients with Legius syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2011: Wiley Online Library.

136. Hebron KE, Hernandez ER, Yohe ME. The RASopathies: from pathogenetics to therapeutics. *Disease models & mechanisms*. 2022;15(2):dmm049107.

137. Rauen KA. Cardiofaciocutaneous Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

138. Yoon G, Rosenberg J, Blaser S, Rauen KA. Neurological complications of cardio-facio-cutaneous syndrome. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2007;49(12):894-9.

139. Roberts A, Allanson J, Jadico SK, Kavamura MI, Noonan J, Opitz JM, et al. The cardiofaciocutaneous syndrome. *Journal of medical genetics*. 2006;43(11):833-42.

140. Siegel D, McKenzie J, Frieden I, Rauen KA. Dermatological findings in 61 mutation-positive individuals with cardiofaciocutaneous syndrome. *British Journal of Dermatology*. 2011;164(3):521-9.

141. Rauen KA, Tidyman WE, Estep AL, Sampath S, Peltier HM, Bale SJ, et al. Molecular and functional analysis of a novel MEK2 mutation in cardio-facio-cutaneous syndrome: transmission through four generations. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(4):807-14.

142. Makita Y, Narumi Y, Yoshida M, Niihori T, Kure S, Fujieda K, et al. Leukemia in Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: a patient with a germline mutation in BRAF proto-oncogene. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2007;29(5):287-90.

143. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nature genetics*. 2006;38(3):294-6.

144. Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kure S, et al. Non-Hodgkin lymphoma in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2011;33(8):e342-e6.

145. Al-Rahawan MM, Chute DJ, Sol-Church K, Gripp KW, Stabley DL, McDaniel NL, et al. Hepatoblastoma and heart transplantation in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143(13):1481-8.
146. Gripp KW, Morse LA, Axelrad M, Chatfield KC, Chidekel A, Dobyns W, et al. Costello syndrome: clinical phenotype, genotype, and management guidelines. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2019;179(9):1725-44.
147. Marukian NV, Levinsohn JL, Craiglow BG, Milstone LM, Choate KA. Palmoplantar keratoderma in Costello syndrome responsive to acitretin. *Pediatric Dermatology*. 2017;34(2):160-2.
148. Gripp KW, Rauen KA. Costello Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
149. Johnson JP, Golabi M, Norton ME, Rosenblatt RM, Feldman GM, Yang SP, et al. Costello syndrome: phenotype, natural history, differential diagnosis, and possible cause. *The Journal of pediatrics*. 1998;133(3):441-8.
150. Hennekam RC, editor Costello syndrome: an overview. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2003: Wiley Online Library.
151. Delrue MA, Chateil JF, Arveiler B, Lacombe D. Costello syndrome and neurological abnormalities. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2003;123(3):301-5.
152. Schwartz DD, Katzenstein JM, Highley EJ, Stabley DL, Sol-Church K, Gripp KW, et al. Age-related differences in prevalence of autism spectrum disorder symptoms in children and adolescents with Costello syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2017;173(5):1294-300.
153. Detweiler S, Thacker MM, Hopkins E, Conway L, Gripp KW. Orthopedic manifestations and implications for individuals with Costello syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161(8):1940-9.
154. Gomez-Ospina N, Kuo C, Ananth AL, Myers A, Brennan ML, Stevenson DA, et al. Respiratory system involvement in Costello syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2016;170(7):1849-57.

155. Boon LM, Mulliken JB, Vikkula M. RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Current opinion in genetics & development*. 2005;15(3):265-9.
156. Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, Burrows PE, Domp Martin A, Watanabe S, et al. Capillary malformation–arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;73(6):1240-9.
157. Revencu N, Boon LM, Mendola A, Cordisco MR, Dubois J, Clapuyt P, et al. RASA 1 mutations and associated phenotypes in 68 families with capillary malformation–arteriovenous malformation. *Human mutation*. 2013;34(12):1632-41.
158. Larralde M, Abad ME, Luna PC, Hoffner MV. Capillary malformation–arteriovenous malformation: a clinical review of 45 patients. *International Journal of Dermatology*. 2014;53(4):458-61.
159. Huckstadt V, Chinton J, Gomez A, Obregon MG, Gravina LP. Noonan syndrome with loose anagen hair with variants in the PPP1CB gene: first familial case reported. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2021;185(4):1256-60.
160. Mazzanti L, Cacciari E, Cicognani A, Bergamaschi R, Scarano E, Forabosco A. Noonan-like syndrome with loose anagen hair: A new syndrome? *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2003;118(3):279-86.
161. Hannig V, Jeoung M, Jang ER, Phillips JA, 3rd, Galperin E. A Novel SHOC2 Variant in Rasopathy. *Hum Mutat*. 2014;35(11):1290-4.
162. Motta M, Solman M, Bonnard AA, Kuechler A, Pantaleoni F, Priolo M, et al. Expanding the molecular spectrum of pathogenic SHOC2 variants underlying Mazzanti syndrome. *Hum Mol Genet*. 2022;31(16):2766-78.
163. Gripp KW, Zand DJ, Demmer L, Anderson CE, Dobyns WB, Zackai EH, et al. Expanding the SHOC2 mutation associated phenotype of Noonan syndrome with loose anagen hair: structural brain anomalies and myelofibrosis. *American journal of medical genetics Part A*. 2013;161a(10):2420-30.
164. Krab LC, de Goede-Bolder A, Aarsen FK, Pluijm SM, Bouman MJ, van der Geest JN, et al. Effect of simvastatin on cognitive functioning in children with neurofibromatosis type 1: a randomized controlled trial. *Jama*. 2008;300(3):287-94.
165. Acosta MT, Kardel PG, Walsh KS, Rosenbaum KN, Gioia GA, Packer RJ. Lovastatin as treatment for neurocognitive deficits in neurofibromatosis type 1: phase I study. *Pediatric neurology*. 2011;45(4):241-5.

166. Rauen KA, Banerjee A, Bishop WR, Lauchle JO, McCormick F, McMahon M, et al., editors. Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: Moving toward clinical trials in RASopathies. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2011: Wiley Online Library.
167. Levy SE, Boone BE. Next-generation sequencing strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2019;9(7):a025791.
168. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017;141(11):1544-57.
169. Attia T, Saeed M. Next generation sequencing technologies: A short review. *Next Gener Seq Appl S*. 2016;1.
170. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem*. 2013;6(1):287-303.
171. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*. 2013;98(6):236-8.
172. Platt J, Cox R, Enns GM. Points to consider in the clinical use of NGS panels for mitochondrial disease: an analysis of gene inclusion and consent forms. *Journal of genetic counseling*. 2014;23(4):594-603.
173. Pagon RA. GeneTests: an online genetic information resource for health care providers. *Journal of the Medical Library Association*. 2006;94(3):343.
174. Sawyer S, Hartley T, Dymont D, Beaulieu C, Schwartzentruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clinical genetics*. 2016;89(3):275-84.
175. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(16):1502-11.
176. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer prevention research*. 2012;5(7):887-900.
177. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405-23.
178. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number

- variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). Elsevier; 2020.
179. Pros E, Gómez C, Martín T, Fábregas P, Serra E, Lázaro C. Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Human mutation*. 2008;29(9):E173-E93.
180. Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of medical genetics*. 2005;42(10):737-48.
181. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Küçükceylan N, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *The American Journal of Human Genetics*. 2000;66(3):790-818.
182. Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *The American Journal of Human Genetics*. 2000;66(2):393-401.
183. Osborn MJ, Upadhyaya M. Evaluation of the protein truncation test and mutation detection in the NF1 gene: mutational analysis of 15 known and 40 unknown mutations. *Hum Genet*. 1999;105(4):327-32.
184. Origone P, De Luca A, Bellini C, Buccino A, Mingarelli R, Costabel S, et al. Ten novel mutations in the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in Italian patients. *Hum Mutat*. 2002;20(1):74-5.
185. Han S, Cooper DN, Upadhyaya M. Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Human genetics*. 2001;109(5):487-97.
186. Gasparini P, D'Agruma L, De Cillis GP, Balestrazzi P, Mingarelli R, Zelante L. Scanning the first part of the neurofibromatosis type 1 gene by RNA-SSCP: identification of three novel mutations and of two new polymorphisms. *Human genetics*. 1996;97(4):492-5.
187. Mattocks C, Baralle D, Tarpey P, Bobrow M, Whittaker J. Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11–17 distinct from the GAP related domain. *Journal of medical genetics*. 2004;41(4):e48-e.
188. Luca AD, Schirinzi A, Buccino A, Bottillo I, Sinibaldi L, Torrente I, et al. Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1. *Human mutation*. 2004;23(6):629-.

189. Coleman DM, Wang Y, Yang ML, Hunker KL, Birt I, Bergin IL, et al. Molecular genetic evaluation of pediatric renovascular hypertension due to renal artery stenosis and abdominal aortic coarctation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet.* 2022;31(3):334-46.
190. Demir Gündoğan B, Tuğ Bozdoğan S, Ayhan YS, Müjde C, Bişgin A, Çitak E. Clinical findings and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1 patients in a single center of south part of Turkey. *Turkish journal of medical sciences.* 2021.
191. Solmaz AE, Isik E, Atik T, Ozkinay F, Onay H. Mutation spectrum of the NF1 gene and genotype–phenotype correlations in Turkish patients: Seventeen novel pathogenic variants. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* 2021;208:106884.
192. Scala M, Schiavetti I, Madia F, Chelleri C, Piccolo G, Accogli A, et al. Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: A Single-Center Cohort Study. *Cancers (Basel).* 2021;13(8).
193. Tsipi M, Poulou M, Fylaktou I, Kosma K, Tsoutsou E, Pons MR, et al. Phenotypic expression of a spectrum of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) mutations identified through NGS and MLPA. *Journal of the neurological sciences.* 2018;395:95-105.
194. Xu M, Xiong H, Han Y, Li C, Mai S, Huang Z, et al. Identification of mutation regions on NF1 responsible for high-and low-risk development of optic pathway glioma in neurofibromatosis type I. *Frontiers in genetics.* 2018;9:270.
195. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *Jama.* 2014;312(18):1880-7.
196. Fisher MJ, Jones DTW, Li Y, Guo X, Sonawane PS, Waanders AJ, et al. Integrated molecular and clinical analysis of low-grade gliomas in children with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Acta neuropathologica.* 2021;141(4):605-17.
197. Hazan F, Gürsoy S, Unalp A, Yılmaz U, Demirağ B, Aydın Köker S, et al. Evaluation of clinical findings and neurofibromatosis type 1 bright objects on brain magnetic resonance images of 60 Turkish patients with NF1 gene variants. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology.* 2021;42(5):2045-57.
198. Riva M, Martorana D, Uliana V, Caleffi E, Boschi E, Garavelli L, et al. Recurrent NF1 gene variants and their genotype/phenotype correlations in patients with Neurofibromatosis type I. *Genes, chromosomes & cancer.* 2022;61(1):10-21.

199. Pasmant E, Parfait B, Luscan A, Goussard P, Briand-Suleau A, Laurendeau I, et al. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? *European Journal of Human Genetics*. 2015;23(5):596-601.
200. Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, et al. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *Journal of medical genetics*. 2003;40(6):e82-e.
201. Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, et al. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *Journal of molecular neuroscience*. 2007;31(3):273-9.
202. Rosset C, Vairo F, Cristina Bandeira I, Fonini M, Netto CBO, Ashton-Prolla P. Clinical and molecular characterization of neurofibromatosis in southern Brazil. *Expert review of molecular diagnostics*. 2018;18(6):577-86.
203. Toonen JA, Anastasaki C, Smithson LJ, Gianino SM, Li K, Kesterson RA, et al. NF1 germline mutation differentially dictates optic glioma formation and growth in neurofibromatosis-1. *Human molecular genetics*. 2016;25(9):1703-13.
204. Li K, Turner AN, Chen M, Brosius SN, Schoeb TR, Messiaen LM, et al. Mice with missense and nonsense NF1 mutations display divergent phenotypes compared with human neurofibromatosis type I. *Disease models & mechanisms*. 2016;9(7):759-67.
205. Koczkowska M, Chen Y, Callens T, Gomes A, Sharp A, Johnson S, et al. Genotype-phenotype correlation in NF1: evidence for a more severe phenotype associated with missense mutations affecting NF1 codons 844–848. *The American Journal of Human Genetics*. 2018;102(1):69-87.
206. Awad EK, Moore M, Liu H, Ciszewski L, Lambert L, Korf BR, et al. Restoration of Normal NF1 Function with Antisense Morpholino Treatment of Recurrent Pathogenic Patient-Specific Variant c. 1466A> G; p. Y489C. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(12):1320.
207. Long A, Liu H, Liu J, Daniel M, Bedwell DM, Korf B, et al. Analysis of patient-specific NF1 variants leads to functional insights for Ras signaling that can impact personalized medicine. *Human Mutation*. 2022;43(1):30-41.
208. Gutmann DH. Exploring the genetic basis for clinical variation in neurofibromatosis type 1. *Expert review of neurotherapeutics*. 2016;16(9):999-1001.
209. Sculier C, Taussig D, Aeby A, Blustajn J, Bekaert O, Fohlen M. Hippocampal sclerosis and epilepsy surgery in neurofibromatosis type 1: case report of a 3-year-old

child explored by SEEG and review of the literature. *Child's Nervous System*. 2022;38(6):1217-21.

210. Koczkowska M, Chen Y, Callens T, Gomes A, Sharp A, Johnson S, et al. ARTICLE Genotype-Phenotype Correlation in NF1: Evidence for a More Severe Phenotype Associated with Missense Mutations Affecting NF1 Codons 844–848. 2017.

211. Turner AN. Novel Insights into Neurofibromin Function and Human Neurofibromatosis Type 1 Mutations Using Genetically Engineered Mouse Models: The University of Alabama at Birmingham; 2018.

212. Brossier NM, Thondapu S, Cobb OM, Dahiya S, Gutmann DH. Temporal, spatial, and genetic constraints contribute to the patterning and penetrance of murine neurofibromatosis-1 optic glioma. *Neuro-oncology*. 2021;23(4):625-37.

213. Hovelson DH, McDaniel AS, Cani AK, Johnson B, Rhodes K, Williams PD, et al. Development and validation of a scalable next-generation sequencing system for assessing relevant somatic variants in solid tumors. *Neoplasia*. 2015;17(4):385-99.

214. Henderson RA, Williamson K, Cumming S, Clarke MP, Lynch SA, Hanson IM, et al. Inherited PAX6, NF1 and OTX2 mutations in a child with microphthalmia and aniridia. *European Journal of Human Genetics*. 2007;15(8):898-901.

215. Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS letters*. 2002;522(1-3):71-6.

216. Toliat MR, Erdogan F, Gewies A, Fahsold R, Buske A, Tinschert S, et al. Analysis of the NF1 gene by temperature gradient gel electrophoresis reveals a high incidence of mutations in exon 4b. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*. 2000;21(3):541-4.

217. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Human mutation*. 2000;15(6):541-55.

218. Messiaen L, Wimmer K. NF1 mutational spectrum. *Neurofibromatoses*. 16: Karger Publishers; 2008. p. 63-77.

219. Zhang J, Tong H, Fu Xa, Zhang Y, Liu J, Cheng R, et al. Molecular characterization of NF1 and neurofibromatosis type 1 genotype-phenotype correlations in a Chinese population. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-5.

220. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011;32(5):557-63.
221. Robinson PN, Buske A, Neumann R, Tinschert S, Nürnberg P. Recurrent 2-bp deletion in exon 10c of the NF1 gene in two cases of von Recklinghausen neurofibromatosis. *Hum Mutat.* 1996;7(1):85-8.
222. Wimmer K, Roca X, Beiglböck H, Callens T, Etzler J, Rao AR, et al. Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Hum Mutat.* 2007;28(6):599-612.
223. Brems H, Park C, Maertens O, Pemov A, Messiaen L, Upadhyaya M, et al. Glomus tumors in neurofibromatosis type 1: genetic, functional, and clinical evidence of a novel association. *Cancer research.* 2009;69(18):7393-401.
224. Pros E, Gómez C, Martín T, Fábregas P, Serra E, Lázaro C. Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum Mutat.* 2008;29(9):E173-93.
225. Lin F, Zhang D, Chang J, Tang X, Guan W, Jiang G, et al. THSD7A-associated membranous nephropathy in a patient with neurofibromatosis type 1. *Eur J Med Genet.* 2018;61(2):84-8.
226. Yu C, Xie B, Zhao Z, Zhao S, Liu L, Cheng X, et al. Whole Exome Sequencing Uncovered the Genetic Architecture of Growth Hormone Deficiency Patients. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:711991.
227. Evans DG, Bowers N, Burkitt-Wright E, Miles E, Garg S, Scott-Kitching V, et al. Comprehensive RNA Analysis of the NF1 Gene in Classically Affected NF1 Affected Individuals Meeting NIH Criteria has High Sensitivity and Mutation Negative Testing is Reassuring in Isolated Cases With Pigmentary Features Only. *EBioMedicine.* 2016;7:212-20.
228. Melloni G, Eoli M, Cesaretti C, Bianchessi D, Ibba MC, Esposito S, et al. Risk of Optic Pathway Glioma in Neurofibromatosis Type 1: No Evidence of Genotype-Phenotype Correlations in A Large Independent Cohort. *Cancers (Basel).* 2019;11(12).
229. Tian Y, Pesaran T, Chamberlin A, Fenwick RB, Li S, Gau CL, et al. REVEL and BayesDel outperform other in silico meta-predictors for clinical variant classification. *Sci Rep.* 2019;9(1):12752.

230. Chaker-Margot M, Werten S, Dunzendorfer-Matt T, Lechner S, Ruepp A, Scheffzek K, et al. Structural basis of activation of the tumor suppressor protein neurofibromin. *Molecular cell*. 2022;82(7):1288-96.e5.
231. Kiel C, Serrano L. Structure-energy-based predictions and network modelling of RASopathy and cancer missense mutations. *Molecular systems biology*. 2014;10(5):727.
232. Way GP, Sanchez-Vega F, La K, Armenia J, Chatila WK, Luna A, et al. Machine Learning Detects Pan-cancer Ras Pathway Activation in The Cancer Genome Atlas. *Cell reports*. 2018;23(1):172-80.e3.
233. Yang F, Xu S, Liu R, Shi T, Li X, Li X, et al. The investigation for potential modifier genes in patients with neurofibromatosis type 1 based on next-generation sequencing. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:919-32.
234. Razis E, Kotoula V, Koliou G-A, Papadopoulou K, Vrettou E, Giannoulatou E, et al. Is there an independent role of TERT and NF1 in high grade Gliomas? *Translational oncology*. 2020;13(2):346-54.
235. Hutter S, Piro RM, Waszak SM, Kehrer-Sawatzki H, Friedrich RE, Lassaletta A, et al. No correlation between NF1 mutation position and risk of optic pathway glioma in 77 unrelated NF1 patients. *Human genetics*. 2016;135(5):469-75.
236. Li MZ, Yuan L, Zhuo ZQ. Gene diagnosis of infantile neurofibromatosis type I: A case report. *World journal of clinical cases*. 2020;8(22):5678-83.
237. Ko JM, Sohn YB, Jeong SY, Kim HJ, Messiaen LM. Mutation spectrum of NF1 and clinical characteristics in 78 Korean patients with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Neurol*. 2013;48(6):447-53.
238. Frayling IM, Mautner VF, van Minkelen R, Kallionpaa RA, Aktaş S, Baralle D, et al. Breast cancer risk in neurofibromatosis type 1 is a function of the type of NF1 gene mutation: a new genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. 2019;56(4):209-19.
239. Pacot L, Burin des Roziers C, Laurendeau I, Briand-Suleau A, Coustier A, Mayard T, et al. One NF1 Mutation may Conceal Another. *Genes (Basel)*. 2019;10(9).
240. Chai P, Luo Y, Zhou C, Wang Y, Fan X, Jia R. Clinical characteristics and mutation Spectrum of NF1 in 12 Chinese families with orbital/periorbital plexiform Neurofibromatosis type 1. *BMC medical genetics*. 2019;20(1):158.
241. Melean G, Hernández AM, Valero MC, Hernández-Imaz E, Martín Y, Hernández-Chico C. Monozygotic twins with Neurofibromatosis type 1, concordant phenotype and synchronous development of MPNST and metastasis. *BMC cancer*. 2010;10:407.

242. Lee MJ, Su YN, You HL, Chiou SC, Lin LC, Yang CC, et al. Identification of forty-five novel and twenty-three known NF1 mutations in Chinese patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat.* 2006;27(8):832.
243. Park VM, Pivnick EK. Neurofibromatosis type 1 (NF1): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients. *J Med Genet.* 1998;35(10):813-20.
244. Purandare SM, Lanyon WG, Connor JM. Characterisation of inherited and sporadic mutations in neurofibromatosis type-1. *Hum Mol Genet.* 1994;3(7):1109-15.
245. Yimenicioğlu S, Yakut A, Karaer K, Zenker M, Ekici A, Carman KB. A new nonsense mutation in the NF1 gene with neurofibromatosis-Noonan syndrome phenotype. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery.* 2012;28(12):2181-3.
246. Boudry-Labis E, Roche-Lestienne C, Nibourel O, Boissel N, Terre C, Perot C, et al. Neurofibromatosis-1 gene deletions and mutations in de novo adult acute myeloid leukemia. *American journal of hematology.* 2013;88(4):306-11.
247. Kim MJ, Cheon CK. Neurofibromatosis type 1: a single center's experience in Korea. *Korean journal of pediatrics.* 2014;57(9):410-5.
248. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, et al. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat.* 2010;31(3):284-94.
249. Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR, et al. Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat Genet.* 2017;49(11):1593-601.
250. Leach NT, Wilson Mathews DR, Rosenblum LS, Zhou Z, Zhu H, Heim RA. Comparative assessment of gene-specific variant distribution in prenatal and postnatal cohorts tested for Noonan syndrome and related conditions. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 2019;21(2):417-25.
251. Edwards JJ, Rouillard AD, Fernandez NF, Wang Z, Lachmann A, Shankaran SS, et al. Systems Analysis Implicates WAVE2 Complex in the Pathogenesis of Developmental Left-Sided Obstructive Heart Defects. *JACC Basic to translational science.* 2020;5(4):376-86.

252. Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, et al. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. *Journal of medical genetics*. 2007;44(2):131-5.
253. Lo F-S, Lin J-L, Kuo M-T, Chiu P-C, Shu S-G, Chao M-C, et al. Noonan syndrome caused by germline KRAS mutation in Taiwan: report of two patients and a review of the literature. *European journal of pediatrics*. 2009;168(8):919-23.
254. Ko JM, Kim J-M, Kim G-H, Yoo H-W. PTPN11, SOS1, KRAS, and RAF1 gene analysis, and genotype–phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *Journal of human genetics*. 2008;53(11):999-1006.
255. Gremer L, Merbitz-Zahradnik T, Dvorsky R, Cirstea IC, Kratz CP, Zenker M, et al. Germline KRAS mutations cause aberrant biochemical and physical properties leading to developmental disorders. *Human mutation*. 2011;32(1):33-43.
256. Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, Alfares A, Kelly M, Pugh T, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clinical genetics*. 2013;84(5):453-63.
257. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillissen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype–phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *European journal of human genetics*. 2003;11(2):201-6.
258. Jongmans M, Sistermans EA, Rikken A, Nillesen WM, Tamminga R, Patton M, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature. *American journal of medical genetics Part A*. 2005;134(2):165-70.
259. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;78(2):279-90.
260. Bertola DR, Pereira AC, Albano LMJ, Oliveira PSD, Kim CA, Krieger JE. PTPN11 gene analysis in 74 Brazilian patients with Noonan syndrome or Noonan-like phenotype. *Genetic testing*. 2006;10(3):186-91.
261. Hung C-S, Lin J-L, Lee Y-J, Lin S-P, Chao M-C, Lo F-S. Mutational analysis of PTPN11 gene in Taiwanese children with Noonan syndrome. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2007;106(2):169-72.
262. Karow A, Steinemann D, Göhring G, Hasle H, Greiner J, Harila-Saari A, et al. Clonal duplication of a germline PTPN11 mutation due to acquired uniparental disomy

in acute lymphoblastic leukemia blasts from a patient with Noonan syndrome. *Leukemia*. 2007;21(6):1303-5.

263. Pauli S, Steinemann D, Dittmann K, Wienands J, Shoukier M, Möschner M, et al. Occurrence of acute lymphoblastic leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia in a patient with Noonan syndrome carrying the germline PTPN11 mutation p. E139D. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012;158(3):652-8.

264. Jongmans MC, Van Der Burgt I, Hoogerbrugge PM, Noordam K, Yntema HG, Nillesen WM, et al. Cancer risk in patients with Noonan syndrome carrying a PTPN11 mutation. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19(8):870-4.

265. Kosaki K, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, et al. PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(8):3529-33.

266. Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *The Journal of pediatrics*. 2004;144(3):368-74.

267. Elalaoui SC, Kraoua L, Liger C, Ratbi I, Cavé H, Sefiani A. Germinal mosaicism in Noonan syndrome: A family with two affected siblings of normal parents. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(11):2850-3.

268. Brasil AS, Malaquias AC, Wanderley LT, Kim C, Krieger JE, Jorge AA, et al. Co-occurring PTPN11 and SOS1 gene mutations in Noonan syndrome: does this predict a more severe phenotype? *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2010;54:717-22.

269. Prada CE, Zarate YA, Hagenbuch S, Lovell A, Schorry EK, Hopkin RJ. Lethal presentation of neurofibromatosis and Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011;155(6):1360-6.

270. Papadopoulou A, Issakidis M, Gole E, Kosma K, Fryssira H, Fretzayas A, et al. Phenotypic spectrum of 80 Greek patients referred as Noonan syndrome and PTPN11 mutation analysis: the value of initial clinical assessment. *European Journal of pediatrics*. 2012;171(1):51-8.

271. Digilio M, Lepri F, Baban A, Dentici M, Versacci P, Capolino R, et al. RASopathies: clinical diagnosis in the first year of life. *Molecular syndromology*. 2010;1(6):282-9.

272. Ezquieta B, Santomé JL, Carcavilla A, Guillén-Navarro E, Pérez-Aytés A, del Pozo JS, et al. Alterations in RAS-MAPK genes in 200 Spanish patients with Noonan and other neuro-cardio-facio-cutaneous syndromes. Genotype and cardiopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2012;65(5):447-55.
273. Yoon S-R, Choi S-K, Eboeime J, Gelb BD, Calabrese P, Arnheim N. Age-dependent germline mosaicism of the most common noonan syndrome mutation shows the signature of germline selection. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;92(6):917-26.
274. Bean LJ, Tinker SW, da Silva C, Hegde MR. Free the data: one laboratory's approach to knowledge-based genomic variant classification and preparation for EMR integration of genomic data. *Human mutation*. 2013;34(9):1183-8.
275. Xu D, Wang S, Yu W-M, Chan G, Araki T, Bunting KD, et al. A germline gain-of-function mutation in Ptpn11 (Shp-2) phosphatase induces myeloproliferative disease by aberrant activation of hematopoietic stem cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010;116(18):3611-21.
276. Şimşek-Kiper P, Alanay Y, Gülhan B, Lissewski C, Türkyılmaz D, Alehan D, et al. Clinical and molecular analysis of RASopathies in a group of Turkish patients. *Clinical genetics*. 2013;83(2):181-6.
277. Ferreira LV, Souza SC, Montenegro LR, Malaquias AC, Arnhold IJ, Mendonca BB, et al. Analysis of the PTPN11 gene in idiopathic short stature children and Noonan syndrome patients. *Clinical endocrinology*. 2008;69(3):426-31.
278. Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA. The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. *Archives of disease in childhood*. 2007;92(2):128-32.
279. Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergsträsser E, Emanuel PD, et al. The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease. *Blood*. 2005;106(6):2183-5.
280. Zenker M, Horn D, Wiczorek D, Allanson J, Pauli S, Van der Burgt I, et al. SOS1 is the second most common Noonan gene but plays no major role in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Journal of medical genetics*. 2007;44(10):651-6.
281. Neumann TE, Allanson J, Kavamura I, Kerr B, Neri G, Noonan J, et al. Multiple giant cell lesions in patients with Noonan syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome. *European journal of human genetics*. 2009;17(4):420-5.

282. Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype–phenotype correlations. *Human mutation*. 2011;32(7):760-72.
283. Chen P-C, Wakimoto H, Conner D, Araki T, Yuan T, Roberts A, et al. Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome–associated *Sos1* mutation. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(12):4353-65.
284. Binder G, Neuer K, Ranke M, Wittekindt N. PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(9):5377-81.
285. Pierpont EI, Pierpont ME, Mendelsohn NJ, Roberts AE, Tworog-Dube E, Seidenberg MS. Genotype differences in cognitive functioning in Noonan syndrome. *Genes, Brain and Behavior*. 2009;8(3):275-82.
286. Vogelstein B, Civin CI, Preisinger AC, Krischer JP, Steuber P, Ravindranath Y, et al. RAS gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 1990;2(2):159-62.
287. Janssen J, Steenvoorden A, Lyons J, Anger B, Böhlke JU, Bos JL, et al. RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(24):9228-32.
288. Choong K, Freedman MH, Chitayat D, Kelly EN, Taylor G, Zipursky A. Juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 1999;21(6):523-7.
289. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. 2006;107(10):3847-53.
290. Chen Y, Takita J, Hiwatari M, Igarashi T, Hanada R, Kikuchi A, et al. Mutations of the PTPN11 and RAS genes in rhabdomyosarcoma and pediatric hematological malignancies. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006;45(6):583-91.
291. Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Takahashi Y, et al. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatric research*. 2009;65(3):334-40.

292. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(11):1058-66.
293. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, Willis SG, Eide CA, Levine RL, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(8):1749-55.
294. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park M-j, Sotomatsu M, et al. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *International journal of hematology*. 2012;95(5):509-15.
295. Mason-Suares H, Toledo D, Gekas J, Lafferty KA, Meeks N, Pacheco MC, et al. Juvenile myelomonocytic leukemia-associated variants are associated with neo-natal lethal Noonan syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(4):509-11.
296. Lee J, Tartaglia M, Gelb B, Fridrich K, Sachs S, Stratakis C, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome. *Journal of medical genetics*. 2005;42(2):e11-e.
297. Nyström AM, Ekvall S, Strömberg B, Holmström G, Thuresson AC, Annerén G, et al. A severe form of Noonan syndrome and autosomal dominant café-au-lait spots—evidence for different genetic origins. *Acta Paediatrica*. 2009;98(4):693-8.
298. Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:45-68.
299. Zarate YA, Lichty AW, Champion KJ, Clarkson LK, Holden KR, Matheus MG. Unique cerebrovascular anomalies in Noonan syndrome with RAF1 mutation. *Journal of Child Neurology*. 2014;29(8):NP13-NP7.
300. Carcavilla A, Santomé JL, Pinto I, Sánchez-Pozo J, Guillén-Navarro E, Martín-Frías M, et al. LEOPARD syndrome: a variant of Noonan syndrome strongly associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2013;66(5):350-6.
301. Hopper RK, Feinstein JA, Manning MA, Benitz W, Hudgins L. Neonatal pulmonary arterial hypertension and Noonan syndrome: two fatal cases with a specific RAF1 mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(4):882-5.
302. Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, Van De Laar IM, Martens L, et al. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses

with abnormal ultrasound findings. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(9):936-42.

303. Schollen E, Matthijs G, Gewillig M, Fryns J-P, Legius E. PTPN11 mutation in a large family with Noonan syndrome and dizygous twinning. *European journal of human genetics*. 2003;11(1):85-8.

304. Yoshida R, Hasegawa T, Hasegawa Y, Nagai T, Kinoshita E, Tanaka Y, et al. Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(7):3359-64.

305. Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriya S, et al. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *Journal of human genetics*. 2005;50(4):192-202.

306. Krenz M, Yutzey KE, Robbins J. Noonan Syndrome Mutation Q79R in Shp2 Increases Proliferation of Valve Primordia Mesenchymal Cells via Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling. *Circulation research*. 2005;97(8):813-20.

307. Denayer E, Devriendt K, de Ravel T, Van Buggenhout G, Smeets E, Francois I, et al. Tumor spectrum in children with Noonan syndrome and SOS1 or RAF1 mutations. *Genes, chromosomes & cancer*. 2010;49(3):242-52.

308. Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, et al. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;93(1):173-80.

309. Bertola DR, Yamamoto GL, Almeida TF, Buscarilli M, Jorge AA, Malaquias AC, et al. Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164(11):2952-7.

310. Joyce S, Gordon K, Brice G, Ostergaard P, Nagaraja R, Short J, et al. The lymphatic phenotype in Noonan and Cardiofaciocutaneous syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24(5):690-6.

311. Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, et al. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Human genetics*. 2016;135(2):209-22.

312. Kouz K, Lissewski C, Spranger S, Mitter D, Riess A, Lopez-Gonzalez V, et al. Genotype and phenotype in patients with Noonan syndrome and a RIT1 mutation. *Genetics in Medicine*. 2016;18(12):1226-34.

313. Arroyo-Carrera I, Martin-Fernandez R, Vera-Torres M, Botet-Rodriguez J. RIT1: a novel gene associated with Noonan syndrome. *Revista de Neurologia*. 2016;63(8):358-62.
314. Castellanos E, Rosas I, Negro A, Gel B, Alibés A, Baena N, et al. Mutational spectrum by phenotype: panel-based NGS testing of patients with clinical suspicion of RASopathy and children with multiple café-au-lait macules. *Clinical genetics*. 2020;97(2):264-75.
315. Bettegowda C, Upadhayaya M, Evans DG, Kim A, Mathios D, Hanemann CO, et al. Genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis and their potential clinical use. *Neurology*. 2021;97(7 Supplement 1):S91-S8.
316. Trevisson E, Morbidoni V, Forzan M, Daolio C, Fumini V, Parrozzani R, et al. The Arg1038Gly missense variant in the NF1 gene causes a mild phenotype without neurofibromas. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(5):e616.
317. Koczkowska M, Callens T, Chen Y, Gomes A, Hicks AD, Sharp A, et al. Clinical spectrum of individuals with pathogenic NF1 missense variants affecting p.Met1149, p.Arg1276, and p.Lys1423: genotype-phenotype study in neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat*. 2020;41(1):299-315.
318. Jouhilahti E-M, Peltonen S, Heape AM, Peltonen J. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. *The American journal of pathology*. 2011;178(5):1932-9.
319. Van Es S, North KN, McHugh K, De Silva M. MRI findings in children with neurofibromatosis type 1: a prospective study. *Pediatric radiology*. 1996;26(7):478-87.
320. Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, Kuroda Y, Hiura K, Hujino K, et al. Cranial MR imaging in patients with von Recklinghausen's disease (neurofibromatosis type I). *Neuropediatrics*. 1990;21(4):193-8.
321. E. Tİ. Çocukluk Çağı Nörofibromatozis Tip 1 Tanılı Olgularda Kardiyak Tutulumun Belirlenmesi, RASopatili Olguların Tanımlanması [Tıpta Uzmanlık Tezi]. Ankara: Sağlık Bilimleri Üniversitesi; 2018.
322. Jongmans M, Otten B, Noordam K, van der Burgt I. Genetics and variation in phenotype in Noonan syndrome. *Hormone Research in Paediatrics*. 2004;62(Suppl. 3):56-9.
323. Gelb BD, Roberts AE, Tartaglia M. Cardiomyopathies in Noonan syndrome and the other RASopathies. *Progress in pediatric cardiology*. 2015;39(1):13-9.

324. Lissewski C, Chune V, Pantaleoni F, De Luca A, Capri Y, Brinkmann J, et al. Variants of SOS2 are a rare cause of Noonan syndrome with particular predisposition for lymphatic complications. *European Journal of Human Genetics*. 2021;29(1):51-60.
325. Kratz CP, Zampino G, Kriek M, Kant SG, Leoni C, Pantaleoni F, et al. Craniosynostosis in patients with Noonan syndrome caused by germline KRAS mutations. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009;149(5):1036-40.
326. Nyström A-M, Ekvall S, Berglund E, Björkqvist M, Braathen G, Duchon K, et al. Noonan and cardio-facio-cutaneous syndromes: two clinically and genetically overlapping disorders. *Journal of medical genetics*. 2008;45(8):500-6.
327. Lasho T, Patnaik MM. Juvenile myelomonocytic leukemia—A bona fide RASopathy syndrome. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2020;33(2):101171.
328. Oliveira JB, Bidère N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(21):8953-8.
329. De Filippi P, Zecca M, Lisini D, Rosti V, Cagioni C, Carlo-Stella C, et al. Germ-line mutation of the NRAS gene may be responsible for the development of juvenile myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2009;147(5):706-9.

EKLER

Ek-1. Etik kurul kararı

