



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

**TÜM EKSON DİZİLEME YÖNTEMİ İLE
ARTERİOVENÖZ MALFORMASYONLARDA
SOMATİK MUTASYON İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. BARAN YILMAZ

İstanbul, 2011

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

TÜM EKSOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE
ARTERİOVENÖZ MALFORMASYONLARDA
SOMATİK MUTASYON İNCELENMESİ

Uzmanlık Tezi

Dr. BARAN YILMAZ

Danışman: PROF.DR. TÜRKER KILIÇ

İstanbul, 2011

İçindekiler

KISALTMALAR	I
ABSTRACT	II
ÖZET	III
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
SEREBRAL VASKÜLER MALFORMASYONLAR	4
ARTERİOVENÖZ MALFORMASYONLAR	6
AVM Epidemiyoloji, Klinik ve Doğal Seyir	6
AVM Patoloji	10
AVM Moleküler Biyoloji ve Genetik	12
AVM'lerde Yüksek Ölçekli Genom Çapı Polimorfizm Analizleri	18
AVM'lerde Yüksek Ölçekli Mikroarray Çalışmaları	19
TÜM EKZOM DİZİLEME İLE İNCELEME YÖNTEMİ	21
MATERYAL-METOD	24
HASTALARDAN DOKU VE KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	24
ÖRNEKLERDEN DNA İZOLASYONU	24
NIMBLEGENE SİSTEMİ İLE TOTAL EKZOM DİZİLEME	24
BULGULAR	26
TARTIŞMA	31
SONUÇ	34
KAYNAKÇA	35

KISALTMALAR

APO E2	apolipoprotein e2
ANG	angiopoietin
AVM	arteriovenöz malformasyon
CM	kavernöz malformasyon
CNV	copy of nuber variation
EGFR	epidermal growth faktör reseprörü
ENG	endoglin
GWAS	genome-wide association study
HHT	herediter hemorajiktelenjektazi
IL	interleukin
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	messenger ribonükleik asit
rRNA	ribozomal ribonükleik asit
tRNA	transfer ribonükleikasit
TNF	tumor necrosis factor
SNP	single-nucleotide polymorphism
STA	superfisyel temporal arter
VEGF	vascular endothelial growth factor

ABSTRACT

Arteriovenous malformations(AVM), cavernous malformations(CM), venous anjiomas(VA) and capillary telengiectasias are four types of cerebrovasküler malformations. AVM's are the most common symptomatic vascular malformations.

The knowledge about molecular pathogenesis of AVM's has been improving, however, it is still inadequate to identify the factors in development of AVM's.

Descriptive studies about expression of many molecules in angiogenesis and also some functional studies are unable to explain the mechanism of molecular pathogenesis of AVM's.

In this study, we identified the putative somatic mutations in genes that have role in pathophysiology of AVM's. Total exome sequencing analysis has been used in idetifying the mutated genes.

We performed whole exome capture and Illumine sequencing on AVM-blood pairs from subjects who were operated in Marmara University Department of Neurosurgery and Institute of Neurological Sciences.

For somatic mutation discovery, positions in both AVM and blood DNA were evaluated by two-tailed Fisher's exact test $p < 10^{-4}$. The genes are ZGPAT, QTRT1, ANO7, HMHA1, HSPG2, SIGLEC1, ADAMTSL4, CROCC and LAMA5.

Functional researchs and transgenic animal model studies about these genes that have somatic mutations will make significant progress in enlightening the molecular pathogenesis of AVM's.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: AVM, Exome, Mutation

ÖZET

Serebrovasküler malformasyonlar, arteriovenöz malformasyonlar(AVM), kavernöz malformasyonlar(CM), venöz anjiomlar(VA) ve kapiller telanjiektaziler olmak üzere dört tiptir. AVM'ler semptom oluşturan en sık vasküler malformasyonlardır.

AVM'lerin moleküler patogenezinin anlaşılmasında azımsanmayacak yol kat edilmiş olsa da, elde edilen bulgular, bu malformasyonların oluşum ve gelişim nedenlerinin aydınlatılması konusunda henüz çok yetersizdir.

Bu çalışmada, AVM'lerin patofizyolojisinde rol aldığı düşünülen ve gelişme sırasında defekti olan genlerin fonksiyonlarını yerine getirememelerinden kaynaklanan bu hastalıkta, total ekzom dizileme yöntemi kullanılarak, genom içerisinde RNA ifadenmesi ve dolayısıyla protein üretimde görevleri olan ekzomlardan mutasyon olanları belirlenmiştir.

Çalışmada, Marmara Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü bünyesinde yapılan ameliyatlara cerrahi olarak çıkarılmış AVM dokuları ve bu hastalara ait kan örnekleri kullanılarak eşleştirilmiş dizileme yapılmıştır.

Sonuçların two-tailed Fischer's exact test ile istatistiksel analiziyle $p < 10^{-4}$ olan somatik mutasyon olan genler belirlendi. Bu genler, ZGPAT, QTRT1, ANO7, HMHA1, HSPG2, SIGLEC1, ADAMTSL4, CROCC ve LAMA5'dir.

Belirlenen genlerin fonksiyonel araştırmaları ve model transgenik hayvan çalışmalarından elde edilecek bulguların değerlendirilmesi ile AVM'nin moleküler patogenezinin aydınlatılması konusunda önemli yol katedileceği beklenebilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: AVM, Ekzom, Mutasyon

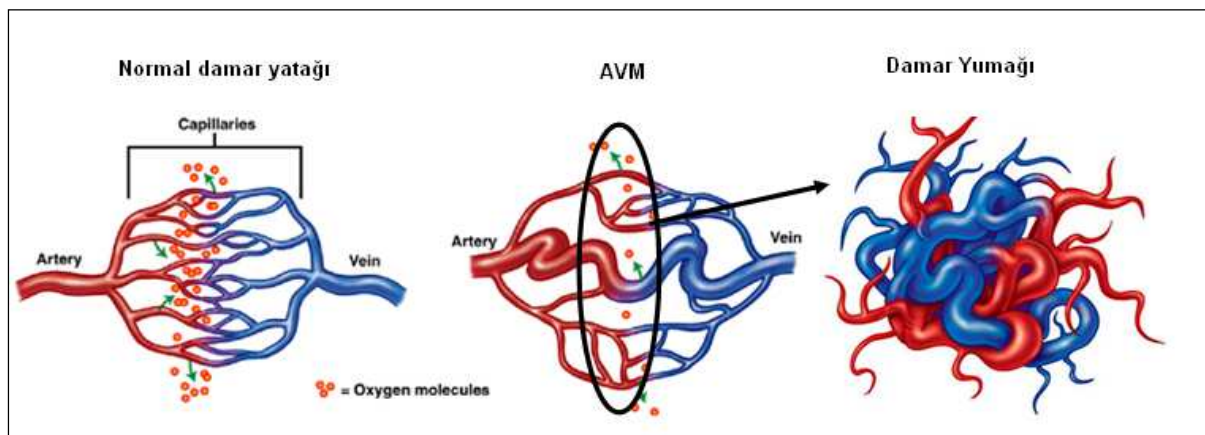
GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral Vasküler Malformasyon'lar, dural arteriovenöz malformasyonlar dışında beyin ya da meninkslerdeki vasküler yapıların, embriyonik, fetal ve sonraki gelişim sürecinin herhangi bir aşamasındaki duraksamaya bağlı olarak oluşup, patolojik olayın derecesine ve oluşum evresine göre farklı histolojik görünümler sergileyen lezyonlar olarak tanımlanmaktadır[1].

Halen en popüler sınıflama olan Mc Cormick [2] sınıflamasına göre serebrovasküler malformasyonlar dört tiptir: Arteriovenöz malformasyonlar (AVM), kavernöz malformasyonlar (CM), Venöz Angiomas (VA) ve telanjiektaziler.

Beynin damarsal malformasyonlarına, genel populasyonda % 0.5-4 oranında rastlanmakta olup[3, 4] AVM'ler semptom oluşturan en sık vasküler formasyonlardır[5, 6].

AVM'ler arteriel kan akımının, arada yer alan normal kapiller yatak olmaksızın, doğrudan venlere drene olduğu anormal damar koleksiyonu olarak tanımlanmaktadır.



Resim 1. Normal damar yatağı, AVM'li damar yapısı ve damar yumağı.

AVM'ler normal kapiller yatak yokluğu nedeniyle konjenital oldukları düşünölmekteydi[7, 8]. Buna karşın, farklı etkenlerin de AVM oluşumuna yol açabileceğı öne süröldü. Son yıllarda yayınlanan total eksizyon ya da radyocerrahi sonrası anjio-negatif olup takiplerinde yeniden ortaya çıkan rekürren AVM olguları patogeneizde fizyolojik, bölgesel anjiojenik ve hormonal faktörlerin etkili olabileceğini düşünörmüşür[9, 10].

AVM'lerin herediter hemorajik telenjektazi (HHT) (Osler-Weber-Rendu Sendromu) hastalığıyla birlikteliğı ve çeşitli ailesel AVM olgularının bildirilmesiyle AVM'lerin genetik altyapıya sahip olabilecekleri öngörölmüşür[11-13].

Son on yıl içerisinde, insan genom projesinden ortaya çıkan bilgilerle, hastalıklara neden olan genetik faktörlerin tanımlanmasında çok önemli gelişmeler kaydedildi. DNA ve protein düzeyindeki etkileşimlerin geniş ölçekli taramaları ve biyoinformatik analizleri, hastalıkların patolojisini anlamının ötesinde, bu hastalıklara moleküler tedavi yaklaşımlarının kapılarını açtı. Bu ilerlemeler, diğere birçok hastalıkta olduğı gibi AVM'lerin patogenezinde yer alan moleküler ve genetik etmenlerin aydınlatılması konusunda da çok yardımcı oldu. Bu gelişmelere ek olarak, gelişimsel dönemdeki damarlanma mekanizmalarından elde edilen yeni bulgular da AVM'lerin moleküler patogenezinin anlaşılmasına hız kazandırdı.

AVM'lerin moleküler patogenezlerinin anlaşılmasında azımsanmayacak yol kat edilmiş olsa da, elde edilen bulgular, bu malformasyonların oluşum ve gelişim nedenlerinin aydınlatılması konusunda henüz çok yetersizdir. Yüksek ölçekli mikroarray ve yeni nesil DNA dizileme teknikleri kullanılarak, ailesel AVM hastalarından elde edilecek kan

örneklerinde ve cerrahi olarak çıkarılmış AVM dokularında gerçekleştirilecek mutasyon taramaları ile AVM'ye neden olan sorumlu genlerin belirlenmesi patogenezin aydınlatılabilmesi için çok önemlidir.

Bu çalışmanın amacı AVM'lerin patofizyolojisinde rol aldığı düşünülen ve gelişme sırasında defekti olan genlerin fonksiyonlarını yerine getirememelerinden kaynaklanan bu hastalıkta, total ekzom dizileme yöntemi kullanılarak, genom içerisinde RNA ifadenmesi ve dolayısıyla protein üretimde görevleri olan ekzomlardan mutasyon olanlarının belirlenmesidir.

Çalışmada, Marmara Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü bünyesinde yapılan ameliyatlara cerrahi olarak çıkarılmış AVM dokuları ve bu hastalara ait kan örnekleri kullanılmıştır. Dokular ameliyat sonrasında Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsünde bulunan doku bankasında sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Kan örnekleri ise 8.5ml'lik ACD tüpleri içerisine alınmış ve çalışma gününe kadar +4°C de saklanmıştır.

Doku ve kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıp DNA dizileri yaklaşık 100 baz çifti gruplar halinde okumalar tamamlandıktan sonra sisteme entegre olan yazılımlar yardımıyla, normal diziler ile hibridizasyon göstermeyen diziler arasındaki nükleotit farklılıkları karşılaştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

SEREBRAL VASKÜLER MALFORMASYONLAR

Serebral vasküler malformasyonların otopsi yada cerrahi materyalinden elde edilen örneklemelerle yapılmış ilk patolojik tanımlamalar 1920 yıllardaki Landau, Cushing ve Bailey'in çalışmalarına kadar uzanır[14]. Günümüzde kabul edilen sınıflamanın ilk biçimi 1966'da McCormick [1] tarafından yayınlanmış ve 1984'te yine kendisi tarafından değiştirilerek son şeklini almıştır [2]. Buna göre serebral vasküler malformasyonlar dört ayrı alt gruptan oluşmaktadır:

1. Arteriovenöz Malformasyonlar (AVM)
2. Kavernöz Malformasyonlar (CM)
3. Venöz Anjiomlar (VA)
4. Kapiller Telanjiektaziler

İlk sınıflamada bulunan ve varisler olarak tanımlanan alt grup 1984 sınıflamasında VA'lara dahil edilmişlerdir.

Ancak ilk kez 1993 yılında işaret edilen, aynı lezyon içerisinde birden fazla malformasyonun aynı anda görüldüğü (karışık tip; örneğin bir CM'nun belli bir bölümünde telanjiektatik alanların bulunması), yada lezyonun yalnız bir kategorinin niteliklerini taşımadığı (transizyonel tip; ne tam olarak AVM ne de CM morfolojik niteliklerini göstermesi) olguların sayısı giderek artmaktadır.

Damarsal yapıların konfigürasyonu, beyin dokusu-malformasyon ilişkisinin niteliği, damar duvarının histopatolojisi sınıflamada temel oluşturmuştur. (Tablo 1).

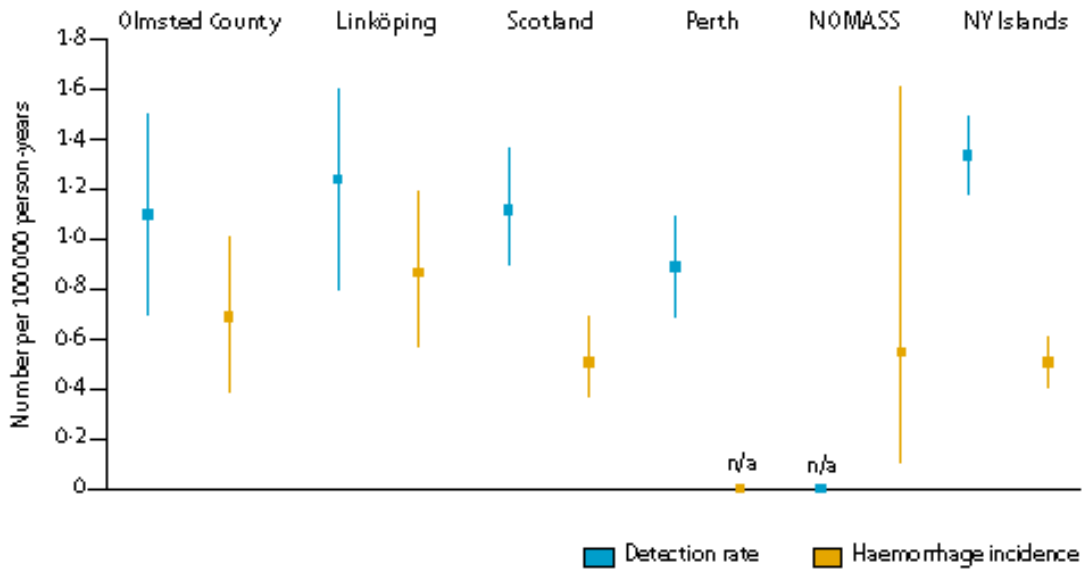
Tablo 1: Vasküler Malformasyonların Histopatolojik Sınıflaması [15, 16]

Vasküler Malformasyon	Histolojisi	İnsidans (otopsi)
AVM	<p>Anormal arter ve ven kümeleri</p> <p>'Hipertrofik arterler ve arterleşmiş venler'</p> <p>Malformasyonun içerisinde değişim gösteren beyin parenkimi bulunur</p> <p>Kapiller yapı bulunmaz</p> <p>Damar duvarında düzkas tabakası hipertrofiktir</p>	%1
CM	<p>Malformasyon içerisinde beyin dokusu bulunmayan bütünsel bir yapıdadır.</p> <p>Değişik büyüklüklerde sinozoidal kanallardan oluşur</p> <p>Damar duvarında düzkas tabakası ve elastik fibriller bulunmaz</p>	%0.4
VA	<p>Anormal yerleşim gösteren, genişlemiş venöz yapılar</p> <p>Lezyon normal beyin dokusunu drene etmektedir</p>	%2.09
Telenjiektazi	<p>Kapiller-türü damarsal yapılardan oluşur.</p> <p>Normal beyin dokusu ile birlikte dir</p>	0.7%

ARTERİOVENÖZ MALFORMASYONLAR

AVM Epidemiyoloji, Klinik ve Doğal Seyir

AVM'ler en sık rastlanan semptomatik vasküler formasyonlardır[17]. İnsidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte büyük otopsi serilerinde görülme sıklığı % 1.4-4.3 olarak bildirilmiştir[18]. Çeşitli toplumlarda yapılan toplum tabanlı retrospektif ve kesitsel çalışmalarda prevalans 1-10/100 000 kişi olarak bildirilmiştir[4, 19].



Tablo 2. AVM'lerin yıllık görülme oranı ve kanama insidansı taraması[4]

AVM'ler tüm inmelerin %2'sini[5, 17], 15-45 yaş arası intraserebral kanamaların %38'ini [6] ve tüm spontan subaraknoidal kanamaların %4-5'ine sebep olarak anevrizmaların arkasından ikinci sırada gelir [20].

AVM'ler lokalizasyon açısından supratentorial kompartmanda çoklukla bulunmakla birlikte, serebellar hemisferlerde de en sık rastlanan vasküler malformasyonlardır[21]. Beyin sapında nadiren bulunurlar ve bu lokalizasyonda cerrahi serilerde ilk sırayı CM'lara bırakırlar. AVM'lerin yaklaşık %2'si multipldir[22, 23].

AVM'lerin doğal seyrini açıklamaya yönelik çalışmalar tanısı konmuş ancak tedavi edilmemiş/edilememiş olguları konu olarak alır. Oysa günümüzde tedavi edilmeyen/edilemeyen AVM olgularının sayısı gelişen mikrocerrahi yöntemleri, embolizasyon ve Gamma Knife gibi tedavi metotları nedeniyle sığırna yaklaşmıştır. Bu nedenle AVM'lerin doğal seyrini belirlemeye yönelik Svien[24] (1956), Perret[25] (1966), Schatz[26] (1966), Forster[27] (1972), Morello ve Borghi[28] (1973), Michelsen[29] (1979), Drake[30] (1979), Pellettieri[31] (1979), Luessenhop[32] (1984), Torner (175) (1984), Wilkins[33] (1985), Heros[34, 35] (1986 ve 1987), Yaşargil[16] (1987), Ondra[36] (1990) ve Hernesniemi[37] (2008) tarafından çeşitli yayınlar yapılmıştır. En güncel olarak ta ARUBA çalışması (ARUBA STUDY[38, 39]) halen devam etmektedir.

2008 Helsinki Üniversitesi'nin çalışmasında[37], toplam 631 AVM hastasından 238'i semptomatik ancak tedavi edilmemiş olgu olarak ortalama 13.5 sene takip edilmişler ve bu incelemenin sonunda AVM'lerin doğal seyrine ait aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Yıllık (yeniden) kanama hızı daha önce kanamış AVM hastalarında % 6.2; hiç kanamamışlarda ise % 2.3'tür
2. Yıllık mortalite + major morbidite oranı %2.7'dir. Morbidite oranı kanama ile kliniğe gelen hastalarda yüksektir.
3. Kanama geçiren hastanın bir sonraki kanaması ortalama 7.7 yıl sonra olmaktadır.

1990'da Marks ve ark. [40], kanamayı kolaylaştıran anjiyografik bulgular :

- a) Santral venöz drenaj,
- b) İntranidal anevrizmanın varlığı,
- c) Periventriküler yerleşim olarak belirtmişlerdir.

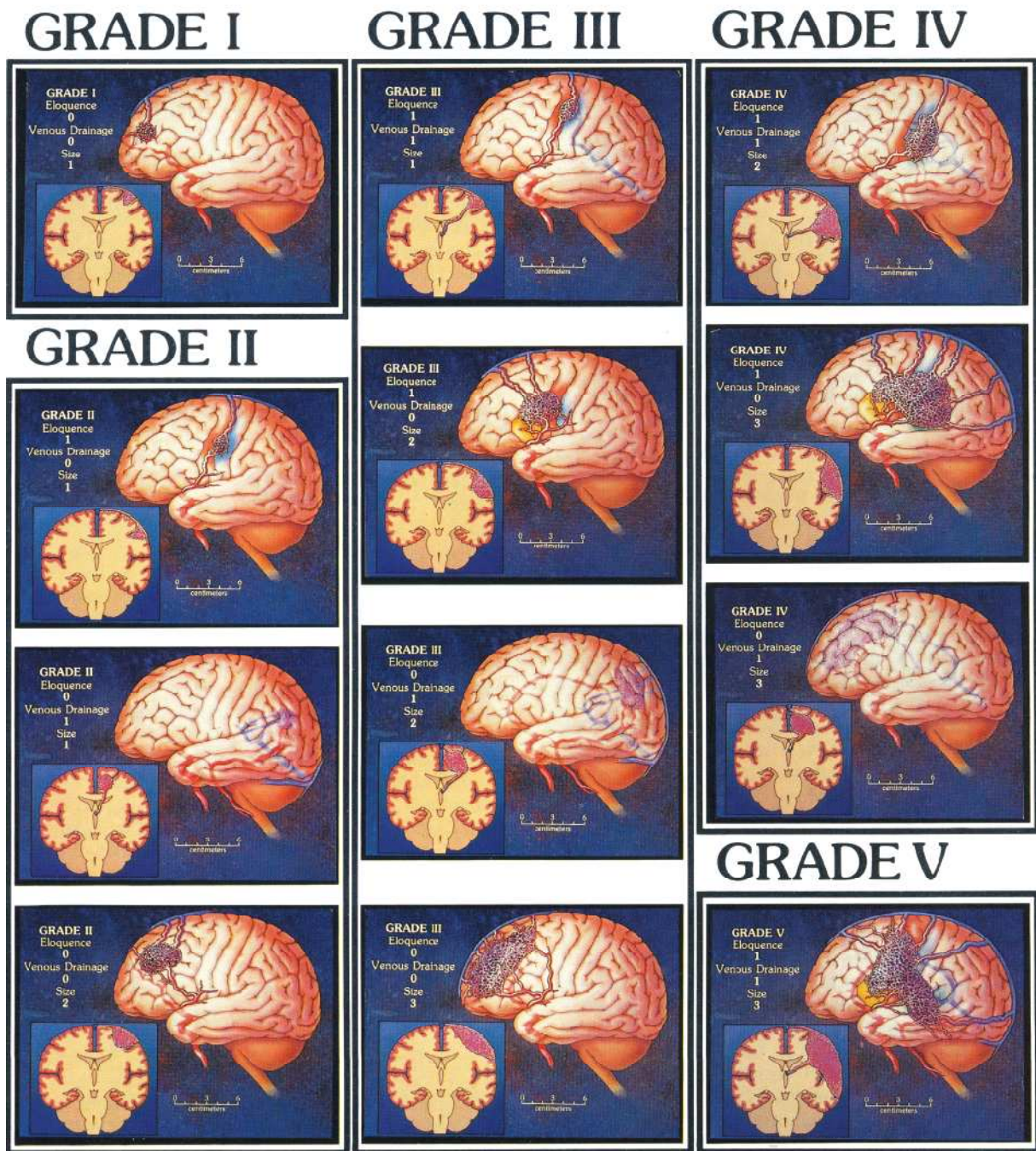
AVM'ler klinikte kendilerini (insidansı sık olandan az olana doğru) spontan intrakranial kanama, nöbet geçirme, başağrısı, nörolojik kayıp yada kayıpta ilerlemeyle gösterirler.

AVM'lerde prognostikasyonu belirlemede çeşitli evreleme sistemleri kullanılmıştır. En popüler olanı Spetzler ve Martin sistemidir[41].

PARAMETRE	SKOR
AVM'nin Büyüklüğü	
<3 cm	1
3-6 cm	2
>6 cm	3
Hassas Anatomik Bölge (Eloquency)	
Hayır	0
Evet	1
Venöz Drenaj Tipi	
Yüzeyel	0
Derin	1
Skor Toplamı =	AVM Grade

Tablo 5. Spetzler ve Martin AVM Evreleme Sistemi [41]

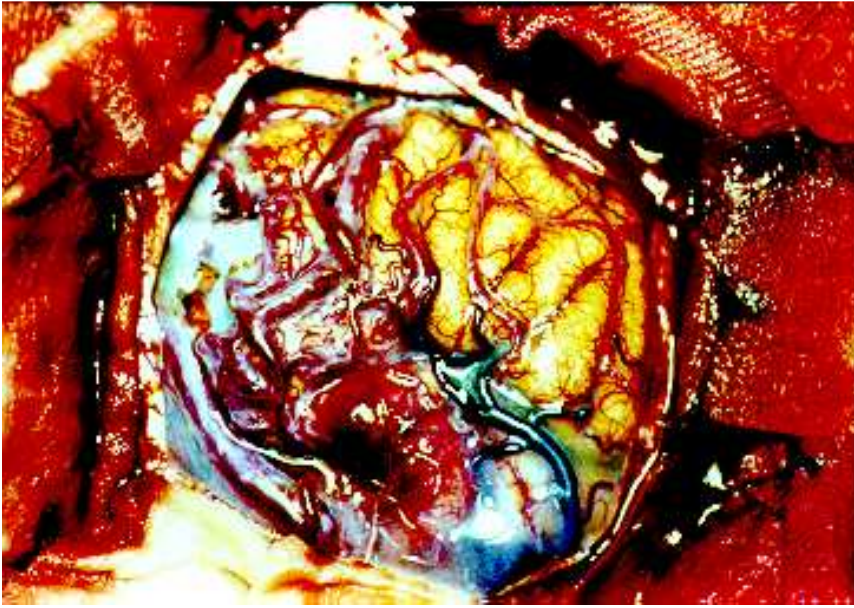
Grading system for arteriovenous malformations



Resim 3. AVM'lerde derecelendirme (Spetzler 1986, orijinal makaleden)[41]

AVM Patoloji

AVM'ler makroskopik olarak değişik çap ve kalınlıktaki arter ve venlerden oluşan anormal damar yumağı şeklinde grlrlere[42]. Anormal damarlardan oluşan bu yumak içerisinde CM'lerden farklı olarak leptomeningial yada parenkimal dokular bulunabilir[43]. Serebral hemisferlerde olanlar genellikle tabanı kortekste bulunan ve serebral sulkus içerisinde, apeksi lateral ventriküle doğru yerleşim gösterirler.



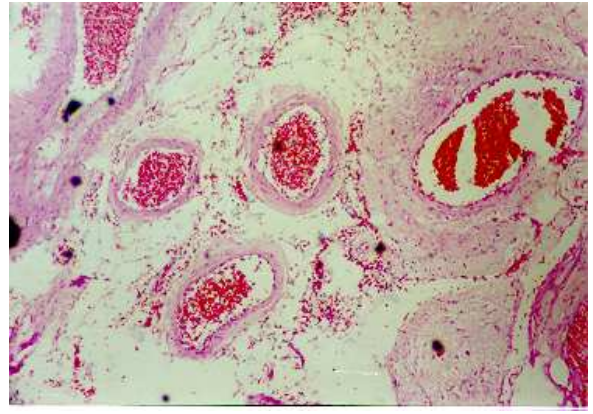
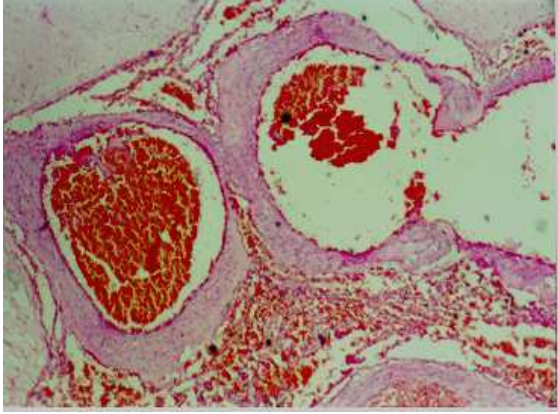
Resim 4. Peroperatif kortikal yerleşimli AVM'nin görünümü

Mikroskopik olarak incelendiğinde AVM'lerin değişime uğramış arteryal ve venöz yapıları içerdiği görülür[44]. Elastik lamina arterden artere değişim göstererek, bazen parçalanmış bazen de bütünlüğünü korumuş görünüm sergilerler. Modifikasyon gösteren venöz yapıların ise genellikle elastik lamina içermediği ancak her zaman tunika mediasının kalınlaşmış olduğu görülür. Bu nedenle AVM'deki venöz yapılara 'arterleşmiş venler' tanımlaması yapılır[45]. Özellikle değişime uğramış venöz damarlarda görülen düz kas hiperplazisi alanları histolojik olarak birbirinin üstüne yığılmış gibi görünen düz kas hücrelerinden, fibroblastlardan ve

interstisyel bağ dokusundan oluşur ve 'fibromuskular yastıklar' olarak isimlendirilirler.

AVM'lerin mikroskopik incelemelerinde tromboze olmuş ve rekanalizasyon gösteren vasküler kanallarla karşılaşılmakta olup; bu bulgular, AVM yapısındaki dinamik değişikliklerin bir göstergesi olmaktadır[46].

Özetleyecek olursak; arteriyel ve venöz sistemler arasında normal şartlarda bulunması gereken kapiller dokunun olmaması, AVM histolojisini belirleyen temel nedeni oluşturur [8]. Sonuçta oluşan arteriovenöz hemodinamik şant, venöz yapılarda intraluminal basıncın artmasına sebep olur. Bu fizyolojik değişim, yukarıda anlatılan, venöz ektazi, 'hibrid' damarlanmanın oluşması ve olup geçen subklinik kanamalarla meydana gelen değişiklikler gibi morfolojik bulguların saptanmasına neden olur [45].



Resim 5: AVM mikroskopik kesiti(100x) **Resim 6:** AVM mikroskopik kesiti (40x)

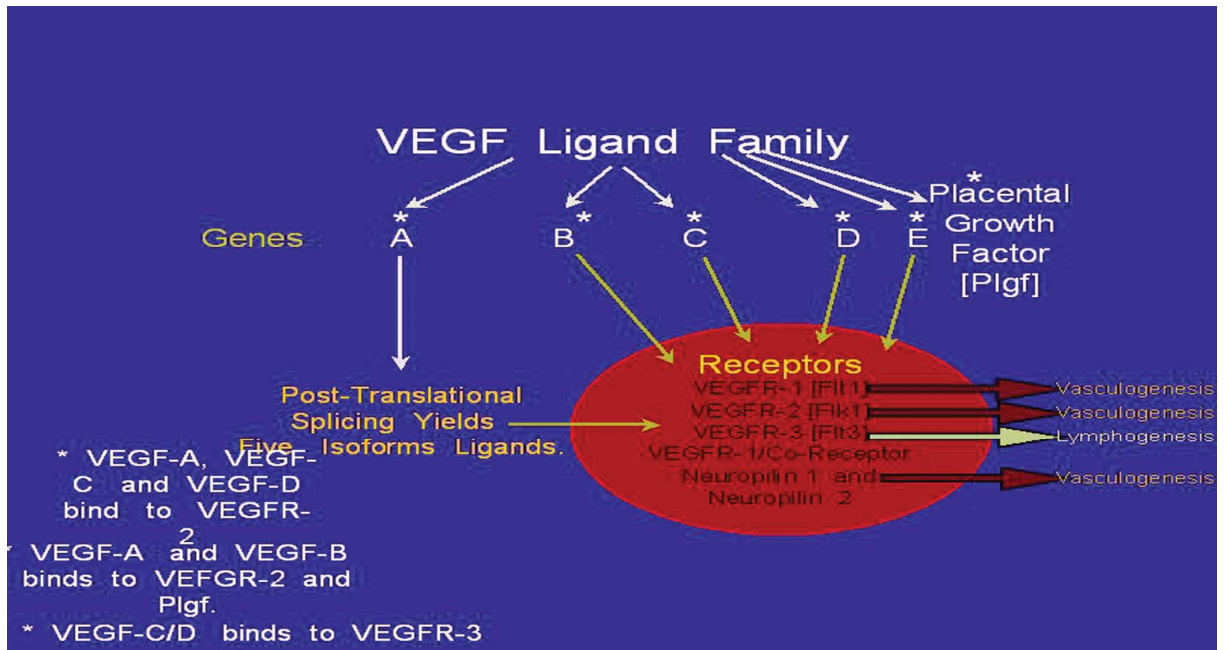
AVM Moleküler Biyoloji ve Genetik

AVM'lerin etiyolojisi halen bilinmezliğini korurken; yakın zamanda yapılmış çalışmalarda, sporadik AVM'lerin patogeneğinde genetik faktörlerin rolü olabileceği öngörülmüştür[47-52]

Yaklaşık 900 ekspresyonu altere gen AVM'ler ile ilişkilendirilmiştir[53]. Bu genlerden yaklaşık 300 ü upregüle, 600 ü ise downregüle olduğu bildirilmiştir[54]. Bu genler çeşitli büyüme faktörlerini, hücre adezyon ve ECM faktörlerini, enflamatuvar faktörleri, MMP'ler ve bazı hormonları kodlamaktadırlar.

Büyüme Faktörleri

VEGF: 6 adet alttipi mevcut olup ana izoformu *VEGF-A*'dır[53, 55, 56]. *VEGF-A* AVM'lerde komşu astroglia da eksprese edilmekte iken; *VEGF-C* ve *VEGF-D*'nin AVM nidusunda ekspresyonu yüksektir. Ayrıca *VEGF-C* ve *VEGF-D* AVM büyümesine katkısı olabileceği bildirilmiştir[57].



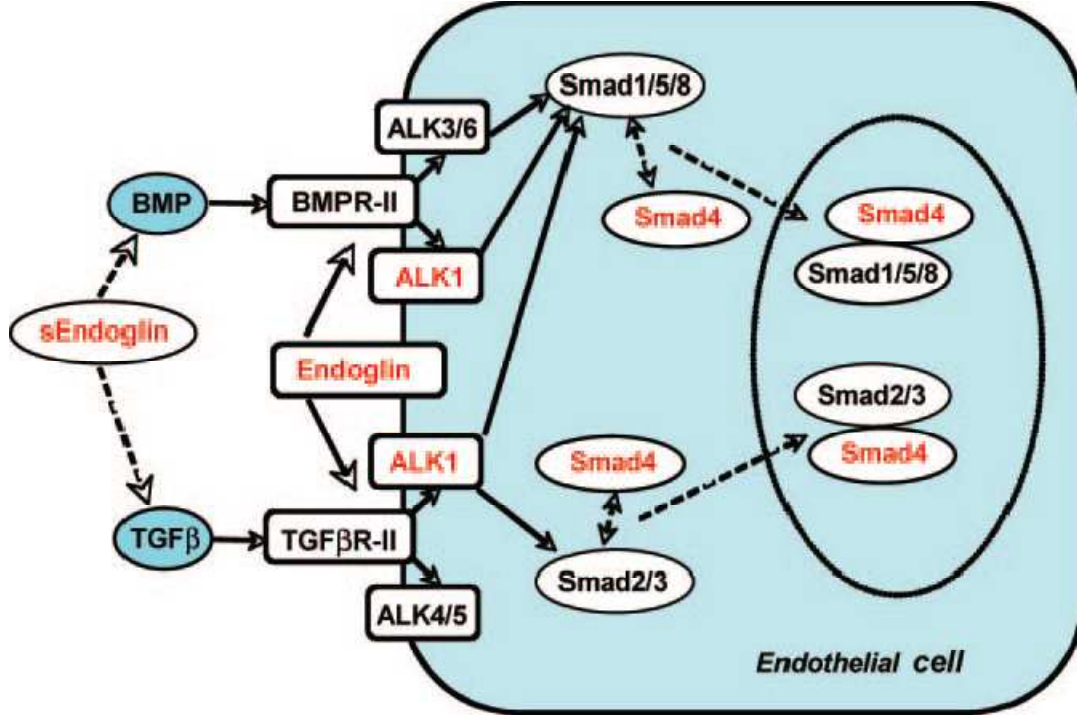
Resim 7. VEGF [13]

VEGF çözünebilir bir faktör olup hem in vivo hem de in vitro olarak vasküler endotel hücrelerde güçlü mitojenik etkiye sahiptir[58-60]. *VEGF* embriyonik damarsal gelişim döneminde yüksek düzeylerde eksprese edilirken, erişkin beyin damarlarında baskılanmıştır[61, 62]. *VEGF* ekspresyonu AVM damarlarının media ve endotel tabakasında yüksektir[63]. İnkompakt embolize edilmiş AVM dokularının patolojik incelemelerinde, yaklaşık dört üçünde *VEGF* ekspresyonu olduğu; buna karşın, embolize edilmemiş AVM dokularında yaklaşık dörtte birinde ekspresyon saptanmıştır[64, 65]. Bu bulgu ile parsiyel embolize edilmiş AVM'lerin neden tekrarladığı açıklanabilir.

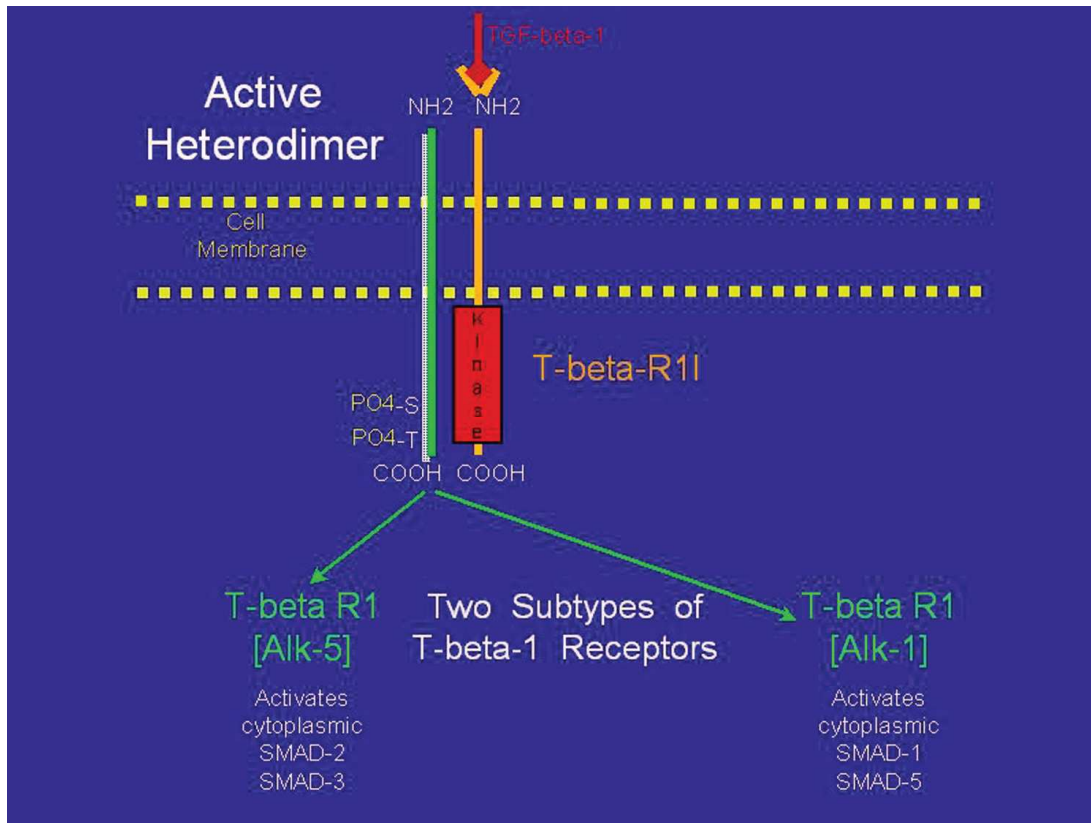
TGF Ailesi: Damarsal gelişimdeki rolleri kompleks ve çok boyutludur. *TGF β* , birçok sitoplazmik ve hücre çekirdeğine ait faktörlerin aktivasyonunu başlatan Tip I ve ya II reseptörlerin dimerizasyonunu aktive etmektedir[66]. Serebral AVM'nin, hastaların %10-25'inde görüldüğü Hereditör Hemorajik Telenjektazi tip 1(HHT-1) hastalığında *TGF β 1* reseptör kompleksindeki proteinleri kodlayan *ENG(endoglin)* geni mutasyona uğramıştır[67, 68]. *Endoglin* ve/ve ya endotelial proliferasyondaki etkilerini arttırdığı *ALK1*'deki mutasyonlar vasküler malformasyonlara (HHT-1 ve HHT-2) neden olabildiği gibi[69, 70], *ALK1* varyantlarının sporadik AVM riski ile de ilişkili olabileceği bildirilmiştir[51]. HHT ve Kombine Juvenil Polipozis'te *SMAD4* mutasyonları tanımlanmıştır[71].

ALK-1, *endoglin* ve *SMAD4*, *TGF β* ailesinin sinyal yollarının birer parçasıdır[72]. Bu genlerin 'knocked out' olduğu fareler, embriyo halindeyken ölmektedirler. Buna karşın, birer kopyalarının 'knocked out' olduğu fareler HHT ile benzer özellikler göstermekte olup 'AVM varı' vasküler displazileri spontan olarak oluşturmaktadırlar. Bu malformasyonlar göreceli olarak normal matür vasküler yapılanma

olmasına rağmen, küçük damar malformasyonu ve düz kas yokluğu esas patolojiyi oluşturmaktadır[73-77]. Ayrıca, *ALK5* aktivasyonu endotel hücre proliferasyon ve migrasyonun inhibisyonunu modüle ediyor olabilir[13].



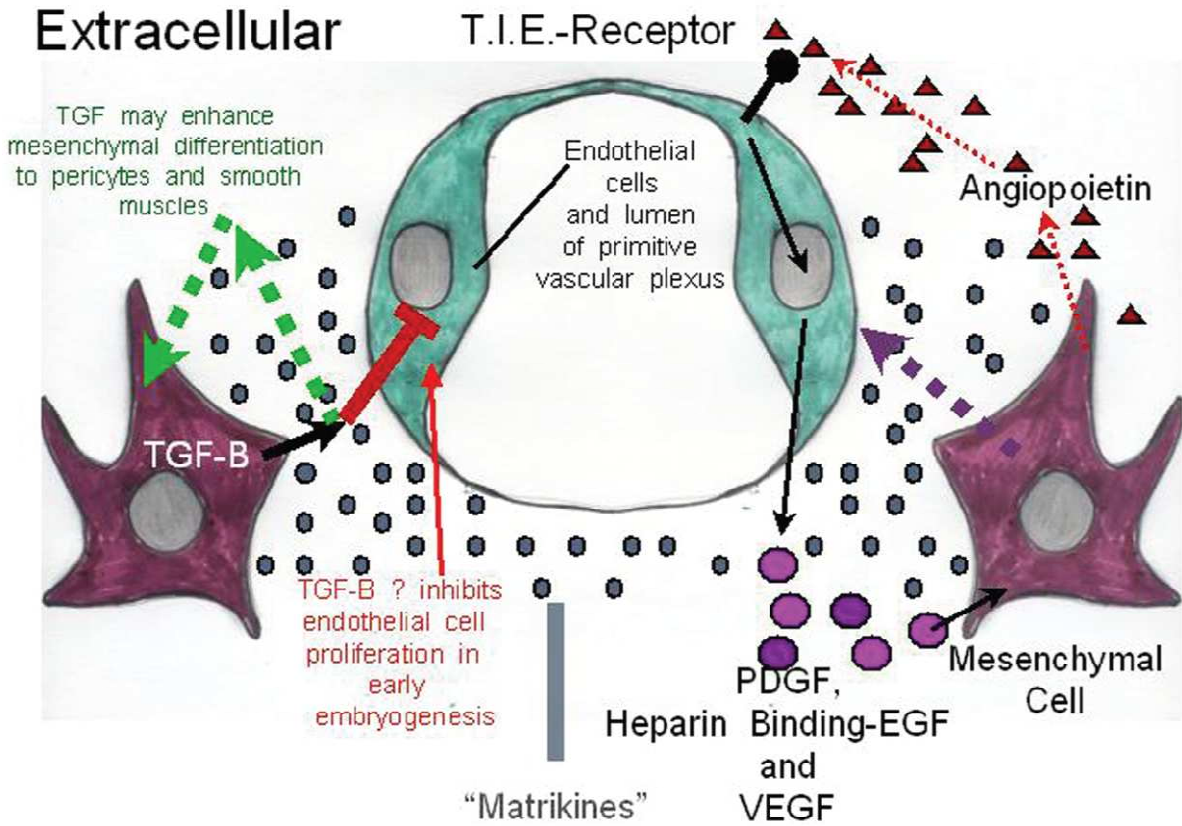
Resim 8. AVM patogenezinde muhtemel model [78]



Resim 9. TGFβ-1 reseptör kompleksi

Anjiopietinler: Anjiopietinler(ANG), anjiogenez ve vasküler stabilizasyon ile ilgili perisit ve düz kas hücre prekürsörlerinin regulasyonunu sağlamaktadırlar. ANG-1 vasküler stabilizasyonu sağlar iken, ANG-2 vasküler remodelling ve destabilize edici yönde rol almaktadır[79-81]. ANG-2 ekspresyonu matür damarlarda downregüle olmasına karşın, AVM dokusunda upregüledir[82]. ANG-1 tarafından kullanılan endotelial hücre spesifik tirozin kinaz olan TIE2, AVM'lerde upregüle otofosforilasyona sahiptir[83]. TIE2 geni mutasyonu familial venöz malformasyon sendromunda saptanmıştır[84].

AVM'lerde anjiopietin 1 proteini seviyesi %30 daha düşük, ANG-2 protein düzeyi %800 daha yüksek ve de ANG-2 m-RNA düzeyi %40 daha yüksek olarak saptanmıştır[82].



Resim 10. TIE ile bağlantılı moleküller ve yollar[13]

Enflamatuar faktörler: Yakın zamanda yapılan enflamatuar sitokin genlerinin polimorfizm çalışmaları, AVM patofizyolojisinde enflamasyonu işaret eden kanıtları ortaya koymuştur[85-88]. Bu çalışmalarda; IL-1 β geninin promotor polimorfizmi ile AVM oluşum riski[49], IL-6 geninin promotor polimorfizmi ile AVM lerde intraserebral hemoraji oluşmasının korelasyonu[52, 86], TNF- α ve APO E2 promotor polimorfizmleri ile tedavi öncesi ve sonrası hemoraji riski arasındaki ilişki[47, 48, 50] ortaya konmuştur.

Bu sonuçlar ile de görülüyor ki, enflamatuar sitokinler hem AVM patogenezinde hem de AVM hastalarında intraserebral hemoraji gelişme riskinde rol almaktadırlar[89].

AVM'lerde Yüksek Ölçekli Genom Çapı Polimorfizm Analizleri

Son yıllarda gerçekleştirilen, birçok kompleks hastalığın genetik analizinde kullanılmaya başlanılan, yüksek-ölçekli mikroçipler ile genom-çapı SNP çalışmaları (*GWAS: Genome-wide Association Studies*), AVM gelişimi ve fizyopatolojisinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına katkıda bulunabileceği gibi, radyoterapi ve embolizasyona cevap verme, kanama, rekürrens ve diğer birtakım prognostik risk tahminlerinde de kullanılabilmesi yönüyle önem taşımaktadır. Bununla birlikte, polimorfizm analizleri ile gerçek anlamlılıkta risk tahminleri yapılabilmesi, ancak büyük hasta gruplarının bir araya getirilmesi ve dolayısıyla önemli klinik merkezlerin işbirlikleri ile mümkündür. AVM dışında birçok kompleks hastalık için bu tarz konsorsiyumlar gerçekleştirilmiştir ve en önemli örneklerden biri, Günel ve arkadaşları tarafından, Avrupa ve Japonya'dan derlenen 5,891 anevrizma hastası ve 14,181 kontrol grubunda gerçekleştirilen, genom-çapı ilişkilendirme çalışmasıdır[90].

AVM'de bu çiplerin kullanıldığı tek çalışma 2007'de *Stroke* dergisinde yayınlandı. Inoue ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, 6 çift akraba olmayan ikiz hastada bağlantı (*linkage*) analizi ile yalnızca 26 hastada yüksek-ölçekli çiplerin yardımıyla risk allellerinin saptanmaya çalışıldığı ortak bir analiz gerçekleştirildi. 7 adet aday lokusun belirlendiği bağlantı analizinde, en yüksek olasılık oranı (*odds ratio*) 1.88 ile 6q25 bölgesi için bulundu ($p:0.002$). Oldukça düşük sayıdaki hastada gerçekleştirilen ikinci analizden AVM riski oluşturan 4 SNP belirlendi, ancak bu SNP'ler belirlenen 7 adet lokus içerisinde olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, AVM'lerde tek genom çapı ilişkilendirme analizinin yapıldığı bu çalışmadan herhangi bir genetik risk faktörü belirlenemedi[91].

AVM'lerde Yüksek Ölçekli Mikroarray Çalışmaları

Son yirmi yıl içerisinde gen ifadesi araştırma tekniklerinde devrim niteliğinde gelişmeler olmuştur. İleri teknolojiler kullanılarak geliştirilen mikroarray sistemlerinin, gen ekspresyon analizlerinde kullanılması ile binlerce mRNA'nın aynı anda ifade analizi yapılmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca, HapMap projesinin tamamlanmasıyla, yakın zamanda geliştirilen çipler sayesinde, kompleks yolla kalıtılan hastalıklar için tek nükleotid polimorfizmleri de yüksek ölçekli olarak araştırmak mümkün hale gelmiştir. Bu array sistemleri; özel çipler üzerinde hazırlanmış kuyucuklara yerleştirilmiş probe (bulucu) oligonükleotidler sayesinde, her bir genin kıyaslamalı olarak, ne oranda ifade edildiğini üst düzey bilgisayar analizleri ile tespit edilebilmesini mümkün kılmıştır. Bugüne kadar AVM için yapılmış üç ekspresyon mikroarray çalışması bulunmaktadır, ancak yayınlanmış herhangi bir SNP mikroarray çalışması bulunmamaktadır.

2003 yılında yayınlanan ilk çalışmada kavernoma ve AVM'ler arasında farklı eksprese olan genlerin tespiti hedeflenmiştir. 4 kavernom, 4 AVM ve 4 STA (superior temporal arter) dokusunun kullanıldığı çalışmada, 12,625 gen çalışılmıştır. AVM'lerde, kavernomalara kıyasla 48 genin daha yüksek ve 59 genin daha düşük oranda ifade edildiği gözlenmiştir[54].

Diğer bir çalışmada 6 AVM'li ve kontrol olarak kullanılan 5 normal doku (epilepsi hastalarından temporal lobektomi ile çıkarılmış edilmiş beyin dokusu) örneği üzerinde yapılan mikroarray çalışmasında taranan 12,625 genin 1,781'inin ekspresyon profilinde değişiklik tespit edilmiştir ve sonuç olarak integrin- $\alpha\beta3$ molekülünün ileriki çalışmalar için hedef seçmişlerdir[92]. Ancak, çalışmada AVM için kontrol doku olarak beyin dokusunun kullanılmış olması çok büyük bir eksiklik ve ortaya çıkan 1,781 gendeki farklılık bu problemi açıkça ortaya koymaktadır.

Sasahara ve arkadaşları, 2007 yılında yayınlanan çalışmalarında, AVM dokularının nidusları ile direnaj venlerini arasında farklı eksprese olan genleri bulmayı hedeflemişlerdir. Beş AVM dokusunun kullanıldığı ve 17,086 genin tarandığı çalışmadan edilen sonuçlar, ne yazık ki önceki yıllardaki mikroarray bulgularıyla paralel olmayıp, önceden elde edilen immunohistokimya verilerini de desteklememektedir. Çalışmada, iki grup arasında dikkate değer bir fark bulunmamış ve VEGF, anjiopietinler ve MMP ailesi üyelerinin de bulunduğu, daha önce AVM'lerde patolojik olduğu rapor edilen anjiyogenik moleküllerin ekspresyonlarında dikkate değer bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte Ephrin A1'in ekspresyon seviyesinde 2 ila 9 kat arasında artış olduğu tespit edilmiştir[93].

Sonuç olarak, bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalar, kontrol doku seçimi ve diğer deneysel parametrelerdeki problemlerden ötürü, AVM transkriptomundaki farklılıkları sağlıklı olarak ortaya koymakta yetersiz kalmışlardır.

TÜM EKZOM DİZİLEME İLE İNCELEME YÖNTEMİ

Ekson, RNA işlemlenmesi sonucu oluşan ergin RNA'da yer alan bir nükleik asit dizisidir. Bir RNA transkriptinden uçbirleştirme işlemi ile çıkartılmayıp, bir mesajcı RNA (mRNA) veya protein kodlamayan fonksiyonel bir RNA'dan (tRNA veya rRNA gibi) bulunan dizilere ekson denir, ayrıca, iki veya daha çok öncül RNA'da trans-uç birleştirme yoluyla birbirlerine bağlanan diziler de eksondur. Kullanıma göre, ekson, DNA'daki dizi ya da o dizinin RNA transkriptindeki karşılığı anlamına gelir. Genom içerisindeki ekzonların hepsine ise ekzom denir.

Ekzom dizileme(exome sequencing-targeted exome capture), birçok hastalık ile ilgili genleri ortaya çıkarma amacıyla genomun kodlanan bölgelerini(exon) seçici olarak sekanslamak için verimli bir yöntemdir[94, 95]. Çok sayıda insanın tüm genom sekanslama yöntemi teknik ile ilgili olarak yüksek maliyetli olması nedeniyle uygulanabilir değildir. Fakat, alternatif bir yaklaşım olarak genomun belirli bölgeleri, örneğin ekzom, hedeflenip, zenginleştirilerek sekanslanabilir[96].

Eksonlar, kısa fakat fonksiyonel DNA dizileridir. Genlerdeki protein translasyonu yapılan bölgelerdir. İnsan genomunda toplam olarak 180 000 ekson mevcuttur. Protein kodlayan bölgeler insan genomunun %1'ini oluşturmaktadır[96]. Tahminen hastalık oluşturan mutasyonların %85'i insan genomunun protein kodlayan bölgelerinde ortaya çıkmaktadır[97].

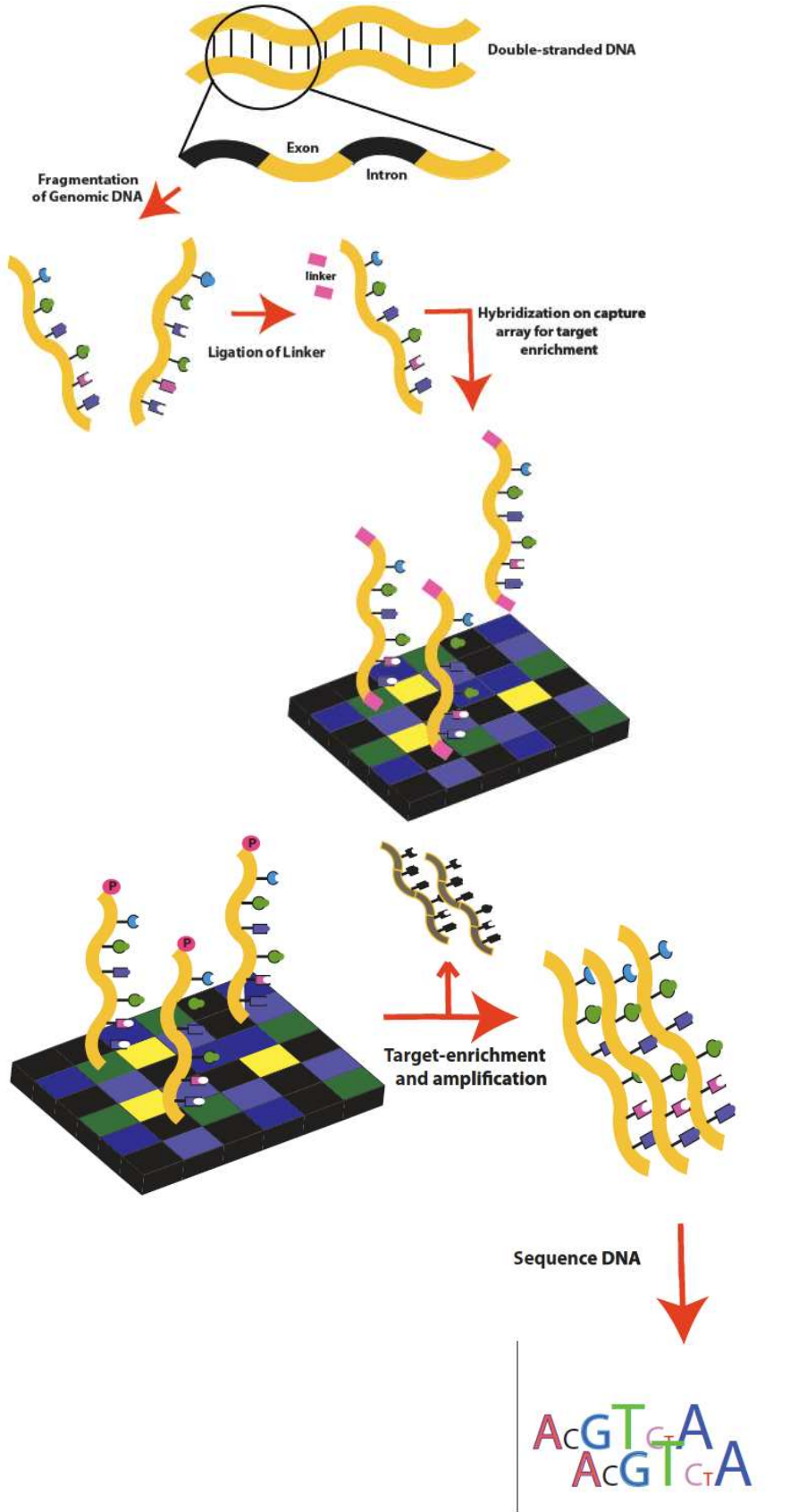
Nadir hastalıklar A.B.D.'de yaklaşık 200 000 kişi etkilemektedir. Bu hastalıkların genetiğinin ortaya çıkarılması biyolojik yolların ve terapötik hedeflerin bulunmasını sağlayacaktır. Bu hastalıkların büyük çoğunluğu protein fonksiyonunu etkileyen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ekzom sekanslama ile bu genlerdeki mutasyonları belirlemek çok az hasta sayısı ile mümkün olmaktadır[97].

Genetik varyantlar ile ilişkili hastalıkların nedenlerini belirlemede birçok teknoloji bulunmaktadır. Her tekniğin kendine özgü teknik, finansal ve kullanılan materyaller ile ilgili kısıtlamaları vardır. Ekzom sekanslama diğer teknolojilere göre pahalı bir metod olsa da, maliyetlerin düşmesiyle ve yeni veri analiz programlarıyla büyük miktarlarda bilgi elde edilmesini sağlamaktadır[98].

Ekzom sekanslama yöntemi, genlerin sadece protein fonksiyonunda etkili kodlanan bölgeleri ile ilişkili varyantları belirlemektedir. Yapısal ya da kodlanmayan bölgelerdeki varyantları ise belirleyememektedir. Bu ancak tüm genom sekanslama ile mümkün olabilmekte ise de hasta sayısı fazlalaştıkça ve de analiz çok zaman alacağından yaygın olarak kullanımı teknik olarak mümkün gözükmemektedir.

Bu yöntemde dokulardan ya da kandan elde edilen genomik DNA örneği, önceden tasarlanmış, çip tabanlı array sistemlerinde hibridizasyon yöntemi kullanılarak NimbleGen cihazında okutulur. Bu cihazda farklı genomik dizi varyasyonlarına hibridizasyon ile bağlanabilen diziler saptanırken, hibridizasyon göstermeyen diziler daha sonrasında çıkarılarak dizi analizleri yapılır. Son olarak, bağlantı göstermeyen dizilerdeki farklı nükleotit dizileri saptanır ve hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılır.

İlk olarak 2009 yılında Freeman-Sheldon Sendromu'na yol açan MYH3 geni ekzom sekanslama yöntemi ile bulunmuştur[95]. Son yıllarda yapılan ekzom dizileme çalışmaları ile de birçok hastalıkla ilgili olarak somatik mutasyonların saptanması sağlanmıştır[95, 97, 99-101].



Resim 11. Çip Tabanlı ekzom dizileme yöntemi ile mutasyon taraması

MATERYAL-METOD

Bu çalışma 3 farklı aşamadan oluşmaktadır:

Hastalardan doku ve kan örneklerinin toplanması

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü bünyesinde yapılan ameliyatlara cerrahi olarak çıkarılmış 7 hastaya ait AVM dokuları ve bu hastalara ait kan örnekleri kullanılmıştır. Dokular ameliyat sonrasında Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsünde bulunan doku bankasında sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Kan örnekleri ise 8.5ml'lik ACD tüpleri içerisine alınmış ve çalışma gününe kadar +4°C de saklanmıştır.

Örneklerden DNA izolasyonu

Doku ve kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu, Roche Mammalian DNA Isolation Kit® kitleri ile üreticinin önerilerine uygun olarak yapılmıştır (DNA Roche, Almanya). Bu yöntem ile yaklaşık 2 ml kan ya da 2g doku örneğinden 110 µg DNA elde edilmiştir. Genomik DNA'lerden çalışma stoku (25ng/µl) yapıldıktan sonra DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

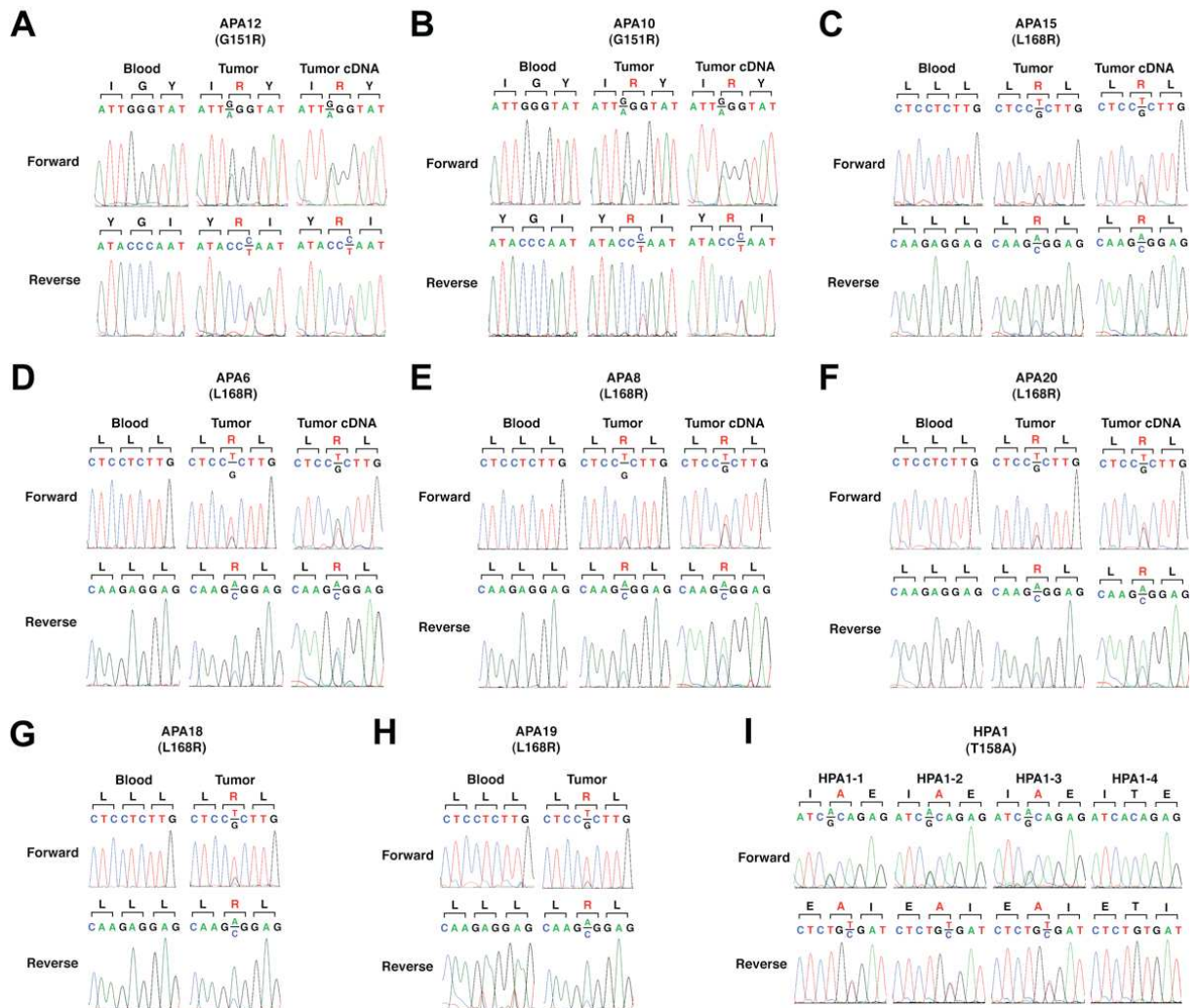
NimbleGene sistemi ile total ekzom dizileme

Genomik DNA dizileri, çip tabanlı NimbleGen 2.1 M Human Array sisteminde bulunan oligo nükleotitler ile hibridizasyon yapılabilmesi için inkübe edildi. Daha sonra hibride olan ekzon dizileri, çip üzerindeki amplifikasyon sistemi ile çoğaltılarak, dizinin dizileme sisteminde okunabilmesi için yeterli miktara ulaşması sağlandı. Daha sonra Illumina sisteminde, yaklaşık 100 baz çifti gruplar halinde okunması sağlandı. Okumalar tamamlandıktan sonra sisteme entegre olan Maq® ve BWA®

yazılımları ile, normal diziler ile hibridizasyon göstermeyen diziler arasındaki nükleotit farklılıkları karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait kan ve doku örneklerinden elde edilen DNA ların genomik sekanslamaları tamamlandı. Bu genomik sekanslara, insan genomuna(hg18) uygun şekilde Maq® ve Samtools® yazılımları kullanılarak haritalama işlemi yapıldı. Somatic mutasyon arama işlemi için hem kan hem de doku DNA larına 8 defa okuma yapıldı. Sonuçların two-tailed Fischer's exact test ile istatistiksel analiziyle $p < 10^{-4}$ olan somatik mutasyon olan genler belirlendi.



Resim 12. 9 gene ait mutasyon örnekleri

A

AA position - - - 131 - - - - - - - - - 141 - - - - - - - - - 151 - - - - - - - - - 161 - - - - - -
 Reference A V E N L S G F V S A F L F S I E T E T T I G Y G F R V I T E K C P E G I I L
 APA12 A V E N L S G F V S A F L F S I E T E T T I R Y G F R V I T E K C P E G I I L
 Reference 5' -TTGTGTTGAAAACCTCAGTGGCTTCGTGTCGCGTTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACT

*

```

TTGTGTTGAAAACCTCAGTGGCTTCGTGTCGCGTTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACT
  tgttgaaaacctcagtggttcgtgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatg
  ttgaaaacctcagtggttcgtgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggc
  gaaaacctcagtggttcgtgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggc
  AACCTCAGTGGCTTCGTGTCGCGTTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCG
  ACCTCAGTGGCTTCGTGTCGCGTTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCG
  ctccagtggttcgtgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggctccgagt
  CAGTGGCTTCGTGTCGCGTTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCA
  ggttcgtgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacaca
  TCGTGTCCGCTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAG
  CGTGTCCGCTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGCTCATCACAGAGA
  gtgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaa
  tgtccgcttccctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaa
  CCGCTTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGT
  CTCTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCA
  TTCTCTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAG
  ttctgttccattgagaccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccaga
  CCTGTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAG
  TTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGG
  CTCCATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGTTA
  CATTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACT
  TTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  tgagaccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatact
  AGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  ccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatact
  cgaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatact
  gaacaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatact
  GAACAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  AAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  ACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  caaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatact
  aaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatact
  ACCATTGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  ATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  TTGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  TGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  AGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  AGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGGATTATACT
  
```

B

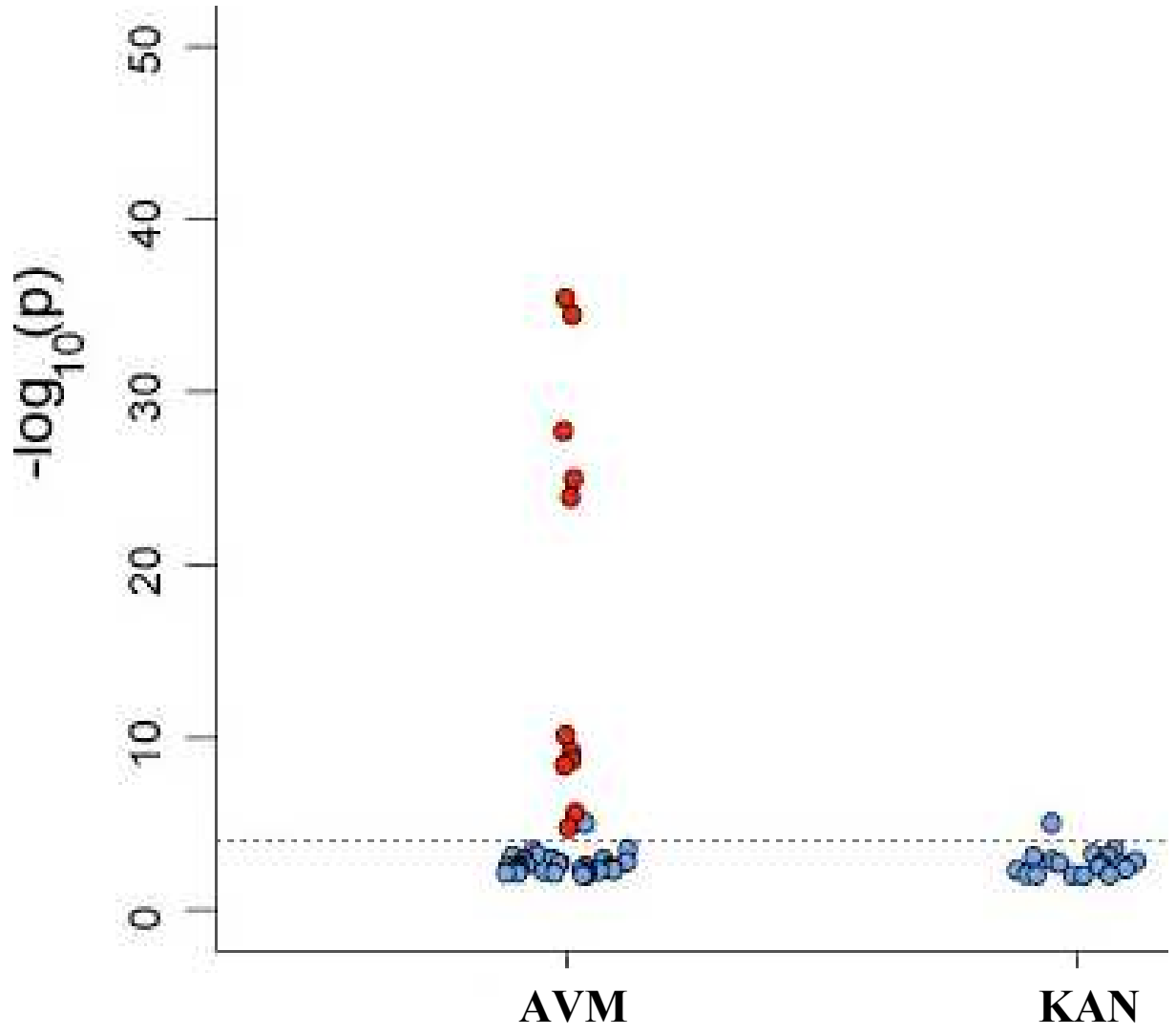
AA position - - - - - 151 - - - - - - - - - 161 - - - - - - - - - 171 - - - - - - - - - 181 - - -
 Reference E T E T T I G Y G F R V I T E K C P E G I I L L V Q A I L G S I V N A F M V
 APA15 E T E T T I G Y G F R V I T E K C P E G I I L R L V Q A I L G S I V N A F M V
 Reference 5' -TTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGT

*

```

TTGAGACCGAAACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCT
  agaccgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatactcctcttg
  accgaaacaaccattgggtatggctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatactcctcttggt
  AACCAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGG
  ACAACCATGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGC
  ACCATTGGGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCAT
  GGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGG
  GGTATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGG
  ATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTC
  tctccgattccacagaaagtgccagaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatc
  ctccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatc
  TTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGT
  ccgagtcacacagagaaagtgccagaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatc
  CGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCA
  AGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATG
  TCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCC
  ATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCT
  cagagaaagtgccagaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatcctcaatgcttcatg
  gatgtgtccagtggtgattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatcctcaatgcttcatggt
  gtccagaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatcctcaatgcttcatggt
  TCCAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  CAGAGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  agaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatcctcaatgcttcatggt
  gaggggattatactcctcttggtccagggccatcctgggtccatcctcaatgcttcatggt
  AGGGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  GGGATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  GATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  ATTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  TTATACTCTCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  tactcctcttggtccagggccatcctgggtccatcctcaatgcttcatggt
  ACTCCCTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  GCTTGGTCCAGGCCATCTCTGGGCTCCATCGTCAATGCCCTCATGGI
  
```

Resim 13. İki hastaya ait sekanslama örnekleri



Tablo 6. Somatik mutasyonların p -değeri dağılımları

Somatik mutasyon saptanan p -değeri $<10^{-4}$ olan genler;

1. **ZGPAT**: Kromozom 20q13.3 bölgesinde bulunmakta olup, 'zinc finger, CCCH-type with Gpatch domain' adlı nükleer proteini kodlamaktadır. Hücre çoğalması, survi ve migrasyonunda görev alan EGFR ekspresyonunu negatif olarak regüle eder. EGFR yolağındaki genleri repress ederek tumor supresör olarak görev almaktadır. Meme karsinogenezini suprese etmektedir[102].
2. **QTRT1**: Kromozom 19p13.3 bölgesinde bulunmakta olup queuosine'nin biosentetik prosesinde yer alan 'queuine tRNA-ribosyltransferase 1' adlı proteini kodlayarak tRNA modifikasyonunda rol oynamaktadır. Aktif queuine tRNA-ribosyltransferase oluşturmak amacıyla QTRTD1 ile interakte olur. Bu enzim, GU(N) antikodonları olan tRNA ların wobble pozisyonundaki queuine'nini guanineat'a çevirmektedir. Böylelikle hipermodifiye nucleosidequeuosine meydana gelmektedir[103].
3. **ANO7**: Kromozom 2q37.3 bölgesinde bulunmakta olup, 'anoctamin 7' adlı iyon transpotunda yer alan proteini kodlamaktadır. kalsiyum ile aktive olan klorür kanalı olarak görev yapar. Hücreler arası interaksiyonda rolü olabileceği düşünülmektedir[104].
4. **HMHA1**: Kromozom 19p13.3 bölgesinde bulunmakta olup, 'minor histocompatibility antigen HA-1' adlı proteini kodlamaktadır. Çinko ve diğer metal iyonlarına bağlanmaktadır. Ayrıca GTPase aktivator aktivitesi ile intrasellüler sinyal yollarında rol alır[105].
5. **HSPG2**: Kromozom 1p36.1 bölgesinde bulunmakta olup, 'heparan sulfate proteoglycan 2' adlı proteini kodlamaktadır. bazal mambranların integral komponentidir. Negatif elektrostatik zar yükünü devamlılığından sorumlu olup yük ve boyut selektif bariyerdir. Hücrelerin bağlanmasında substrat olarak yer alır.

Vaskülarizasyonda esansiyel rol oynar. HSPG2 genindeki defect sonucu nadir otozomal resesif hastalık olan Schwartz-Jampel sendromu ortaya çıkar[106, 107].

6. **SIGLEC1**: Kromozom 20p13 bölgesinde bulunmakta olup, 'sialic acid binding Ig-like lectin 1' adlı proteini kodlamaktadır. Hücreler arası ve hücre-matriks adezyonunda rol oynar. Enflamatuvar cevapta yer alır. Klathrin-bağlı endositozda endositik reseptör olarak görevlidir. Hematopoezde T hücrelerindeki SPN/CD43 e bağlanır. Homozigot mutasyonlarında B ve T hücrelerinde değişikliklere ve IgM seviyelerinde azalmaya neden olur[108].
7. **ADAMTSL4**: Kromozom 1q21.3 bölgesinde bulunmakta olup, 'thrombospondin repeat containing 1 isoform' adlı proteini kodlamaktadır. Apoptozda pozitif regülatör olarak rol oynamaktadır. Homozigot mutasyonlarında otozomal resesif bir hastalık olan ectopia lentis ortaya çıkmaktadır[109].
8. **CROCC**: Kromozom 1q bölgesinde bulunmakta olup, 'ciliary rootlet coiled-coil' adlı proteini kodlamaktadır. Silialı hücrelerde silier rootletin majör yapısal komponentini oluşturur. Diğer hücrelerde ise sentriollerde yer alarak mitoz bölünmede rol oynar[110].
9. **LAMA5**: Kromozom 20q13.2 bölgesinde bulunmakta olup, 'laminin alpha 5' adlı proteini kodlamaktadır. Hücrelere yüksek afiniteli reseptörler ile bağlanmaktadır. Embriyonal gelişim sırasında hücrelerin organizasyonlarını, migrasyonlarını ve bağlanmalarını diğer ekstrasellüler matriks komponentleriyle interaksiyona girerek sağlamaktadır. 3 farklı polipeptit zincirinden oluşan kompleks bir glikoproteindir. Beyinde eksprese edilmez. Homozigot mutasyonları letal olup hamileliğin geç dönemlerinde fetüsün ölümüne neden olur[111].

TARTIŞMA

Vaskülogenezde rol aldığı bilinen moleküller başta olmak üzere, birçok molekülün AVM'lerdeki ekspresyon durumunun araştırıldığı deskriptif çalışmalardan birtakım çıkarımlar yapılmış olsa da, AVM'lerin moleküler patogenezi neden-sonuç ilişkisi içerisinde açıklamak için kısıtlı bilgiye sahibiz[62, 86, 112].

Literatürde AVM gelişiminin moleküler temelleri ile ilgili hipotezler ve birimizin bu konudaki 20 yılı aşkın süredir klinik deneyimi ve 10 yılı aşkın süredir in vivo ve in vitro deneysel çalışmaları ile AVM'lerin moleküler patogenezinin anlaşılmasında azımsanmayacak yol kat edilmiş olsa da, elde edilen bulgular, bu malformasyonların oluşum ve gelişim nedenlerinin aydınlatılması konusunda henüz çok yetersizdir.

Bugüne kadar AVM'lerde genom çapı ilişkilendirme analizinin yapıldığı tek bir çalışmada herhangi bir genetik risk faktörü belirlenemedi; üç ekspresyon mikroarray çalışmasında da kontrol doku seçimi ve diğer deneysel parametrelerdeki problemlerden ötürü, AVM transkriptomundaki farklılıkları sağlıklı olarak ortaya koymakta yetersiz kalmışlardır. Tek nükleotid polimorfizmler ve kopya sayısı farklılıkları (CNV: copy number variation) gibi risk faktörlerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır, ancak bu çalışmalar az sayıdaki (<200 hasta) hasta gruplarında gerçekleştirildiği için ya yeterli istatistiksel anlamlılıkta sonuçlar elde edilememiş ya da istatistiksel anlamlılığa ulaşıldıysa da farklı hasta gruplarında bulgular doğrulanamamıştır.

Kavernomlarda ortaya konan 'second hit ya da 2-hit' mekanizması[113-115]; damarlanmada doğrudan görev alan bir genin allellerinden birinde aileden kalıtılan resesif bir mutasyonun bir probleme neden olmadan

bireyin gelişiminin tamamlanmasını takiben, sağlıklı allelde başka bir somatik mutasyonun meydana gelmesi sonucu AVM oluşabileceğini ortaya koyan bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmada ilk kez yeni nesil DNA dizileme tekniklerinden olan tüm ekzom dizileme kullanılarak, AVM hastalarından elde edilen kan örneklerinde ve aynı hastaların cerrahi olarak çıkarılmış AVM dokularında somatik mutasyon taramaları gerçekleştirilmiştir.

Ekzom sekanslama yöntemi, genlerin sadece protein fonksiyonunda etkili kodlanan bölgeleri ile ilişkili varyantları belirlemektedir. Yapısal ya da kodlanmayan bölgelerdeki varyantları ise belirleyememektedir. Bu ancak tüm genom sekanslama ile mümkün olabilmekte ise de hasta sayısı fazlalaştıkça ve de analiz çok zaman alacağından yaygın olarak kullanımı teknik olarak mümkün gözükmemektedir.

Ekzom dizileme, birçok hastalık ile ilgili genleri ortaya çıkarma amacıyla genomun kodlanan bölgelerini(ekzon) seçici olarak sekanslamak için verimli bir yöntemdir[94, 95].

Sonuçların two-tailed Fischer's exact test ile istatistiksel analiziyle $p < 10^{-4}$ olan somatik mutasyon olan 9 gen belirlendi.

Belirlenen genlerin fonksiyonel araştırmaları ve model transgenik hayvan çalışmalarından elde edilecek bulguların değerlendirilmesi ile AVM'nin moleküler patogenezinin aydınlatılması konusunda önemli yol katedileceği beklenebilir.

Çok güncel bir yöntem olan proteomiks analizler ile, AVM'lerdeki protein düzeyindeki farklılıkların DNA ve RNA düzeyinden farklı olarak global çapta saptanması, AVM'lerin moleküler patolojisinin anlaşılması;

DNA'daki bir mutasyon ya da RNA seviyesindeki bir farklılığın AVM patolojisini nasıl etkilediği, patolojiden sorumlu moleküllerin daha etkin ayrıştırılabilmesi AVM dokusu üzerinde yapılacak çalışmalar ile mümkün olabilir.

SONUÇ

Bu çalışmada, yeni nesil DNA dizileme tekniklerinden olan tüm ekzom dizileme kullanılarak, AVM hastalarından elde edilen kan örneklerinde ve aynı hastaların cerrahi olarak çıkarılmış AVM dokularında somatik mutasyon taramaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçların two-tailed Fischer's exact test ile istatistiksel analiziyle $p < 10^{-4}$ olan somatik mutasyon olan genler belirlenerek sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. Sonuçlar;

1. Yeni nesil DNA dizileme tekniklerinden olan tüm ekzom dizileme AVM hastalığında ilk kez kullanılmıştır.

2. Somatik mutasyon olan genler,

-ZGPAT

- QTRT1

- ANO7

- HMHA1

- HSPG2

- SIGLEC1

- ADAMTSL4

- CROCC ve LAMA5'dir.

3. Bu genler, literatürde daha önce AVM'ler ile ilişkilendirilmemiştir.

4. Özellikle ZGPAT geni EGFR antagonisti olarak bilinmekte ve tumor suppressor gen olarak görev yapmaktadır.

KAYNAKÇA

1. McCormick, W.F., *The pathology of vascular ("arteriovenous") malformations*. J Neurosurg, 1966. **24**(4): p. 807-16.
2. WF, M., *Pathology of vascular malformations of the brain*, in *Pathology of vascular malformations of the brain*, S.B. Wilson CB, Editor 1984, Williams and Wilkins: Baltimore. p. 44-63.
3. Fleetwood, I.G. and G.K. Steinberg, *Arteriovenous malformations*. Lancet, 2002. **359**(9309): p. 863-73.
4. Choi, J.H. and J.P. Mohr, *Brain arteriovenous malformations in adults*. Lancet Neurol, 2005. **4**(5): p. 299-308.
5. Gross, C.R., et al., *Stroke in south Alabama: incidence and diagnostic features--a population based study*. Stroke, 1984. **15**(2): p. 249-55.
6. Toffol, G.J., J. Biller, and H.P. Adams, Jr., *Nontraumatic intracerebral hemorrhage in young adults*. Arch Neurol, 1987. **44**(5): p. 483-5.
7. Stein, B.M. and S.M. Wolpert, *Arteriovenous malformations of the brain. II: Current concepts and treatment*. Arch Neurol, 1980. **37**(2): p. 69-75.
8. Mullan, S., et al., *Embryological basis of some aspects of cerebral vascular fistulas and malformations*. J Neurosurg, 1996. **85**(1): p. 1-8.
9. Kader, A., et al., *Recurrent cerebral arteriovenous malformations after negative postoperative angiograms*. J Neurosurg, 1996. **85**(1): p. 14-8.
10. Nussbaum, E.S., et al., *The pathogenesis of arteriovenous malformations: insights provided by a case of multiple arteriovenous malformations developing in relation to a*

- developmental venous anomaly*. Neurosurgery, 1998. **43**(2): p. 347-51; discussion 351-2.
11. Yokoyama, K., et al., *Familial occurrence of arteriovenous malformation of the brain*. J Neurosurg, 1991. **74**(4): p. 585-9.
 12. Brilli, R.J., A. Sacchetti, and S. Neff, *Familial arteriovenous malformations in children*. Pediatr Emerg Care, 1995. **11**(6): p. 376-8.
 13. Moftakhar, P., et al., *Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology*. Neurosurg Focus, 2009. **26**(5): p. E10.
 14. Maraire, J.N. and I.A. Awad, *Intracranial cavernous malformations: lesion behavior and management strategies*. Neurosurgery, 1995. **37**(4): p. 591-605.
 15. Awad IA , B.D. *Cavernous malformations*. in AANS. 1993. Park Ridge.
 16. MG, Y., *AVM of the brain, history, embryology, pathological considerations, hemodynamics, diagnostic studies, microsurgical anatomy*. , in *Microneurosurgery*1987, Georg Thieme Verlag Stuttgart. p. 14-20.
 17. Furlan, A.J., J.P. Whisnant, and L.R. Elveback, *The decreasing incidence of primary intracerebral hemorrhage: a population study*. Ann Neurol, 1979. **5**(4): p. 367-73.
 18. Sarwar, M. and W.F. McCormick, *Intracerebral venous angioma. Case report and review*. Arch Neurol, 1978. **35**(5): p. 323-5.
 19. Berman, M.F., et al., *The epidemiology of brain arteriovenous malformations*. Neurosurgery, 2000. **47**(2): p. 389-96; discussion 397.
 20. MS, G., *Handbook of neurosurgery*. 7th ed2010, Lakeland, Florida: THIEME.

21. Batjer, H. and D. Samson, *Arteriovenous malformations of the posterior fossa. Clinical presentation, diagnostic evaluation, and surgical treatment.* J Neurosurg, 1986. **64**(6): p. 849-56.
22. Reddy, K., M. West, and B. McClarty, *Multiple intracerebral arteriovenous malformations. A case report and literature review.* Surg Neurol, 1987. **27**(5): p. 495-9.
23. Willinsky, R.A., et al., *Multiple cerebral arteriovenous malformations (AVMs). Review of our experience from 203 patients with cerebral vascular lesions.* Neuroradiology, 1990. **32**(3): p. 207-10.
24. Svien, H.J., I. Olive, and P. Angulo-Rivero, *The fate of patients who have cerebral arteriovenous anomalies without definitive surgical treatments.* J Neurosurg, 1956. **13**(4): p. 293-9.
25. Perret, G. and H. Nishioka, *Report on the cooperative study of intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. Section VI. Arteriovenous malformations. An analysis of 545 cases of cranio-cerebral arteriovenous malformations and fistulae reported to the cooperative study.* J Neurosurg, 1966. **25**(4): p. 467-90.
26. Schatz, S. and H. Botterell, *The natural history of arteriovenous malformations.* Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 1966. **41**: p. 180-7.
27. Forster, D.M., L. Steiner, and S. Hakanson, *Arteriovenous malformations of the brain. A long-term clinical study.* J Neurosurg, 1972. **37**(5): p. 562-70.
28. Morello, G. and G.P. Borghi, *Cerebral angiomas. A report of 154 personal cases and a comparison between the results of surgical excision and conservative management.* Acta Neurochir (Wien), 1973. **28**(3): p. 135-55.

29. Michelsen, W.J., *Natural history and pathophysiology of arteriovenous malformations*. Clin Neurosurg, 1979. **26**: p. 307-13.
30. Drake, C.G., *Cerebral arteriovenous malformations: considerations for and experience with surgical treatment in 166 cases*. Clin Neurosurg, 1979. **26**: p. 145-208.
31. Pellettieri, L., et al., *Surgical versus conservative treatment of intracranial arteriovenous malformations: a study in surgical decision-making*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1979. **29**: p. 1-86.
32. Luessenhop, A.J. and L. Rosa, *Cerebral arteriovenous malformations. Indications for and results of surgery, and the role of intravascular techniques*. J Neurosurg, 1984. **60**(1): p. 14-22.
33. Wilkins, R.H., *Natural history of intracranial vascular malformations: a review*. Neurosurgery, 1985. **16**(3): p. 421-30.
34. Heros, R.C. and Y.K. Tu, *Unruptured arteriovenous malformations: a dilemma in surgical decision making*. Clin Neurosurg, 1986. **33**: p. 187-236.
35. Heros, R.C. and Y.K. Tu, *Is surgical therapy needed for unruptured arteriovenous malformations?* Neurology, 1987. **37**(2): p. 279-86.
36. Ondra, S.L., et al., *The natural history of symptomatic arteriovenous malformations of the brain: a 24-year follow-up assessment*. J Neurosurg, 1990. **73**(3): p. 387-91.
37. Hernesniemi, J.A., et al., *Natural history of brain arteriovenous malformations: a long-term follow-up study of risk of hemorrhage in 238 patients*. Neurosurgery, 2008. **63**(5): p. 823-9; discussion 829-31.
38. Cockroft, K.M., *Unruptured brain arteriovenous malformations should be treated conservatively: no*. Stroke, 2007. **38**(12): p. 3310-1.

39. Mathiesen, T., *Arguments against the proposed randomised trial (ARUBA)*. *Neuroradiology*, 2008. **50**(6): p. 469-71.
40. Marks, M.P., et al., *Hemorrhage in intracerebral arteriovenous malformations: angiographic determinants*. *Radiology*, 1990. **176**(3): p. 807-13.
41. Spetzler, R.F. and N.A. Martin, *A proposed grading system for arteriovenous malformations*. *J Neurosurg*, 1986. **65**(4): p. 476-83.
42. Berry, R.G., B.J. Alpers, and J.C. White, *The site, structure and frequency of intracranial aneurysms, angiomas and arteriovenous abnormalities*. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 1966. **41**: p. 40-72.
43. Russell DS, R.L., *Pathology of Tumors of the Nervous System*. IVth ed1977, Baltimore: Williams & Wilkins.
44. Jellinger, K., *Vascular malformations of the central nervous system: a morphological overview*. *Neurosurg Rev*, 1986. **9**(3): p. 177-216.
45. Batjer HH, C.L., Friberg L, Greenlee RGJr, Kopitnik TAJr, Young WL, *Pathology of intracranial aneurysms and vascular malformations.*, in *Cerebrovascular disease*, H.M. Vale F, Editor 1997, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p. 65-77.
46. Burger P, S.B., Vogel FS, *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. IIIrd ed1991, New York: Churchill Livingstone.
47. Achrol, A.S., et al., *Association of tumor necrosis factor-alpha-238G>A and apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment*. *Neurosurgery*, 2007. **61**(4): p. 731-9; discussion 740.
48. Achrol, A.S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-238G>A promoter polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage*

- in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations.* Stroke, 2006. **37**(1): p. 231-4.
49. Kim, H., et al., *Common variants in interleukin-1-Beta gene are associated with intracranial hemorrhage and susceptibility to brain arteriovenous malformation.* Cerebrovasc Dis, 2009. **27**(2): p. 176-82.
 50. Pawlikowska, L., et al., *Apolipoprotein E epsilon 2 is associated with new hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations.* Neurosurgery, 2006. **58**(5): p. 838-43; discussion 838-43.
 51. Pawlikowska, L., et al., *Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes ALK1 and ENG are associated with sporadic brain arteriovenous malformations.* Stroke, 2005. **36**(10): p. 2278-80.
 52. Pawlikowska, L., et al., *Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations.* Stroke, 2004. **35**(10): p. 2294-300.
 53. Lim, M., S. Cheshier, and G.K. Steinberg, *New vessel formation in the central nervous system during tumor growth, vascular malformations, and Moyamoya.* Curr Neurovasc Res, 2006. **3**(3): p. 237-45.
 54. Shenkar, R., et al., *Differential gene expression in human cerebrovascular malformations.* Neurosurgery, 2003. **52**(2): p. 465-77; discussion 477-8.
 55. Kearney, J.B., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division.* Blood, 2002. **99**(7): p. 2397-407.

56. Mikkola, H.K. and S.H. Orkin, *The search for the hemangioblast*. J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(1): p. 9-17.
57. Koizumi, T., et al., *Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in and around intracranial arteriovenous malformations*. Neurosurgery, 2002. **50**(1): p. 117-24; discussion 124-6.
58. Breier, G., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation*. Development, 1992. **114**(2): p. 521-32.
59. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
60. Plate, K.H., et al., *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 845-8.
61. Sonstein, W.J., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in pediatric and adult cerebral arteriovenous malformations: an immunocytochemical study*. J Neurosurg, 1996. **85**(5): p. 838-45.
62. Kilic, T., et al., *Expression of structural proteins and angiogenic factors in cerebrovascular anomalies*. Neurosurgery, 2000. **46**(5): p. 1179-91; discussion 1191-2.
63. Rothbart, D., et al., *Expression of angiogenic factors and structural proteins in central nervous system vascular malformations*. Neurosurgery, 1996. **38**(5): p. 915-24; discussion 924-5.
64. Sure, U., et al., *Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations*. J Neurosurg, 2001. **94**(6): p. 972-7.

65. Akakin, A., et al., *Endovascular treatment increases but gamma knife radiosurgery decreases angiogenic activity of arteriovenous malformations: an in vivo experimental study using a rat cornea model*. Neurosurgery, 2010. **66**(1): p. 121-9; discussion 129-30.
66. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
67. Berg, J.N., et al., *Clinical heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: are pulmonary arteriovenous malformations more common in families linked to endoglin?* J Med Genet, 1996. **33**(3): p. 256-7.
68. Cymerman, U., et al., *Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin*. Pediatr Res, 2000. **47**(1): p. 24-35.
69. Lebrin, F., et al., *Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4018-28.
70. Wang, Q.K., *Update on the molecular genetics of vascular anomalies*. Lymphat Res Biol, 2005. **3**(4): p. 226-33.
71. Gallione, C.J., et al., *SMAD4 mutations found in unselected HHT patients*. J Med Genet, 2006. **43**(10): p. 793-7.
72. ten Dijke, P., M.J. Goumans, and E. Pardali, *Endoglin in angiogenesis and vascular diseases*. Angiogenesis, 2008. **11**(1): p. 79-89.
73. Bourdeau, A., D.J. Dumont, and M. Letarte, *A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1343-51.
74. Torsney, E., et al., *Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1653-7.

75. Srinivasan, S., et al., *A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(5): p. 473-82.
76. Satomi, J., et al., *Cerebral vascular abnormalities in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Stroke, 2003. **34**(3): p. 783-9.
77. Park, S.O., et al., *ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2*. Blood, 2008. **111**(2): p. 633-42.
78. Leblanc, G.G., et al., *Biology of vascular malformations of the brain*. Stroke, 2009. **40**(12): p. e694-702.
79. Jones, N., et al., *Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 257-67.
80. Satchell, S.C., et al., *Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(2): p. 544-50.
81. Tanaka, S., et al., *Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 341-5.
82. Hashimoto, T., et al., *Abnormal balance in the angiopoietin-tie2 system in human brain arteriovenous malformations*. Circ Res, 2001. **89**(2): p. 111-3.
83. Beck, L., Jr. and P.A. D'Amore, *Vascular development: cellular and molecular regulation*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 365-73.
84. Vikkula, M., et al., *Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1181-90.

85. Chen, Y., et al., *MMP-9 expression is associated with leukocytic but not endothelial markers in brain arteriovenous malformations*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 3121-8.
86. Chen, Y., et al., *Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(1): p. 72-80.
87. Chen, Y., et al., *Evidence of inflammatory cell involvement in brain arteriovenous malformations*. *Neurosurgery*, 2008. **62**(6): p. 1340-9; discussion 1349-50.
88. Nuki, Y., et al., *Roles of macrophages in flow-induced outward vascular remodeling*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009. **29**(3): p. 495-503.
89. Achrol, A.S., et al., *Pathogenesis and radiobiology of brain arteriovenous malformations: implications for risk stratification in natural history and posttreatment course*. *Neurosurg Focus*, 2009. **26**(5): p. E9.
90. Yasuno, K., et al., *Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(5): p. 420-5.
91. Inoue, S., et al., *Combination of linkage and association studies for brain arteriovenous malformation*. *Stroke*, 2007. **38**(4): p. 1368-70.
92. Hashimoto, T., et al., *Gene microarray analysis of human brain arteriovenous malformations*. *Neurosurgery*, 2004. **54**(2): p. 410-23; discussion 423-5.
93. Sasahara, A., et al., *Increased expression of ephrin A1 in brain arteriovenous malformation: DNA microarray analysis*. *Neurosurg Rev*, 2007. **30**(4): p. 299-305; discussion 305.
94. Bashardes, S., et al., *Direct genomic selection*. *Nat Methods*, 2005. **2**(1): p. 63-9.

95. Ng, S.B., et al., *Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder*. Nat Genet, 2010. **42**(1): p. 30-5.
96. Ng, S.B., et al., *Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 272-6.
97. Choi, M., et al., *Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): p. 19096-101.
98. Kahvejian, A., J. Quackenbush, and J.F. Thompson, *What would you do if you could sequence everything?* Nat Biotechnol, 2008. **26**(10): p. 1125-33.
99. Bilguvar, K., et al., *Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations*. Nature, 2010. **467**(7312): p. 207-10.
100. Bakircioglu, M., et al., *The essential role of centrosomal NDE1 in human cerebral cortex neurogenesis*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(5): p. 523-35.
101. Barak, T., et al., *Recessive LAMC3 mutations cause malformations of occipital cortical development*. Nat Genet, 2011. **43**(6): p. 590-4.
102. Feng, T. and X. Zhu, *Genome-wide searching of rare genetic variants in WTCCC data*. Hum Genet, 2010. **128**(3): p. 269-80.
103. Chen, Y.C., et al., *Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: confirmation of the heterodimeric subunit structure*. RNA, 2010. **16**(5): p. 958-68.
104. Milenkovic, V.M., et al., *Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 319.
105. Hombrink, P., et al., *High-throughput identification of potential minor histocompatibility antigens by MHC tetramer-based*

- screening: feasibility and limitations*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22523.
106. Rieubland, C., et al., *Phenotypic and molecular characterization of a novel case of dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type*. Eur J Med Genet, 2010. **53**(5): p. 294-8.
 107. Stum, M., et al., *Spectrum of HSPG2 (Perlecan) mutations in patients with Schwartz-Jampel syndrome*. Hum Mutat, 2006. **27**(11): p. 1082-91.
 108. Delputte, P.L., et al., *Porcine sialoadhesin (CD169/Siglec-1) is an endocytic receptor that allows targeted delivery of toxins and antigens to macrophages*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16827.
 109. Le Goff, C. and V. Cormier-Daire, *The ADAMTS(L) family and human genetic disorders*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(R2): p. R163-7.
 110. Yang, J., et al., *Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet*. J Cell Biol, 2002. **159**(3): p. 431-40.
 111. De Luca, M., et al., *Genetic variation in a member of the laminin gene family affects variation in body composition in Drosophila and humans*. BMC Genet, 2008. **9**: p. 52.
 112. Robinson, J.R., Jr., et al., *Expression of basement membrane and endothelial cell adhesion molecules in vascular malformations of the brain: preliminary observations and working hypothesis*. Neurol Res, 1995. **17**(1): p. 49-58.
 113. Gault, J., et al., *Biallelic somatic and germ line CCM1 truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion*. Stroke, 2005. **36**(4): p. 872-4.

114. Gault, J., et al., *Cerebral cavernous malformations: somatic mutations in vascular endothelial cells*. *Neurosurgery*, 2009. **65**(1): p. 138-44; discussion 144-5.
115. Pagenstecher, A., et al., *A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 in affected endothelial cells*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(5): p. 911-8.