

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KOLESTEATOMA ETİYOPATOGENEZİNDE TÜMÖR SUPRESÖR GENLERİN
VE ONKOGENLERİN ETKİSİNİN YENİ NESİL DİZİLEME VARYANT
ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DR. LEVENT ŞİMŞEK

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF.DR. MAHMUT SELMAN YILDIRIM

KONYA, 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde sahip oldukları bilgi, tecrübe ve vizyonla yoluma ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM ve Prof. Dr. Ayşe Gül ZAMANI'ye;

Tezime verdiği katkılarından dolayı Prof. Dr. Çağatay Han ÜLKÜ'ye;

Eğitimim boyunca özveri ve anlayışla birlikte olduğum tüm çalışma arkadaşlarıma;

Yaşamım boyunca varlıklarıyla gurur duyduğum canım annem, babam, ve abime; ve hayat yoldaşım, sevgili eşim Feyza Nur ŞİMŞEK'e;

Teşekkür ederim.

Mart, 2022

Levent ŞİMŞEK

Bu araştırma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 201518025

ÖZET

KOLESTEATOMA ETİYOPATOGENEZİNDE TÜMÖR SUPRESÖR GENLERİN VE ONKOGENLERİN ETKİSİNİN YENİ NESİL DİZİLEME VARYANT ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI

DR. LEVENT ŞİMŞEK, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2022

Amaç: Kolesteatoma, timpanik kavite ve temporal kemiğin etkilendiği yüksek mortalite ve morbiditelere yol açabilen proliferatif bir hastalıktır. Şimdiye kadar yapılmış birçok araştırma ve ortaya atılmış çeşitli teorilere rağmen kolesteatoma etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. İnvazyon, migrasyon, kontrolsüz proliferasyon, ve farklılaşma bozukluğu gibi özellikler hem kolesteatomada hem de kanser dokusunda gözlenmektedir. Bu bağlamda, kolesteatoma ve kanserin etiyopatogenezi açısından taşıdığı ortaklıkları araştırmak önem kazanmaktadır. Bu projede; kanser patogenezi içinde rol oynayan 60 farklı gen, kolesteatoma dokusu ve normal dokuda karşılaştırmalı olarak analiz edilerek, kolesteatoma patogenezi içinde kanser ilişkili genlerin etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Kulak Burun Boğaz kliniğinde kolesteatoma tanısı almış ve operasyon endikasyonu konulmuş yetişkin hastalardan, kolesteatoma rezeksiyonu esnasında rutin olarak çıkarılan kolesteatoma dokusu ve normal epitel dokuya karşılaştırmalı olarak ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, DLC1, EGFR, ERBB2, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FTSJ3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KCNB2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MYC, MYCN, NOTCH1, NRAS, NRXN1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RBAK, RET, ROS1, SMAD4, SMARCB1, SMO, SMURF1, SRC, SSFA2, STK11, TP53, VHL, ve ZNF594 genlerine yönelik yeni nesil dizileme varyant analizi yapıldı.

Bulgular: İncelenen genlerde tespit edilen varyantlar, biyoinformatik algoritmalar eşliğinde analiz edildi ve her bir varyant için sınıflandırma yapıldı. Klinik anlamı olabilecek somatik JAK3 c.2164G>A (p.Val722Ile), TP53 c.284delC (p.Ser95PhefsTer28), ve KRAS c.377A>T (p.Asp126Val) değişimleri, kolesteatoma dokusunda gözlenirken normal dokuda saptanmadı. Ek olarak, daha önce kolesteatoma ile ilişkilendirilmemiş, klinik önemi olabilecek 12 farklı germline varyant tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda, kanser ilişkili genlerdeki değişimlerin kolesteatomadaki varlığı tespit edilmiş ve bu değişimler olası klinik uygulamalar açısından tartişılmıştır. Elde edilen veriler, literatüre sağlayacağı katkının yanında bu alanda gelecekte planlanacak araştırmalar için yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Kolesteatoma, neoplazi, JAK3, TP53, KRAS

N.E.. BAP Proje No: 201518025



ABSTRACT

EVALUATION OF THE ROLES OF TUMOR SUPPRESSOR GENES AND ONCOGENES IN CHOLESTEATOMA ETIOPATHOGENESIS BY NEXT GENERATION VARIANT ANALYSIS

LEVENT ŞİMŞEK, MD, DISSERTATION, KONYA, 2022

Background/Aim: Cholesteatoma is a proliferative disease that affects the tympanic cavity and temporal bone, which can lead to high mortality and morbidity. Despite many studies and various theories, the etiopathogenesis of cholesteatoma has not been fully elucidated. Features such as invasion, migration, uncontrolled proliferation, and lack of differentiation are observed in both cholesteatoma and cancer tissue. In this context, it is important to investigate the intersection between cholesteatoma and cancer in terms of etiopathogenesis. In this project; 60 different genes that play a role in the pathogenesis of cancer were analyzed comparatively in cholesteatoma tissue and normal tissue in order to evaluate the effect of cancer-related genes in the pathogenesis of cholesteatoma.

Methods: Cholesteatoma tissue and normal epithelial tissue, which were routinely removed during the cholesteatoma resection from adult patients diagnosed with cholesteatoma in the otorhinolaryngology clinic and indicated for operation, were comparatively analyzed for ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, DLC1, EGFR, ERBB2, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FTSJ3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KCNB2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MYC, MYCN, NOTCH1, NRAS, NRXN1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RBAK, RET, ROS1, SMAD4, SMARCB1, SMO, SMURF1, SRC, SSFA2, STK11, TP53, VHL, and ZNF594 genes using next generation sequencing variant analysis.

Results: The variants detected in the examined genes were analyzed with bioinformatics algorithms and classification was made for each variant. Somatic JAK3 c.2164G>A (p.Val722Ile), TP53 c.284delC (p.Ser95PhefsTer28), and KRAS c.377A>T (p.Asp126Val) changes that may have clinical significance were observed in cholesteatoma tissue but not in normal tissue. In addition, 12 different germline variants not previously associated with cholesteatoma, which may have clinical significance, were identified.

Conclusion: In our study, the presence of changes in cancer-related genes in cholesteatoma was determined and these changes were discussed in terms of possible clinical applications. The data obtained not only contribute to the literature, but also might be a guide for future research in this field.

Keywords: Cholesteatoma, neoplasia, JAK3, TP53, KRAS



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
TABLOLAR	xi
ŞEKİLLER.....	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kulağın Embriyolojisi ve Anatomisi.....	3
2.1.1. Embriyoloji	3
2.1.2. Anatomi	9
2.2. Kolesteatoma	17
2.2.1 Tanım	17
2.2.2. Tarihçe	17
2.2.3. Epidemiyoloji.....	18
2.2.4. Sınıflama.....	18
2.2.5. Tanı	19
2.2.6. Komplikasyonlar.....	19
2.2.7. Tedavi	19
2.2.8. Ailesel Kolesteatoma	20
2.2.9. Etiyopatogenez.....	20
2.2.10. Kolesteatoma Oluşumunda Etkili Genetik Mekanizmalar	23
2.3. Kolesteatoma ve Kanseri İlişkisi	25
2.4. Kanseri Karakteristik Özellikleri.....	26
2.4.1. Proliferatif Sinyalin Devamlılığı	26
2.4.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış.....	26

2.4.3. Hücre Ölümüne Karşı Direnç	27
2.4.4. Replikatif Ölümsüzlük	27
2.4.5. Anjiogenezin İndüklenmesi	28
2.4.6. İnvazyon ve Metastaz	28
2.4.7. Enerji Metabolizmasının Yeniden Programlanması	28
2.4.8. İmmün Yıkımdan Kaçış	28
2.4.9. Genomik İnstabilite	29
2.4.10. İnflamasyon	30
2.5. Araştırmada Yer Alan Neoplazi İlişkili Genler	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Araştırmanın Tipi	39
3.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı	39
3.3. Araştırma Evreni ve Yeri	39
3.4. Örneklem Seçme Kriterleri	39
3.5. Araştırma Öncesi Bilgilendirme	40
3.6. Araştırmanın İzni ve Etik Durum	40
3.7. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	40
3.7.1. Kullanılan Cihazlar:	40
3.7.2. Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler:	41
3.8. Doku Örneklerinin Alınması ve Saklanması	42
3.9. DNA İzolasyonu	43
3.10. Yeni Nesil Dizileme	44
3.10.1 DNA Fragmentasyonu	44
3.10.2. Saflaştırma	44
3.10.3. Uç tamiri ve A-tailing	44
3.10.4. Adaptör Ligasyonu	45
3.10.5. Saflaştırma	45

3.10.6. Amplifikasyon	46
3.10.7. Saflaştırma	46
3.10.8. DNA Saflık Kontrolü.....	47
3.10.9. Hibridizasyon ve Yıkama	47
3.10.10. Streptavidin Boncuk Solüsyonunun Hazırlanması	47
3.10.11. Target Captured Kütüphanenin Seçilmesi	48
3.10.12. Captured Kütüphanenin Amplifikasyonu	48
3.10.13. Saflaştırma	49
3.10.14. DNA Saflık Kontrolü.....	49
3.10.15. Kütüphanenin Dizilenmesi	49
3.11. Veri Analizi	50
3.12. Varyant Sınıflandırma	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Demografik Özellikler.....	51
4.2. Tespit Edilen Dizi Analizi Varyantları.....	51
4.2.1. Somatik Varyantlar	52
4.2.2. Germline Varyantlar	53
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
6.1. SONUÇLAR	71
6.2. ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	73

TABLÖLAR

Tablo 3. 1: Hasta grubu özellikleri.....	39
Tablo 3. 2: DNA izolasyon kiti içeriği.....	41
Tablo 3. 3: Yeni nesil dizileme kiti içeriği.....	42
Tablo 3. 4: Uç tamiri ve A-tailing PZR protokolü.....	45
Tablo 3. 5: PZR protokolü	46
Tablo 3. 6: Captured kütüphane PZR protokolü	48
Tablo 4. 1: Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve kolesteatoma yerleşim durumu.....	51
Tablo 4. 2: Tespit Edilen Somatik Varyantlar	53
Tablo 4. 3: Tespit Edilen Germline Varyantlar.....	55

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1: Dış kulak yolu, orta kulak ve iç kulak.	3
Şekil 2. 2: Farengeal sistem.	4
Şekil 2. 3: İç kulağın erken dönem gelişimi.....	5
Şekil 2. 4: A- E, otik vezikülden membranöz labirentin oluşumunun ardışık aşamalarının lateralden görünümü.....	6
Şekil 2. 5: Otik vezikül, orta ve dış kulağın gelişimi.	7
Şekil 2. 6: A, 1., 2. ve 3. farengeal arklardan gelişen kemikler.	7
Şekil 2. 7: A-B, 6 haftalık embriyonun lateralden görünümü.....	9
Şekil 2. 8: A-B, temporal kemiğin lateral ve medial görünümü	10
Şekil 2. 9: Sol kulağın anteriordan görünümü.	11
Şekil 2. 10: Dış kulak: aurikula ve dış kulak yolunun lateralden görünümü.	12
Şekil 2. 11: Sağ kulak zarının otoskopik görünümü	12
Şekil 2. 12: Orta kulak boşluğunun anteriordan görünümü	13
Şekil 2. 13: Orta kulak kemikçikleri.	15
Şekil 2. 14: Sol kemik labirentin lateralden görünümü.	17
Şekil 2. 15: EAONO/JOS sınıflaması	19
Şekil 2. 16: Kolesteatoma etiyopatogenezinde öne çıkan dört teori.	21
Şekil 2. 17: Kanserin karakteristik özellikleri ve bunlara yönelik geliştirilen tedaviler.....	27
Şekil 2. 18: Hücre içi ve hücreler arası yolakların birbirleriyle etkileşimi.	31
Şekil 4. 1: Tespit edilen dizi analizi varyantlarının dağılımı	52
Şekil 4. 2: Somatik varyantların gen bazında dağılımı	53
Şekil 4. 3: Germline varyant sınıflarının gen bazında dağılımı	56

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACMG	: American College of Medical Genetics and Genomics-Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
BAM	: Binary Alignment Map
bç	: Baz çifti
BMP1	: Bone Morphogenetic Protein 1-Kemik Morfogenetik Protein 1
c.	: coding-kodlayan
Ca	: Kalsiyum
CD8	: Cluster of Differentiation 8-Farklılaşma Kümesi 8
COSMIC	: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CSF1	: Colony Stimulating Factor 1-Koloni Stimulan Faktör 1
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: çift zincirli Deoksiribonükleik Asit
EAONO	: European Academy of Otology & NeuroOtology-Avrupa Otoloji ve Nörootoloji Akademisi
EGF	: Epidermal Growth Factor- Epidermal Büyüme Faktörü
ER/A-Tailing	: End Repair/A Tailing-Uç Tamiri/A Tailing
ERK	: Extracellular Signal-Regulated Kinase
FAP	: Familial Adenomatöz Polipozis
FATHMM	: Functional Analysis through Hidden Markov Models
FGF	: Fibroblast Growth Factor-Fibroblast Büyüme Faktörü
FGF-2	: Fibroblast Growth Factor-Fibroblast Büyüme Faktörü 2

FGF-3	: Fibroblast Growth Factor-Fibroblast Büyüme Faktörü 3
FGF-10	: Fibroblast Growth Factor-Fibroblast Büyüme Faktörü 10
FISH	: Floresan İn-situ Hibridizasyon
GIST	: Gastrointestinal Stromal Tümör
GME Variome	: Greater Middle East Variome
gnomAD	: The Genome Aggregation Database
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
HGVS	: Human Genome Variation Society-İnsan Genom Varyasyon
Cemiyeti	
HIF1a	: Hypoxia Inducible Factor 1a
IGV	: Integrative Genomics Viewer
JAK2	: Janus Kinaz 2
JAK3	: Janus Kinaz 3
JNK	: c-Jun N-terminal Kinase
JOS	: Japanese Otological Society-Japon Otoloji Derneği
KSOM	: Kronik Süpüratif Otitis Media
L.	: Latince
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase-Mitojen-Aktive Protein Kinaz
miRNA, miR	: MikroRNA
MLPA	: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NEÜMTF	: Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
NF-κB	: Nuclear Factor kappa-B-Nükleer Faktör kappa-B
NGS	: Next Generation Sequencing-Yeni Nesil Dizileme

NK	: Natural Killer-Doğal Öldürücü
p.	: protein
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD-L1	: Programmed death-ligand 1
PI3K	: Fosfotidilinositol-3-kinaz
PolyPhen2	: Polymorphism Phenotyping v2
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANKL	: Nuclear Factor kappa-B Ligand
REVEL	: Rare Exome Variant Ensemble Learner
RNA	: Ribonükleik Asit
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640
SHH	: Sonic Hedgehog
SIFT	: Sorting Intolerant From Tolerant
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF-alfa alfa	: Transforming Growth Factor alfa-Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TGF-beta beta	: Transforming Growth Factor beta-Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TIMP	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TOPMed	: Trans-Omics for Precision Medicine
USER	: Uracil-Specific Excision Reagent
VEGF Faktörü	: Vascular Endothelial Growth Factor-Vasküler Endotelyal Büyüme
Y.	: Yunanca

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolesteatoma, orta kulak ve temporal kemikte yassı epitel çoğalması ile karakterize 100.000’de 4-12,6 arasında yıllık insidansa sahip bir hastalıktır (Kemppainen vd., 1999; Aquino vd., 2011). Kolesteatoma, temporal kemikte erozyona neden olarak orta kulak ve mastoid kavitede hasar oluşturur ve ciddi morbidite ve mortaliteler ile sonuçlanabilecek komplikasyonlara yol açabilir. İşitme kaybı, fasiyal sinir paralizi, mastoidit, menenjit, intrakranial tromboflebit ve abseler kolesteatomaun sık görülen komplikasyonları arasındadır.

Kolesteatomanın patofizyolojisi tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Yung vd., 2017). Edinilmiş kolesteatoma patogenezi ile ilgili öne çıkan dört ana teori bulunmaktadır. Bunlar: invajinasyon, migrasyon, squamoz metaplazi ve bazal hücre hiperplazisi teorileridir. Bu teorilerde patogeneze değişmekle beraber tamamında sonuç hücre bölünmesindeki anormal artıştır (Kuo, 2015).

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması, apoptozisten kaçış, ve hücre farklılaşmasının kaybı ile karakterize genetik bir hastalıktır. Kanser patogenezi üzerine yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde tespit edilen genetik değişimler sürücü (driver) gen mutasyonları ve yolcu (passenger) mutasyonlar olarak ayrılmaktadır. Sürücü (driver) gen mutasyonları kanser gelişiminden esas olarak sorumlu mutasyonlardır. Yolcu (passenger) mutasyonlar ise genomun stabilitesinin bozulması sonucu ortaya çıkan ek mutasyonlardır.

Sürücü genler fonksiyonel olarak tümör supresör genler ve onkogenler olmak üzere ikiye ayrılır. Tümör supresör genler çoğunlukla hücre siklusunun kontrolünde görevli genlerdir. APC, PTEN, ve TP53 başlıca tümör supresör genlerdendir. Onkogenler ise fizyolojik olarak hücre bölünmesini indükleyici fonksiyona sahip olup mutasyon sonucu artmış aktivite gösteren genlerdir. Eğer bu genlerde aktivite artışına neden olabilecek bir mutasyon yoksa proto-onkogen olarak adlandırılırlar. AKT1, ALK ve KRAS genleri örnek olarak verilebilecek proto-onkogenlerdir.

İnvazyon, migrasyon, kontrolsüz proliferasyon, ve farklılaşma bozukluğu, kolesteatoma ve kanserin sahip olduğu ortak özelliklerdir. Bu durum, kolesteatoma ve kanserin benzer patogeneze mekanizmalarıyla gelişmesi ihtimalini ön plana çıkarmaktadır. Bu ilişkinin tespiti için, kanser etiyopatogenezinde rolü bilinen tümör supresör ve onkogenlerde meydana gelen mutasyonların kolesteatoma dokusunda normal dokuyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmamızda, kolesteatoma

dokusunda, kanser patogenezinde önemli rol oynayan ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, DLC1, EGFR, ERBB2, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FTSJ3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KCNB2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MYC, MYCN, NOTCH1, NRAS, NRXN1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RBAK, RET, ROS1, SMAD4, SMARCB1, SMO, SMURF1, SRC, SSFA2, STK11, TP53, VHL, ve ZNF594 genlerindeki varyantlar incelenmiştir.



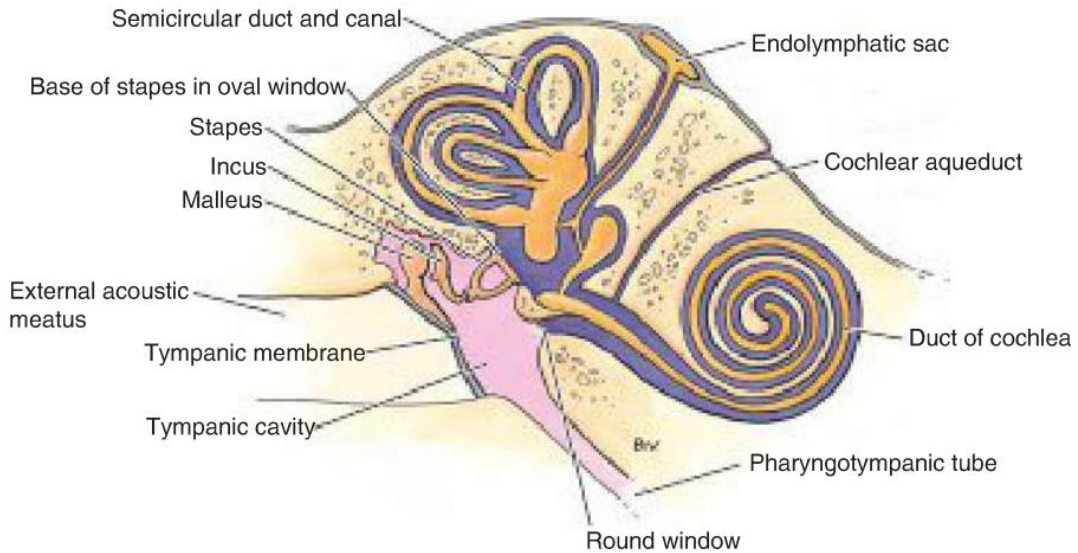
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kulağın Embriyolojisi ve Anatomisi

Kulak, insan vücudunun küçük bir alanını kaplamasına rağmen karmaşık morfoloji ve fizyolojisi nedeniyle kompleks bir organdır. Kulağı ilgilendiren anomali ve hastalıkların daha iyi anlaşılması için embriyolojik gelişiminin, ve anatomisinin bilinmesi özellikle önem arz etmektedir.

2.1.1. Embriyoloji

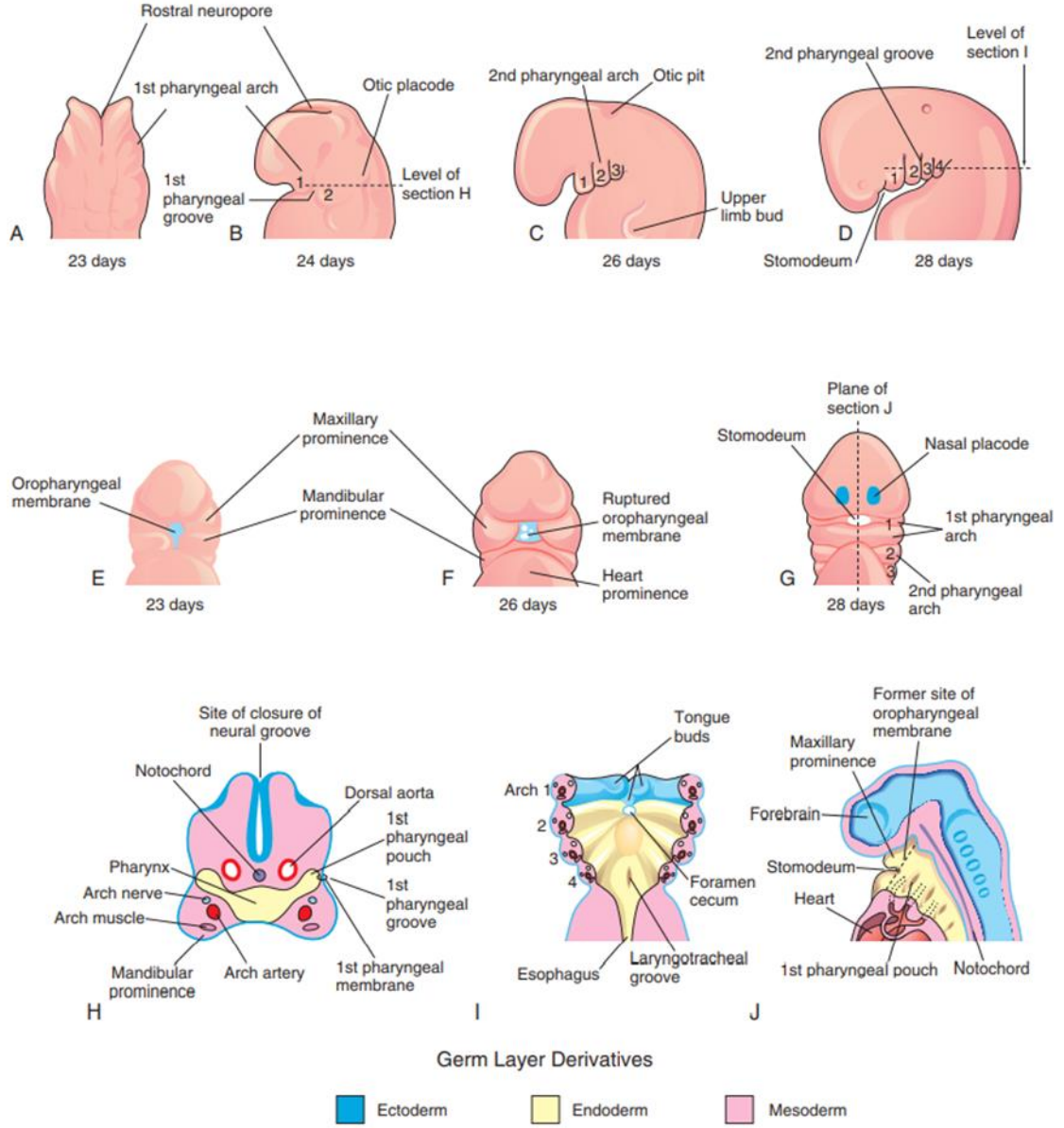
Kulak, dış, orta ve iç olmak üzere üç kısma ayrılır. Aurikula, dış kulak yolu ve kulak zarının eksternal tabakası dış kulağı oluşturur. Kulak kemikçikleri ve timpanik zarın iç tabakası orta kulağın sınırları içindedir. İç kulakta ise işitme ve dengeyi sağlayan vestibulokoklear organ bulunur (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1: Dış kulak yolu, orta kulak ve iç kulak (Sadler, 2019).

Embriyonal gelişimin 4. haftasında notokordun iki yanındaki nöral krest hücrelerinin embriyonun kranial bölgesine göçü sonucu ileride baş ve boynu oluşturacak alanın iki yanında yay şeklinde dokular oluşur. Bunlar farengeal ark olarak adlandırılır. Embriyonun dış kısmında iki farengeal ark arasında kalan alan farengeal oluk olarak isimlendirilir. Farengeal oluğun embriyonun iç kısmındaki iz düşümünde ise farengeal cep bulunur (Şekil 2.2). Özellikle dış ve orta kulağın gelişiminde birinci ve ikinci farengeal arklar önemli bir yere sahiptir. İç kulağın sensörinöral yapısını oluşturan vestibulokoklear organın oluşumunda ise yüzey ektodermi kökenli otik plakod rol alır (Şekil 2.3-2.4).

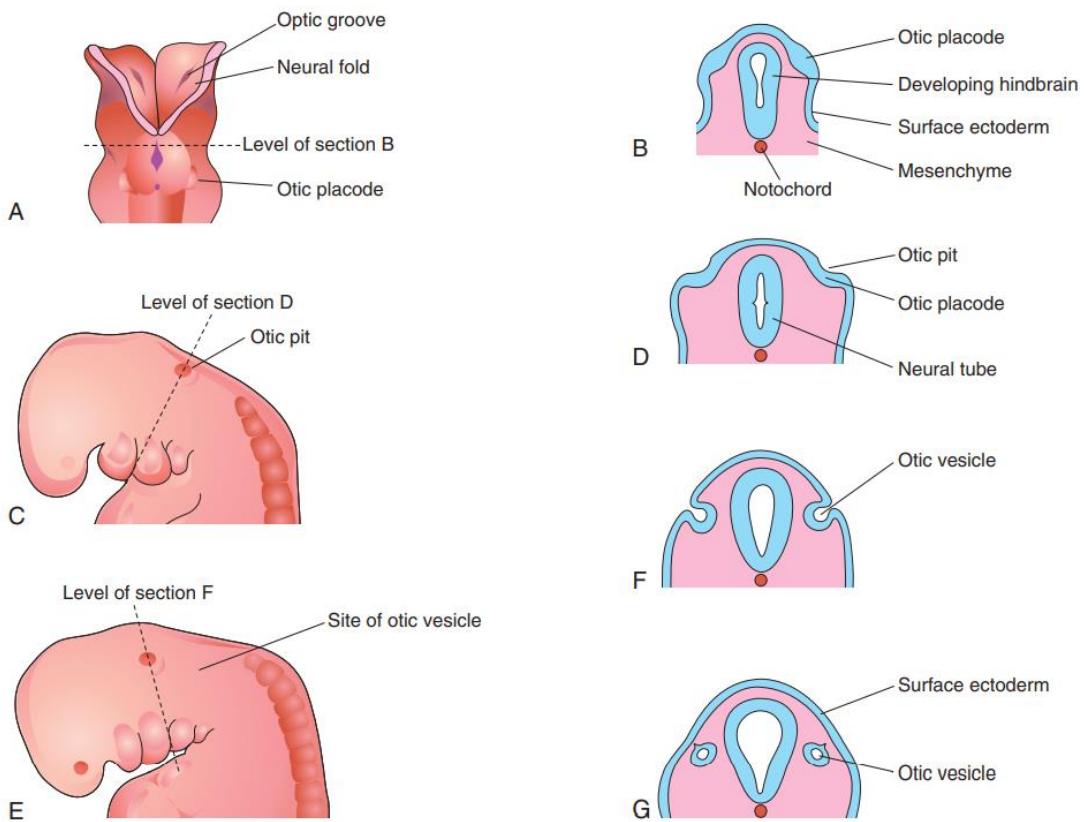
Embriyolojik dönemde yapısal gelişimin başlangıcı göz önüne alındığında kulağın gelişimini kronolojik olarak iç, orta ve dış olarak sıralamak mümkündür.



Şekil 2. 2: Farengeal sistem. A, 23. günde embriyonun kranial kısmının dorsal görünümü. B-D, sırasıyla 24, 26 ve 28. günlerde farengeal arkların lateral görüntüsü. E- G, orofarengeal membranı içeren ventral görünüm. H, kranial bölgenin horizontal kesiti. I, arkus yapıları ve primordial farenks tabanını gösteren horizontal kesiti. J, primordial farenks ve farengeal ceplerin sagittal kesitten görünümü (Moore vd., 2016).

2.1.1.1. İç Kulak Embriyolojisi

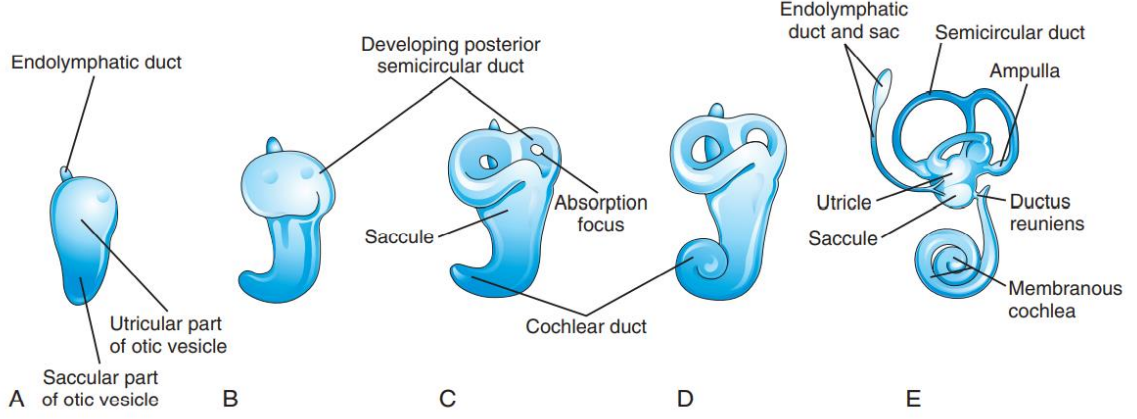
Gelişimin 4. haftasında paraksiyal mesoderm ve notokorddan FGF3 ve FGF10 gibi indüksiyon faktörlerinin salınması sonucu myelensefalonun iki tarafındaki yüzey ektodermi kalınlaşarak otik plakodu oluşturur (Şekil 2.3 A-B). Sonrasında mezenşime doğru derinleşen otik plakod otik çukuru meydana getirir (Şekil 2.3 C-D). Otik çukurun daha da derinleşmesi ve kenarlarının bir araya gelmesi sonucu otik vezikül oluşur (Şekil 2.3 E-G). Sonraki haftalarda, otik vezikülün farklılaşması sonucu membranöz labirent gelişir (Şekil 2.4) (Moore vd., 2016).



Şekil 2. 3: İç kulağın erken dönem gelişimi. A, Embriyonun 22. gündeki dorsal görünümü B, D, F, ve G, otik vezikülün gelişimini gösteren koronal kesitler. C ve E, Embriyonun kranial bölgesinin sırasıyla 24. ve 28. günlerdeki lateral görünümü (Moore vd., 2016).

Embriyogenezin 5. haftasında, otik vezikül dorsalde utriküler ve ventralde sakküler olmak üzere iki morfolojik bölgeye farklılaşır (Şekil 2.4 A). Dorsal utriküler bölgeden endolenfatik kanallar, utrikül ve yarım daire kanalları gelişir. Ventral sakküler bölgeden

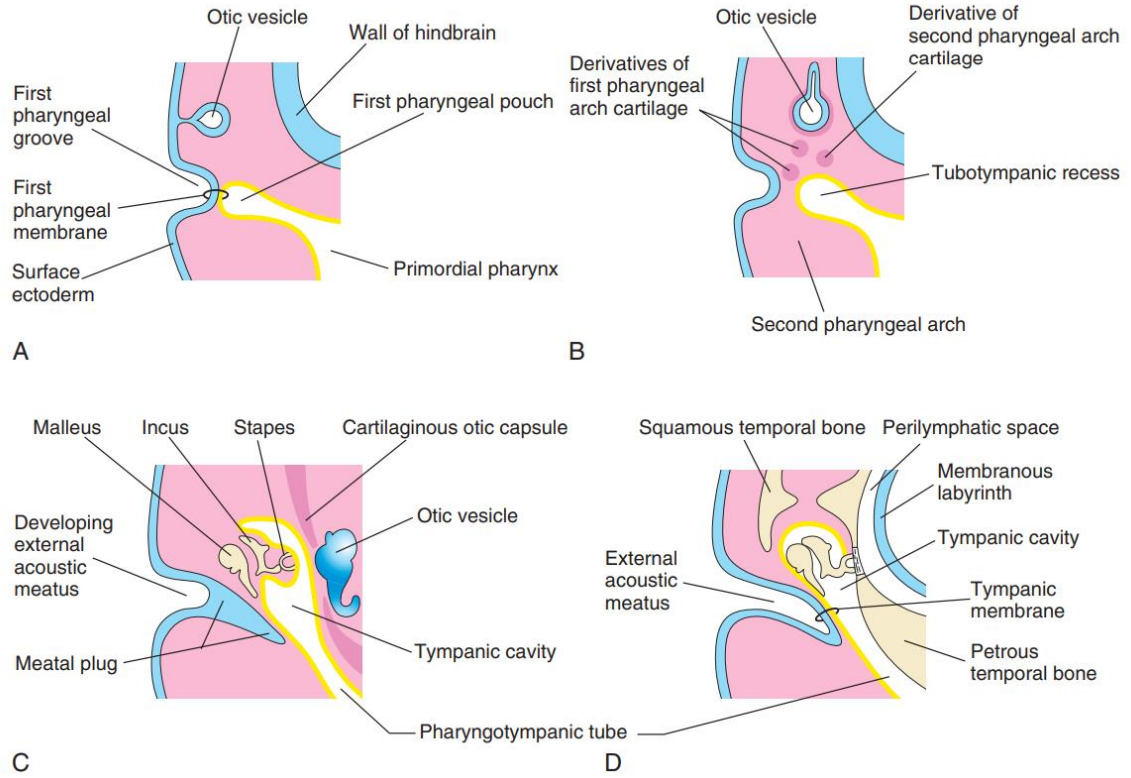
ise sakkül ve koklea meydana gelir (Şekil 2.4 A-E). 20-22. haftalar arasında iç kulak yapıları erişkin dönemdeki şekline erişir (Şekil 2.4 E) (Moore vd., 2016).



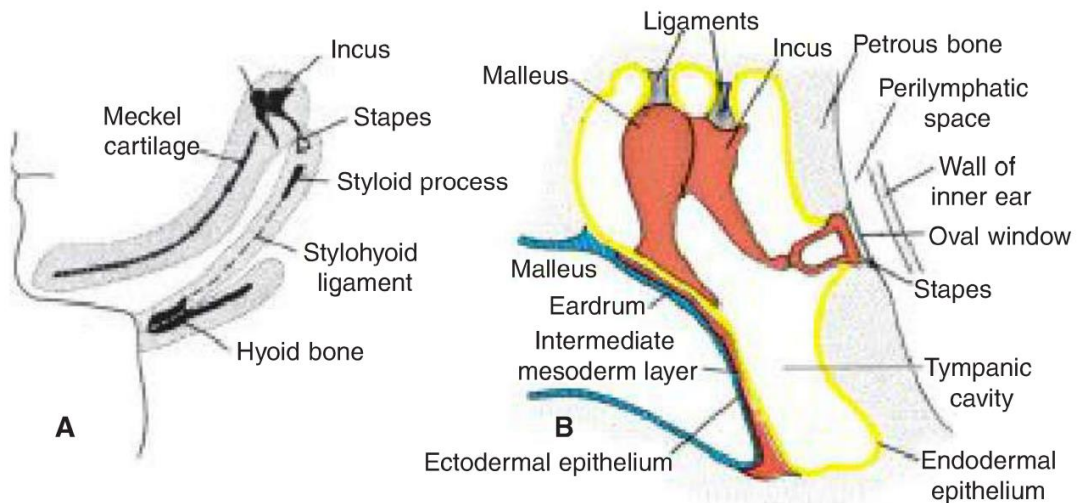
Şekil 2. 4: A- E, otik vezikülden membranöz labirentin oluşumunun ardışık aşamalarının lateralinden görünümü (Moore vd., 2016).

2.1.1.2. Orta Kulak Embriyolojisi

Ayrıca, embriyogenezin 5. haftasında 1. farengeal cebin laterale doğru uzaması sonucu tubotimpanik girinti gelişir. Bu girintinin distal kısmı, ileride orta kulak kemikçiklerini oluşturacak farengeal ark kıkırdaklarına doğru genişler. Orta kulak kemikçikleri 1. ve 2. farengeal ark kıkırdaklarının kondansasyonu sonucu oluşur. 1. farengeal arkustan malleus ve incus, 2. farengeal arkustan stapes gelişir (Şekil 2.6) (Sadler, 2019). Sonraki haftalarda, tubotimpanik girintinin distal kısmı kemikleşme sürecini tamamlayan orta kulak kemikçiklerini sarar ve timpanik kaviteyi oluşturur. Tubotimpanik girintinin proksimal kısmından ise timpanik kavite ile nazofarenks arasındaki bağlantıyı sağlayan tuba östaki meydana gelir (Şekil 2.5) (Moore vd., 2016).



Şekil 2. 5: Otik vezikül, orta ve dış kulağın gelişimi. A, 4. haftada 1. farengeal oluk ve cebin ilişkisi. B, gelişimin 5. haftasında tubotimpanik girinti ve farengeal ark kıkırdaklarının görünümü. C, tubotimpanik girintinin orta kulak kemikçiklerini kaplayarak timpanik kaviteyi oluşturması. D, timpanik kavite oluşumunun tamamlanması ve meatal tıkaçın dejenerasyonu (Moore vd., 2016).



Şekil 2. 6: A, 1., 2. ve 3. farengeal arklardan gelişen kemikler. Malleus ve inkus 1. farengeal arktan, stapes, styloid proses ve hyoid kemiğin kısa boynuzu 2. farengeal arktan,

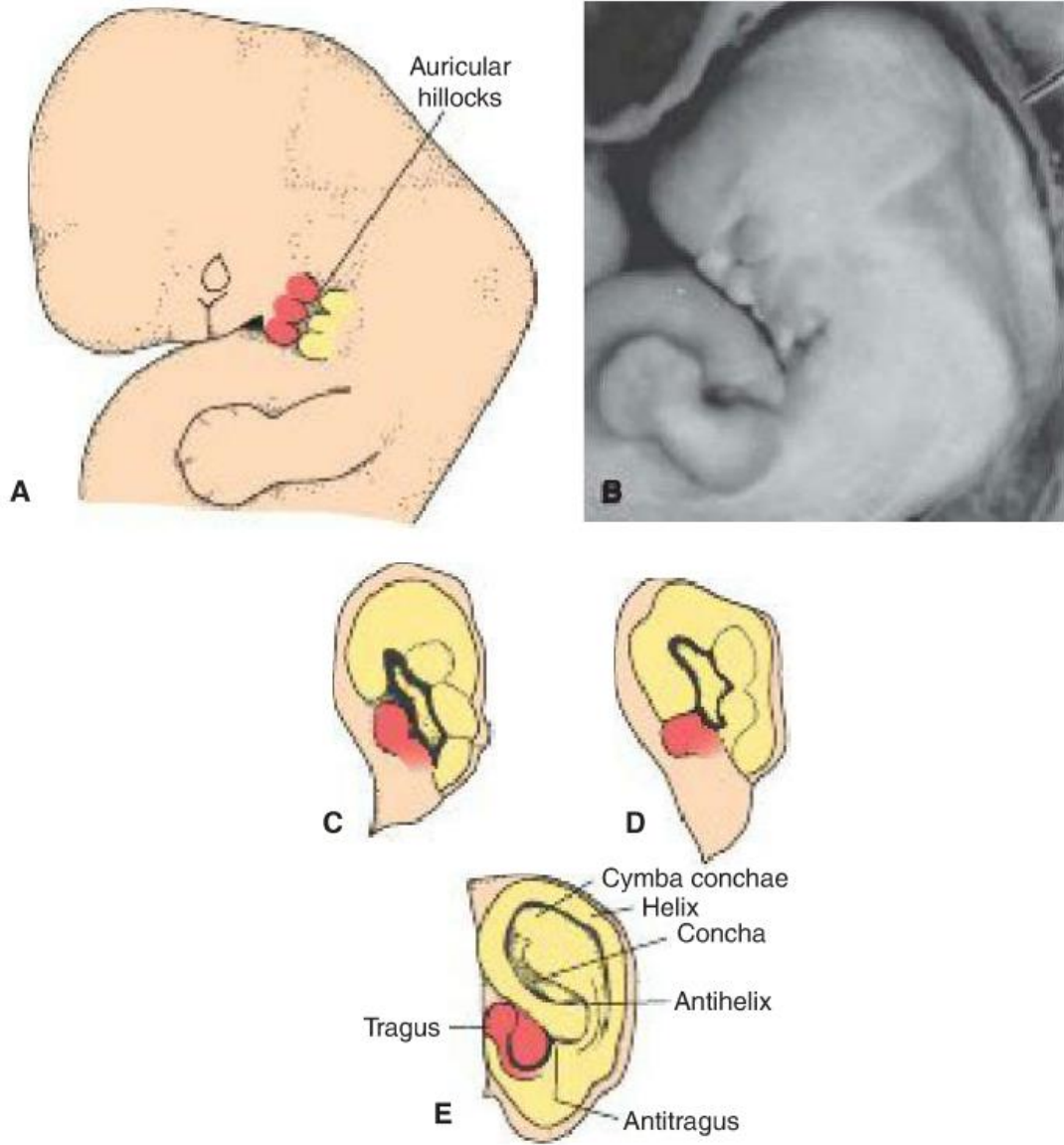
hiyoid kemiğin uzun boynuzu 3. farengeal arkdan gelişir. B, timpanik kavite ve orta kulak kemikçikleri (Sadler, 2019).

2.1.1.3. Dış Kulak Embriyolojisi

Dış kulak yolu gelişimi, embriyolojik yaşamın 9. haftasında birinci farengeal ark dokusunun mediale invajinasyonu ile başlar. Tüp şeklindeki bu yapının uç kısmındaki ektoderm kökenli hücreler çoğalarak meatal tıkaç meydana getirir (Şekil 2.5 C). Fetal yaşamın yedinci ayında meatal tıkaçın santralindeki hücreler dejenere olmaya başlar ve dış kulak yolunun kulak zarına kadar kanalize olmasını sağlar (Şekil 2.5 D) (Moore vd., 2016; Sadler, 2019).

Tubotimpanik girinti, 1. farengeal oluk ve ikisinin arasında kalan mezoderm, kulak zarını meydana gelir. Kulak zarı, yüzey ektodermi, mezoderm ve tubotimpanik girinti endodermi olmak üzere üç germinal tabakayı da içerir (Şekil 2.2 H, Şekil 2.5) (Moore vd., 2016).

Embriyonik sürecin 6. haftasında, 1. ve 2. farengeal arklardaki mezenkimal hücre proliferasyonu sonucu 1. farengeal oluğun dorsalinde her bir tarafta üçer tane olmak üzere toplam altı aurikül tomurcuğu gelişir (Şekil 2.7 A-B). Birinci farengeal arkdan kaynaklanan tomurcuklar tragus ve dış kulak yolunun lateral bölümünü oluşturur. İkinci farengeal arkdan ise aurikulanın geri kalan bölümleri meydana gelir (Şekil 2.7 C-E) (Sadler, 2019).



Şekil 2. 7: A-B, 6 haftalık embriyonun lateralinden görünümü. 1. farengeal oluğun dorsalini iki taraftan çevreleyen 6 auriküler tomurcuk. C-E. Birinci (kırmızı) ve ikinci (sarı) farengeal ark kaynaklı tomurcukların farklılaşarak aurikulayı oluşturması (Sadler, 2019).

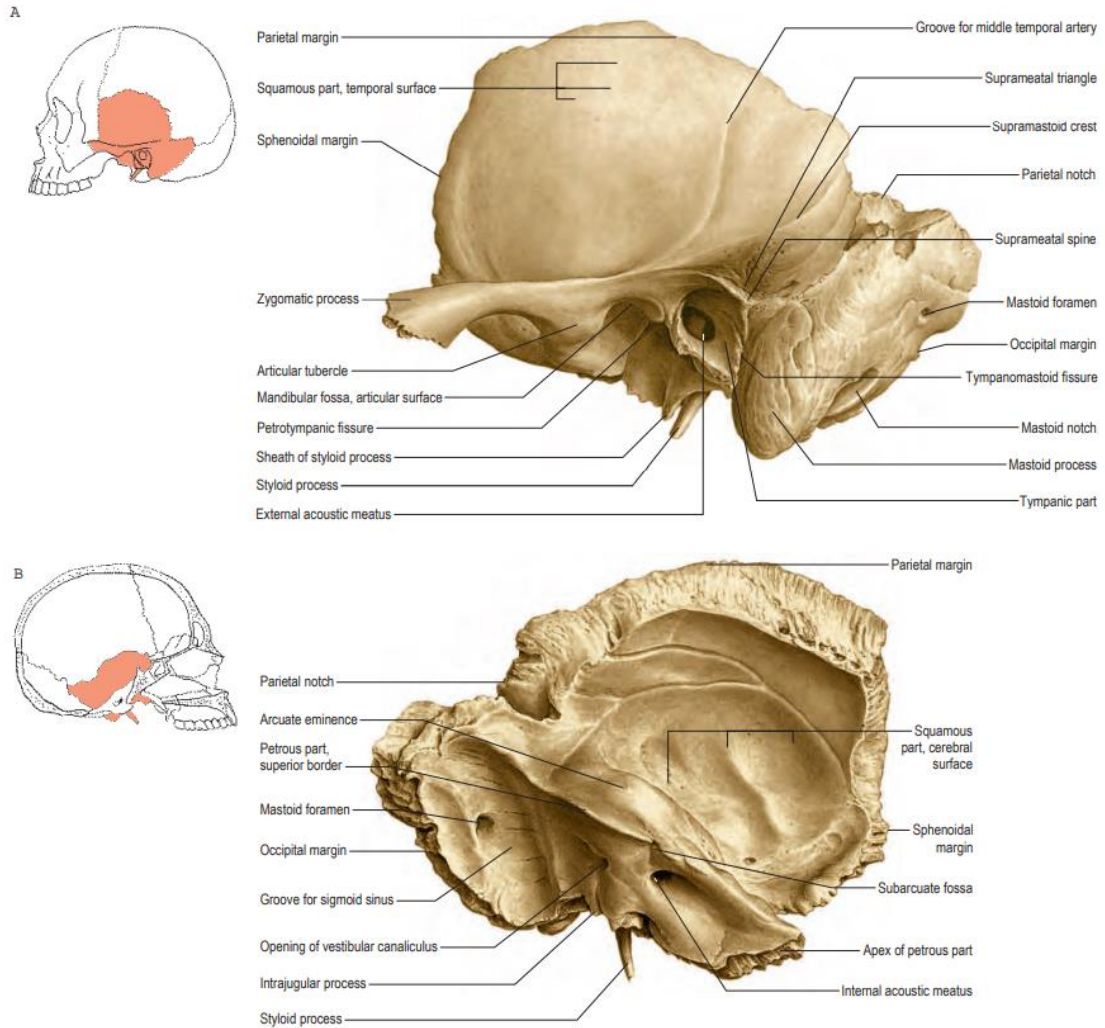
2.1.2. Anatomi

2.1.2.1. Temporal Kemik

Temporal kemik, kraniumun lateral duvarına ve kafa tabanının orta kısmına katılan, işitme organını barındıran, birçok sinir ve damarın geçiş noktasını oluşturan kafatası kemiğidir. Skuamöz, petromastoid, timpanik ve stiloid proses olmak üzere dört parçadır (Şekil 2.8).

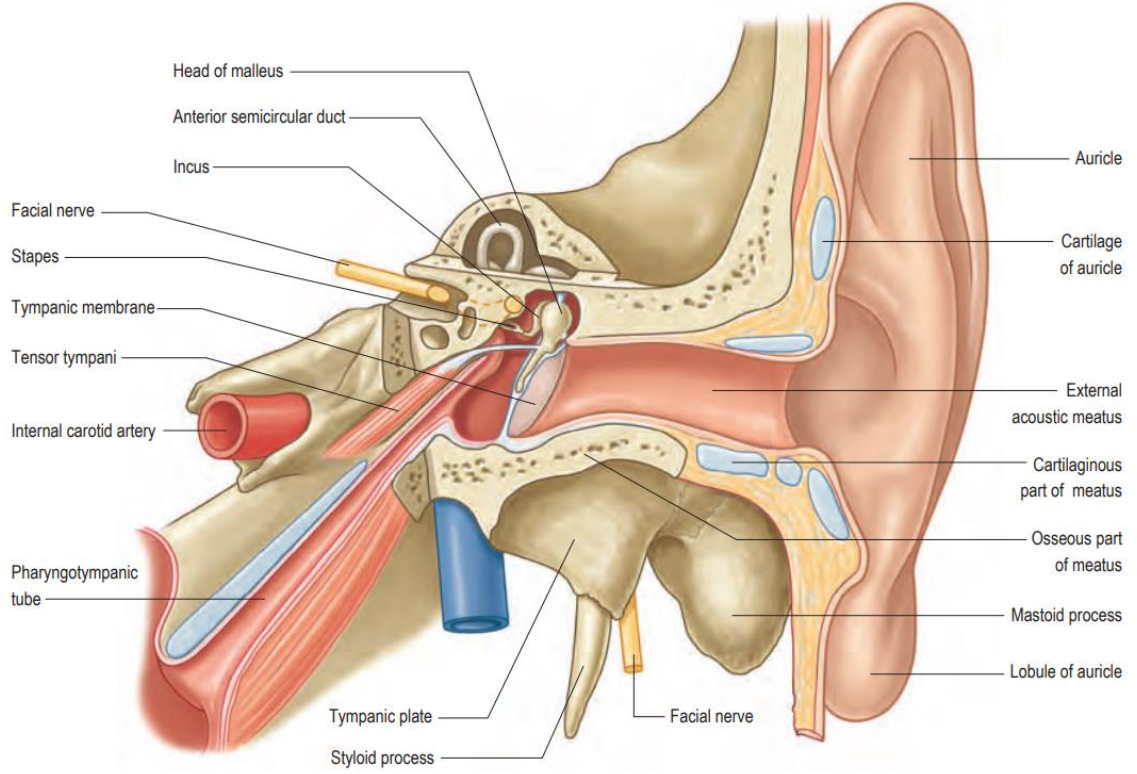
Skumöz parça, temporal kemiğin anterosuperior bölümündedir ve orta kranial fossa ve kraniumun lateral duvarına katılır. Ayrıca, skumöz parçadaki mandibular fossaya mandibulanın kondili yerleşir ve birlikte temporomandibular eklemi oluştururlar.

Petromastoid parça petröz ve mastoid olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Petröz kısım skumöz parça ile birlikte orta kranial fossaya katılır. Ek olarak, vestibülokokleayı içeren otik kapsülü ve orta kulak kemikçiklerinin bulunduğu timpanik kaviteyi barındırır. Mastoid kısım temporal kemiğin posteroinferiorunda bulunur ve posterior oksipital kemikle oksipitotemporal suture oluşturur. Dış kulak yolunun posteroinferiorunda yerleşik trabeküler yapıdaki konik şekilli çıkıntı mastoid proses olarak adlandırılır (Şekil 2.8). Yetişkinlerde mastoid proses hava dolu mastoid hücreleri içerir. Aynı zamanda sternokleidomastoid, digastrik kasın posterior parçası, splenius capitis, ve longissimus capitis kaslarına tutunma alanı sağlar (Standring vd., 2016).



Şekil 2. 8: A-B, temporal kemiğin lateral ve medial görünümü (Standring vd., 2016).

Timpanik parça skuamöz parçanın inferiorunda bulunur ve skuamöz parça ile beraber dış kulak yolunun kemik açıklığını oluşturur. Stiloid parça ise anteroinferior doğrultusunda uzanır ve stiloid kasların ligamanlarına bağlanır (Şekil 2.8) (Standring vd., 2016).

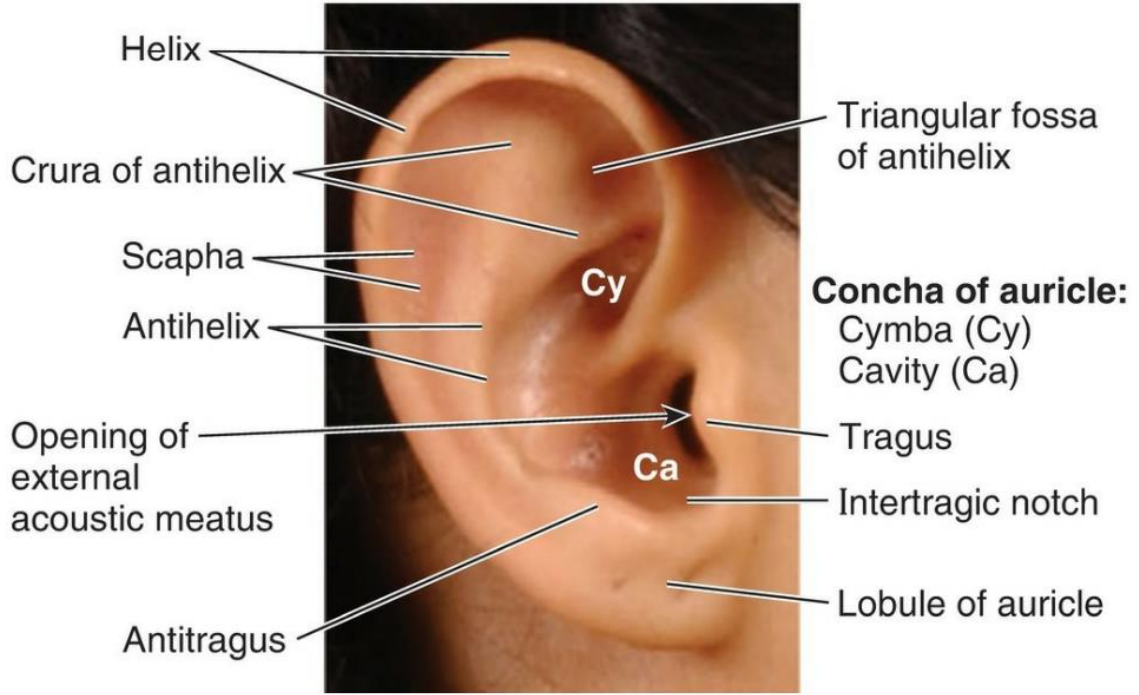


Şekil 2. 9: Sol kulağın anteriordan görünümü (Standring vd., 2016).

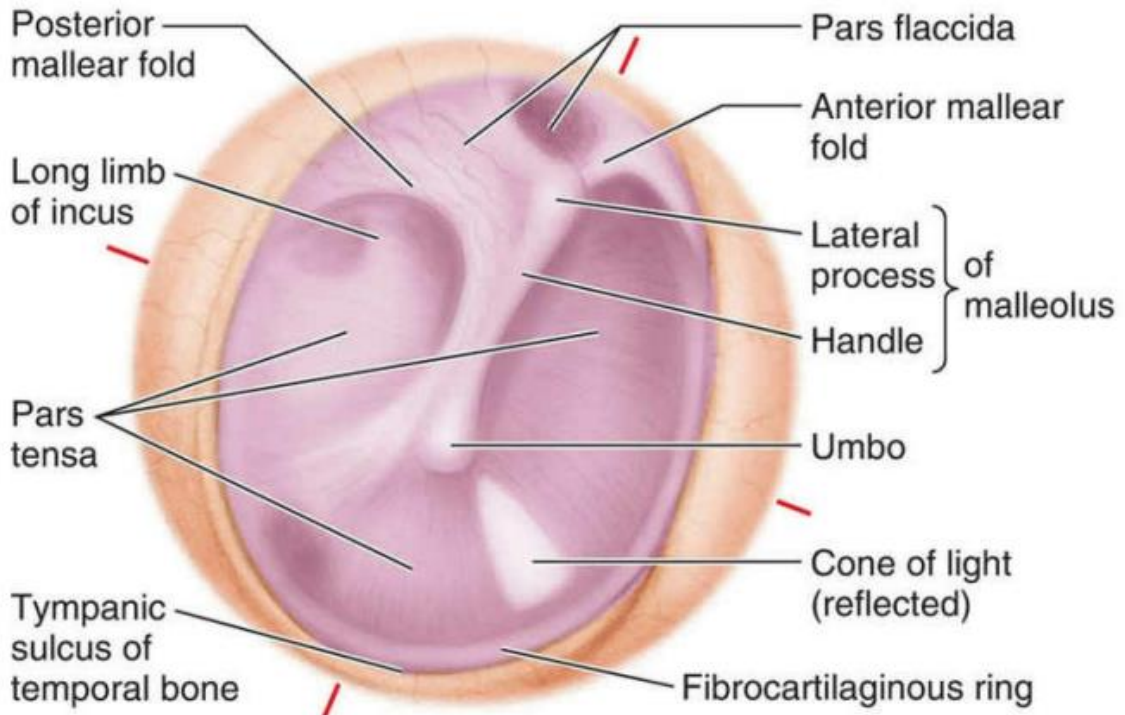
2.1.2.2. Dış Kulak

Dış kulak, aurikula ve dış kulak yolundan oluşur. Aurikula dış ortamdan ses dalgalarını toplayarak dış kulak yoluna yöneltir. Dış kulak yolu ise ses dalgalarının kulak zarına iletimini sağlar. Dış kulak yolu aurikuladan kulak zarına kadar 2-3 cm boyunca uzanır ve kanal şeklindedir. Bu kanalın lateral 1/3 kısmı kıkırdak, medial 2/3 kısmı ise kemik yapıdadır (Şekil 2.9) (Moore vd., 2018).

Kulak zarı, dış kulak yolunun medialinde bulunan yaklaşık 1 cm çapındaki dış kulak ve orta kulağı birbirinden ayıran oluşumdur (Şekil 2.11). Kulak zarına dış kulak yolundan otoskopik olarak bakıldığında anterosuperiordan posteroinferiora uzanan manubrium malleinin oluşturduğu konkavite göze çarpar. En derin bölümü umbo olarak adlandırılan manubrium malleinin ucundaki yuvarlak yapıdır (Şekil 2.11).



Şekil 2. 10: Dış kulak: aurikula ve dış kulak yolunun lateralden görünümü. Aurikulanın morfolojik bölümleri (Moore vd., 2018).

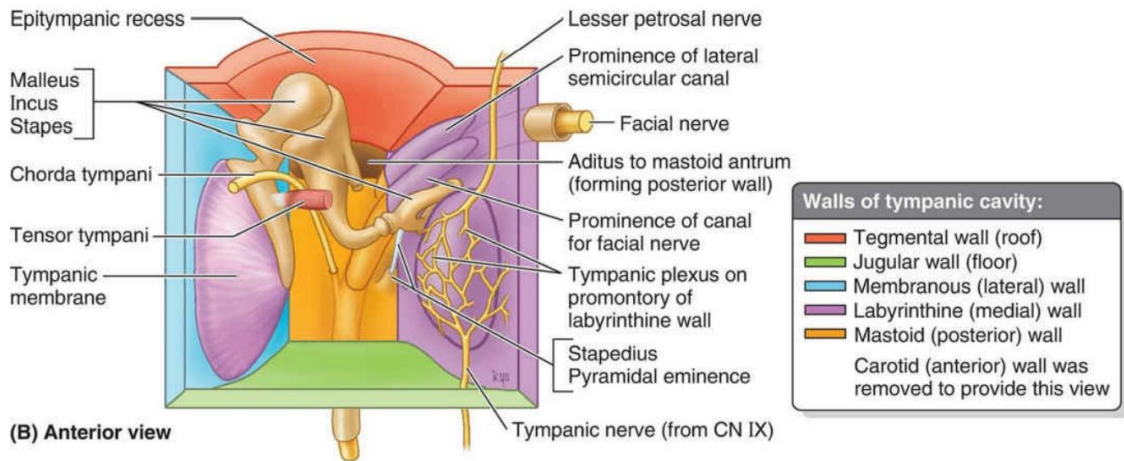


Şekil 2. 11: Sağ kulak zarının otoskopik görünümü (Moore vd., 2018).

Malleusun lateral prosesinin süperiorunda zarın ince ve gevşek olduğu bölgeye pars flaccida adı verilir. Kolesteatoma etiyopatogenezinde önemli role sahip olan retraksiyon cebi oluşumu en sık bu alanda görülür. Pars flaccida dışında kalan gergin ve fibröz doku içeren bölge pars tensa olarak adlandırılır (Şekil 2.11). Kulak zarının dış kısmı deriyle, iç tarafı ise orta kulak mukozasıyla kaplıdır. Pars tensada pars flaccidadan farklı olarak sirküler ve radial fibröz lifler içeren fibröz tabaka bulunur (Moore vd., 2018).

2.1.2.3. Orta Kulak

Temporal kemiğin petröz kısmı içinde bulunan timpanik kavite, orta kulak yapılarını içerir ve tuba östaki ile nazofrenkse, mastoid antrum ile posterosüperiordaki mastoid hücrelere açılır. Timpanik kavite, orta kulak kemikçiklerini, stapedius ve tensor timpani kaslarını, VII. kranial sinirden köken alan korda timpaniye ve timpanik pleksusu bulundurur (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12: Orta kulak boşluğunun anteriordan görünümü (Moore vd., 2018).

2.1.2.3.1. Timpanik Kavitenin Duvarları

Timpanik kavitenin altı duvarı bulunur:

Üst(tegmental) duvar: tegmen timpani, timpanik kavite ile orta kranial fossayı birbirinden ayıran kemik yapıdır. Superiora doğru kubbeleşerek epitimpanik girintiyi oluşturur.

Alt(jugular) duvar: timpanik kaviteyi bulbus vena jugularisten ayıran duvardır. Posteriordan anteriora doğru genişleyerek seyredir.

Lateral(membranöz) duvar: kulak zarı ve epitimpanik girintinin lateral kemik kısmından oluşur. Orta kulak ve dış kulak yolu arasındadır.

Medial(labirentin) duvar: timpanik kaviteyi iç kulaktan ayırır. Bu duvarda kokleanın bazal helezonunun oluşturduğu promontorium, oval ve yuvarlak pencereler bulunur.

Arka(mastoid) duvar: mastoid antrumun girişini(aditus) ve fasiyal sinir kanalını içerir. Arka duvarda aynı zamanda stapes tendonunun bağlandığı eminentia pyramidarum bulunur (Şekil 2.12).

Ön(karotid) duvar: timpanik kavite ve karotid kanal arasındadır. Tensor timpani kanalı ve tuba östaki bu duvarın süperiorundan orta kulak boşluğuna açılır (Şekil 2.9) (Moore vd., 2018).

2.1.2.3.2. Tuba Östaki

Timpanik kaviteyle nazofarenks arasında superolateral-inferomediyal olarak seyreden tuba östaki, orta kulak ile dış ortam arasında oluşturduğu bağlantı sayesinde kulak zarının iki tarafındaki basıncı dengeler. Posterolateral 1/3'lük kısmı kemik, anteromedial 2/3 'ü kıkırdak yapıdadır.

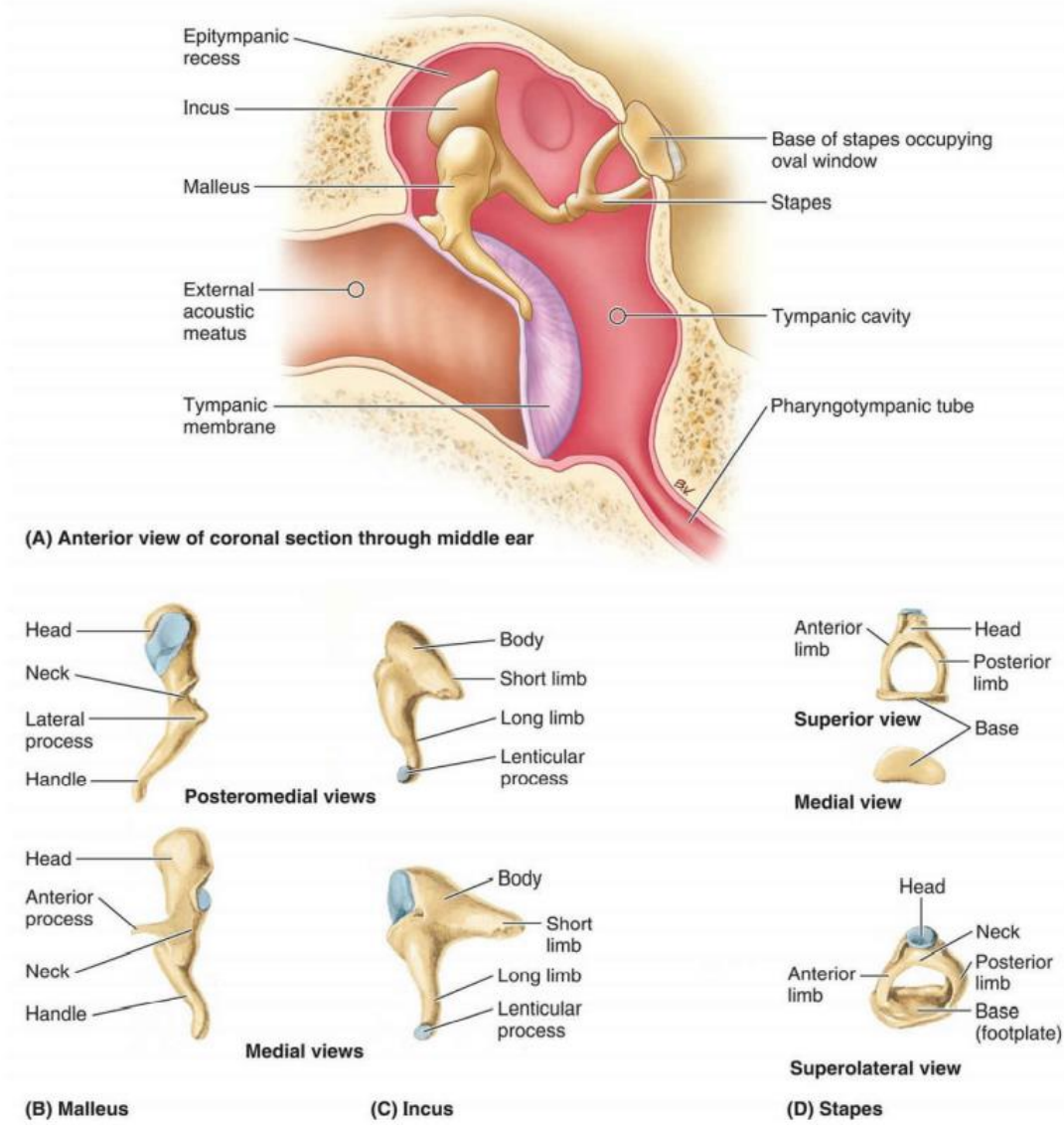
2.1.2.3.3. Orta Kulak Kemikçikleri

Orta kulak kemikçikleri kulak zarı ile oval pencere arasında uzanan üç ayrı hareketli kemikçikten oluşur. Bunlar dıştan içe doğru malleus, inkus ve stapes olarak adlandırılır (Şekil 2.13).

Malleus (L. çekiç): kapitulum, kollum, manubrium, lateral ve anterior olmak üzere beş bölümü vardır. Manubrium kısmı, kulak zarına anterosuperior-posteroinferior doğrultusunda yapışıktır. Malleusun kollumuna bağlanan tensor timpani kası, kulak zarının gerginliğini sağlar. Kapitulum ise epitimpanik girintide bulunur ve inkus ile eklem yapar.

İnkus (L. örs): gövde, uzun kol ve kısa koldan oluşur. Gövde kısmı epitimpanik girintide bulunur ve malleusun kapitulumu ile eklem yapar. İnkusun uzun kolu malleusun manibriumuna paralel olarak uzanır ve uç kısmındaki lentiküler proses ile stapes başına eklemlenir.

Stapes (L. üzengi): bir baş, iki bacak ve taban olmak üzere dört bölümden oluşur. Vücudun en küçük kemiğidir. Baş kısmı inkusun lentiküler prosesi ile eklemlenir. Taban ise oval pencereye yapışıktır (Şekil 2.13) (Moore vd., 2018).

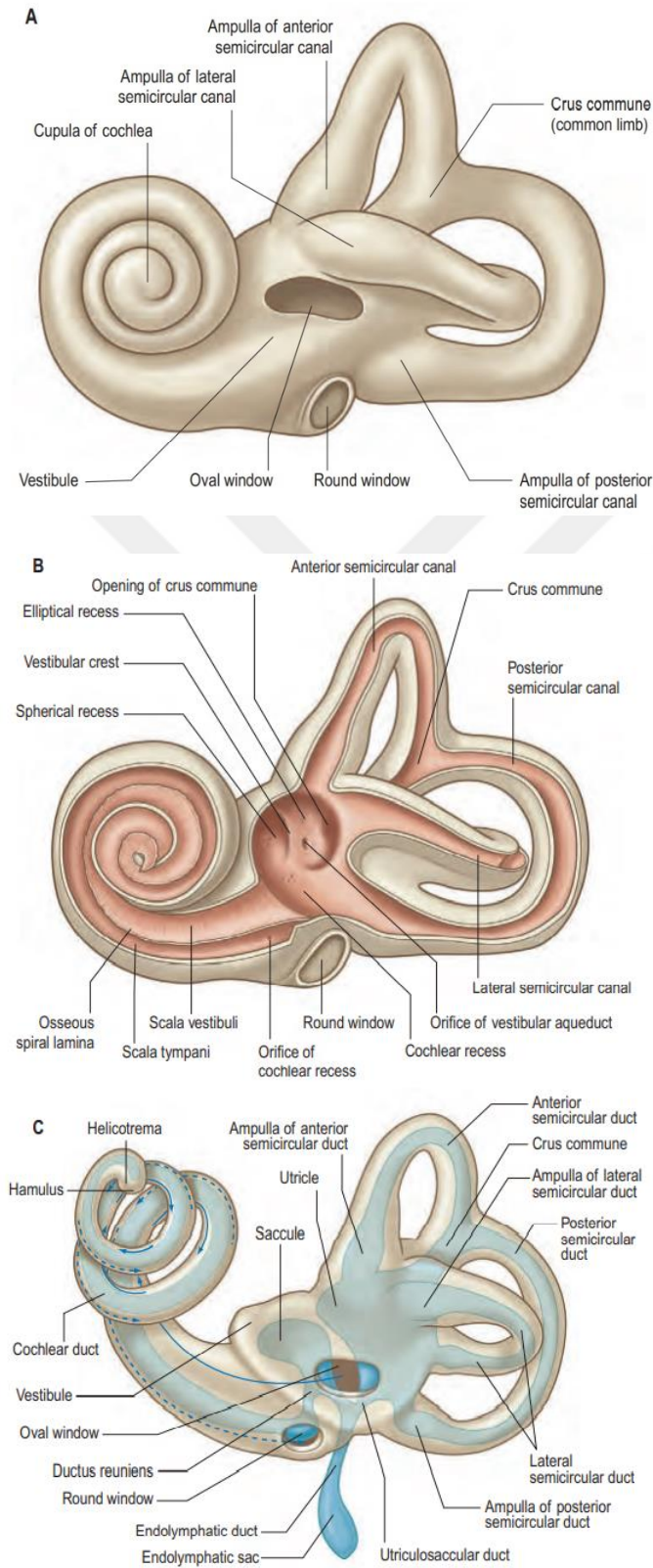


Şekil 2. 13: Orta kulak kemikçikleri. A, kemikçiklerin timpanik kavitedeki yerleşimleri. B–D, malleus, inkus ve stapes (Moore vd., 2018).

2.1.2.4. İç Kulak

İç kulak, barındırdığı vestibulokoklear organ sayesinde işitme duyusu ve dengenin sağlanmasında görev alır. Endolenf içeren membranöz labirent, temporal kemiğin petroz

parçasının içerisindeki kemik labirentte perilenf sıvısı içinde asılı halde bulunur (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14: Sol kemik labirentin lateralden görünümü. A, kemik yapının dışarıdan görünümü. B, iç yapı. C, membranöz labirentin(mavi) kemik labirent içindeki görünümü (Standring vd., 2016).

Kemik labirent, temporal kemiğin petröz parçasında bulunan otik kapsül içindeki boşluklar bütünüdür. Koklea, vestibül ve yarım daire kanallarından oluşur. Koklea, işitme organını barındıran salyangoz şeklindeki helezonik yapıdır. Vestibül, yaklaşık 5 mm uzunluğundadır ve utrikül ve sakkülü içerir. Yarım daire kanalları, anterior, posterior ve lateral olmak üzere üç tanedir ve ampullalar aracılığıyla vestibule açılırlar (Şekil 2.14 A) (Moore vd., 2018).

Membranöz labirent, vestibüler ve koklear olmak üzere ikiye ayrılır. Vestibüler labirent utrikül, sakkül, utrikülosakküler kanal, yarım daire kanalları, endolenfatik kanal ve endolenfatik keseyi içerir. Koklear labirent spiral şekilli koklear kanaldan meydana gelir. Ses dalgalarının orta kulak kemikçiklerinde meydana getirdiği titreşimi nöral sinyallere dönüştürerek işitme duyusunu sağlar. Membranöz labirentin vestibüler ve koklear parçaları ductus reuniens ile birbirine bağlanır (Şekil 2.14 C) (Moore vd., 2018).

2.2. Kolesteatoma

2.2.1 Tanım

Kolesteatoma, timpanik kavitede ve/veya temporal kemiğin mastoid prosesindeki keratinize yassı epitel dokusu ve subepitelyal bağ dokusu proliferasyonu ve keratin debris birikimi sonucu oluşan kitle olarak tanımlanır. Kolesteatoma dokusu matriks, perimatriks ve keratin debrisden oluşmaktadır (Yung vd., 2017).

2.2.2. Tarihçe

Kolesteatomanın hakkında ilk yazılı kaynağın 1683 yılında Fransız hekim Guichard Joseph Duverney tarafından kaleme alındığı bildirilmiştir (Soldati ve Mudry, 2001). Ancak, Hipokrat (MÖ 460-379)'ın, yazdığı Epidemi isimli kitapta kolesteatoma ile ilişkili bir vakadan bahsettiği görülmektedir. Bu vakanın klinik bulgularının komplike kolesteatoma ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır (Benmoussa vd., 2020).

Bilinen ilk kolesteatoma terimi Alman fizyolog ve anatomist Johannes Müller tarafında 1838'de ifade edilmiştir. Müller, dokunun yağlı görünümü nedeniyle safra (Y. χολή: safra) ve yağ (Y. στέαρ: mum yağı) içeren tümör anlamına gelen “kolesteatoma”

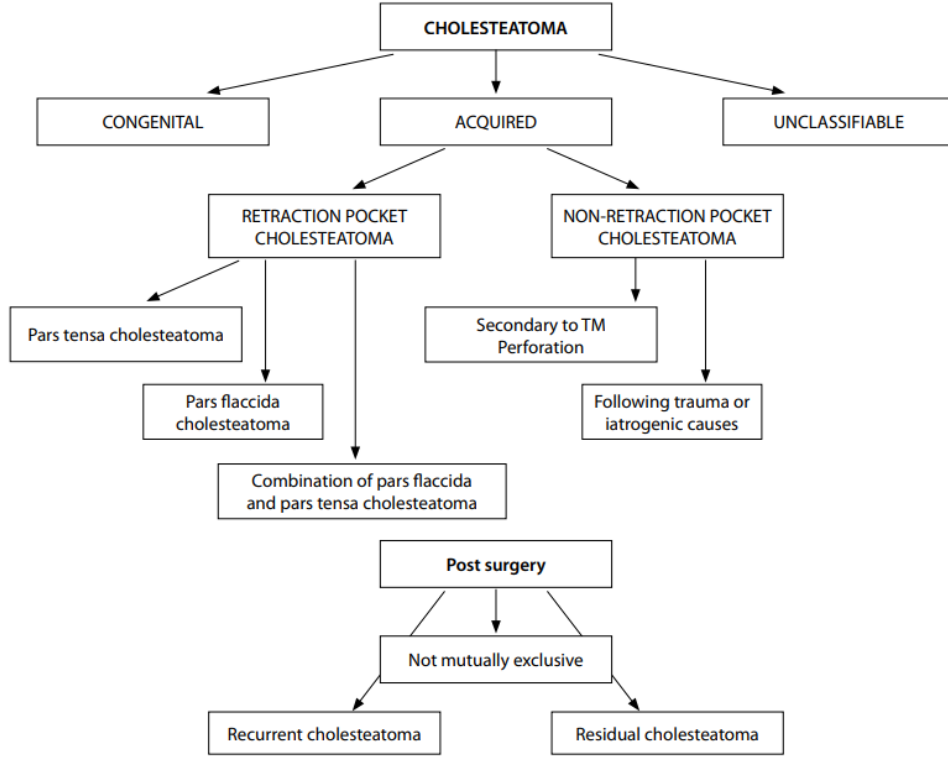
olarak adlandırmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda kolesteatomanın yağ hücresi veya kolesterol ile ilişkili olmadığı ortaya konmuştur (Soldati ve Mudry, 2001).

2.2.3. Epidemiyoloji

Dünya literatüründeki verilere bakıldığında kolesteatomanın yıllık insidansı 100.000’de 4,2 ile 12,6 arasında değişmektedir. Dünya çapında yaklaşık 5 milyon kolesteatoma vakasının olduğu tahmin edilmektedir. Demografik özellikler açısından sıklıkla 50 yaş altında tanı konmakta ve erkek/kadın oranı 1,4:1 olarak bildirilmektedir. Gelişmiş ülkelere kıyasla az gelişmiş ülkelerde kolesteatoma sıklığının daha fazla olduğu görülmektedir (Kemppainen vd., 1999; Louw, 2010; Aquino vd., 2011; Olszewska vd., 2004; Castle, 2018). Kolesteatoma en sık beyaz ırk ve Afrika kökenlilerde izlenmekte, Hindistan hariç olmak üzere Asya ırklarında daha nadir gözlenmektedir (Potsic vd., 2002). Türkiye’de kolesteatomanın epidemiyolojisi konusundaki çalışmalar yetersizdir (Tekin ve Çelik, 2019).

2.2.4. Sınıflama

Kolesteatoma, 2017 yılında Avrupa Otoloji ve Nörootoloji Akademisi (EAONO) ve Japon Otoloji Derneği (JOS)’nin konsensüsüyle yapılan ortak çalışmada konjenital, edinilmiş, ve sınıflandırılmayan olmak üzere üç sınıfa ayrılmıştır (Yung vd., 2017). Konjenital kolesteatoma hastalarında timpanik membranın bütünlüğü korunmuştur ve bu hastalar genellikle erken çocukluk döneminde tanı alır. Edinilmiş kolesteatoma ise retraksiyon poşu ve non-retraksiyon poşu olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır. Retraksiyon poşu kolesteatoma, meydana geldiği alana göre pars tensa, pars flaccida ve ikisinin kombinasyonu olmak üzere üçe ayrılır. Non-retraksiyon poşu kolesteatoma ise timpanik membran perforasyonuna sekonder ve travma veya iyatrojenik nedenli olmak üzere iki gruptur. Sınıflandırılmayan tip çoğunlukla ileri evrelerde konjenital/edinilmiş ayrımının yapılamadığı durumlarda kullanılmaktadır (Yung vd., 2017) (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15: EAONO/JOS sınıflaması (Yung vd., 2017)

2.2.5. Tanı

Kolesteatoma tamamen asemptomatik seyredebileceği gibi otore, işitme kaybı ve tinnitus gibi bulgularla da saptanabilir (Castle, 2017). Kolesteatoma tanısı, otoskopik muayene, bilgisayarlı tomografi, odyometrik ölçümler veya cerrahi eksplorasyon ile konulabilir (Louw, 2010). Hastalar çoğunlukla otoskopik muayenenin ardından yapılan bilgisayarlı tomografi sonucu tanı alırlar.

2.2.6. Komplikasyonlar

İşitme kaybı, vestibüler disfonksiyon, fasiyal paralizi ve intrakranial komplikasyonlar kolesteatomanın sık görülen komplikasyonları arasındadır (Louw, 2010). Sigmoid sinus trombozu, epidural abse ve menenjit sık görülen intrakranial komplikasyonlardır.

2.2.7. Tedavi

Kolesteatomanın tek tedavi yöntemi cerrahidir. Yapılan cerrahi operasyon, kolesteatomanın boyut ve yerleşimine bağlı olarak masteidektomi ve timpanoplasti işlemlerini içerebilmektedir.

2.2.8. Ailesel Kolesteatoma

Tanımlanmış bir geni veya kalıtım paterni bulunmamasına rağmen literatürde kolesteatoma olgularının ailesel kümelenmesini bildiren yayınlar mevcuttur.

Grönland'dan bildirilen bir vaka grubunda anne, baba ve yedi çocuktan oluşan dokuz kişilik ailenin dört üyesinde (anne ve üç çocuk) kolesteatoma nedeniyle cerrahi müdahale yapılmıştır (Homøe ve Rosberg, 2007). İngiltere'nin Doğu Anglia bölgesinde yapılan başka bir çalışmada, retrospektif olarak iki veya daha fazla kolesteatoma vakasının bulunduğu 15 aile tespit edilmiştir (Prinsley, 2009). Bu iki yayının görece yakın tarihlerde yapılmış olması gelecekte ailesel kolesteatoma olguları ile ilgili daha fazla literatür verisinin oluşacağını düşündürmektedir.

Ailesel kümelenmenin yanında literatürde, APC geninde patojenik varyant saptanan bir familial adenomatöz polipozis (FAP) hastasında polipozis koli ve kolesteatoma beraberliğini bildiren bir vaka bulunmaktadır (Shaoul vd., 1999). Bilinen bir herediter kanser sendromu olan FAP ile hiperploriferasyonla karakterize kolesteatomanın birlikteliği, iki hastalığın da ortak bir patofizyolojik mekanizmaya sahip olma ihtimalini güçlendirmektedir. Ancak bu konuda literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Ayrıca, literatürde bildirilen bazı vakaların mendelian kalıtım paternine uygun olarak segregasyon göstermesi ve kolesteatomanın birçok sendromun bir parçası olarak saptanması altta yatan olası genetik etiyopatogenezin araştırılmasını gerekli kılmaktadır (Jennings vd., 2017).

2.2.9. Etiyopatogenez

2.2.9.1. Kronik Otitis Media

Timpanik kavite, mastoid hücreler ve tuba östaki mukozasının enfeksiyon ve inflamasyonu olarak tanımlanan otitis media, efüzyonlu, akut perforasyonsuz, akut perforasyonlu ve kronik süpüratif olmak üzere alt tiplere ayrılır (Morris ve Leach, 2009). Bunların içinde kolesteatoma ile en sık ilişkilendirilen tip kronik süpüratif otitis mediadır (KSOM). KSOM, 2-6 hafta boyunca kulak zarından gelen akıntı (otore) ile karakterizedir ve tanı anında kalınlaşmış granule orta kulak mukozası, mukozal polipler veya kolesteatoma saptanabilir. Efüzyonsuz kronik otitis media, kronik mastoidit ve kronik timpanomastoidit KSOM tanımının içerdiği diğer kavramlardır. KSOM'un efüzyonlu kronik otitis mediadan farkı kulak zarının perforasyonu ile karakterize olmasıdır (Acuin, 2007). Tekrarlayan otitler, üst solunum yolu enfeksiyonları ve tuba östaki disfonksiyonu kronik

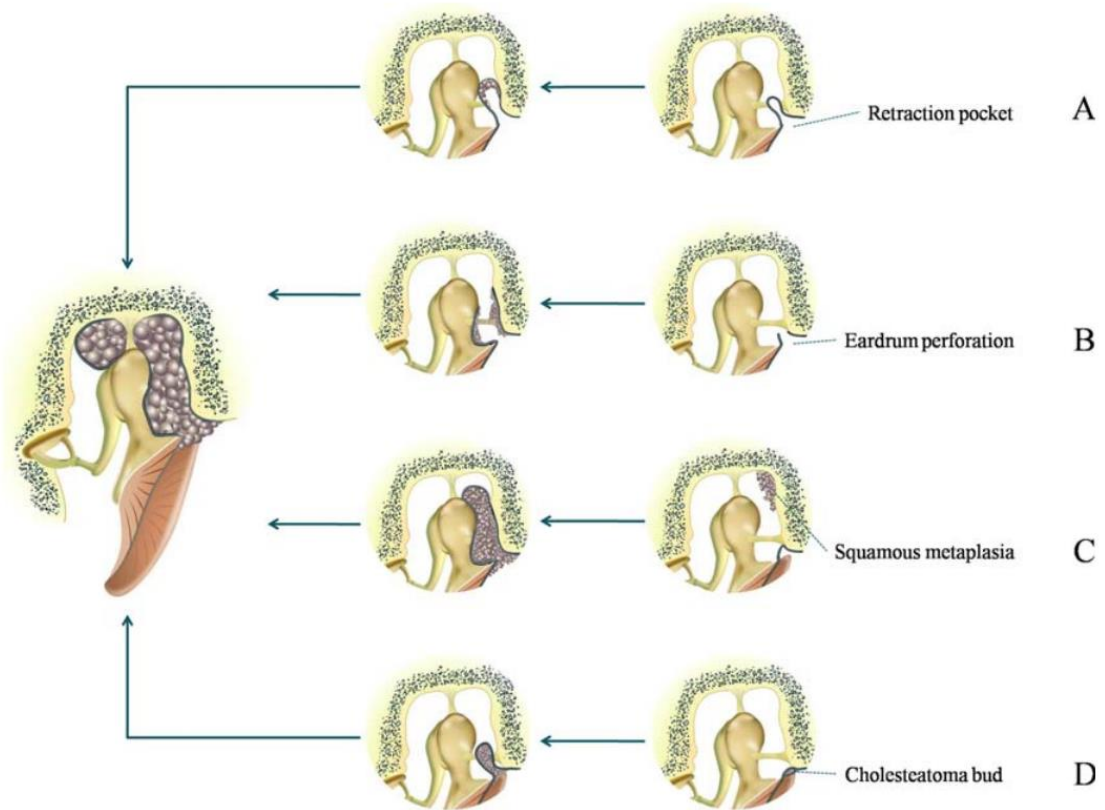
otitis media patogenezinde rol alan etmenlerdir. Hastalar kulak ağrısı, kulak akıntısı, ve işitme kaybı ile başvurabilecekleri gibi ileri dönemlerde kolesteatoma veya intrakranial komplikasyon bulgularıyla da gelebilirler.

2.2.9.2. Konjenital Kolesteatoma

Konjenital kolesteatoma vakaları, tanı yaşı ve klinik bulguları açısından edinilmiş kolesteatomadan ayrılır. Kulak zarı bütünlüğünün bozulmadığı bu hastalarda temel patogenezin normal embriyolojik gelişimde gestasyonun 33. haftasında kaybolan epidermoid bir kalıntının involüsyonundaki aksama olduğu düşünülmektedir (Moore vd., 2016).

2.2.9.3. Edinilmiş Kolesteatoma

Edinilmiş kolesteatomalarda etiopatogenez ile ilgili öne çıkan dört teori bulunmaktadır. Bunlar; invajinasyon, migrasyon, skuamöz metaplazi ve bazal hücre hiperplazisi teorileridir (Kuo, 2015) (Şekil 2.16).



Şekil 2. 16: Kolesteatoma etiopatogenezinde öne çıkan dört teori. A, invajinasyon teorisi. B, migrasyon teorisi. C, skuamöz metaplazi teorisi. D, bazal hücre hiperplazisi teorisi (Kuo, 2015).

2.2.9.3.1. İnvajinasyon (retraksiyon poşu) teorisi

Orta kulakta, östaki disfonksiyonu, inflamasyon veya morfolojik anomaliler sonucu negatif basınç oluşmasıyla kulak zarı içe doğru çöker ve bir retraksiyon poşu oluşur. Bu poşun girişinin kapanması ve keratin birikmesi ile kolesteatoma meydana gelebilir.

2.2.9.3.2. Migrasyon teorisi

Kulak zarının keratinize yassı epiteli, zarın bütünlüğünü bozan bir defekten orta kulağa geçer. Bu migratuar hücreler, proliferasyon olarak kolesteatoma dokusuna farklılaşabilir.

2.2.9.3.3. Skuamöz metaplazi teorisi

Bu teoriye göre orta kulaktaki non-keratinize mukozal epitel dokusu uzun süreli inflamasyona maruziyet sonucu keratinize yassı epitel dokusuna dönüşür. Metaplazik hücreler, inflamasyonun devam etmesiyle progrese olur ve kolesteatoma kitlesini oluşturabilir.

2.2.9.3.4. Bazal hücre hiperplazisi teorisi

Kulak zarının pars tensaya göre daha ince ve gevşek olan pars flaccida bölgesinde meydana gelen mikrokistler, bazal hücrelerde hiperplaziye neden olur ve kolesteatoma gelişimine zemin hazırlayabilir (Kuo, 2015).

2.2.9.4. Kolesteatoma etiopatogenezinde inflamasyonun etkisi

İnflamasyon, vücudun iskemi, infeksiyon, toksinler ve travma gibi dokusal hasara karşı verdiği cevaptır. İnflamasyonun normal şekilde seyretmesi için çok sayıda hücre, doku ve organ grubunun koordinasyonu ve karşılıklı kontrolü gerekmektedir. Bu koordinasyonun bozulduğu durumlarda immün yetmezliklerden otoinflammatuar hastalıklara, gastrointestinal bozukluklardan kardiyovasküler problemlere birçok sağlık sorunu ortaya çıkabilir. İnflamasyonun kolesteatoma dokusundaki varlığı farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Louw, 2010; Castle, 2017). Ek olarak, Baysal vd. tarafından yapılan bir çalışmada kolesteatoma hastalarının kanlarında oksidatif stres belirteçlerinin yüksek, antioksidan enzim aktivitesinin ise düşük olduğu saptanmıştır (Baysal vd., 2012). Oksidatif stres ve inflamasyon arasında sinerjistik bir ilişki bulunmaktadır. Vücutta artan oksijen radikalleri inflamasyonu tetiklerken bazı inflammatuar hücreler ise oksijen radikallerinin salınımını artırır.

TGF-beta, T hücre regülasyonu başta olmak üzere inflamasyon gelişiminde önemli bir role sahiptir. TGF-beta aracılıklı fibrozisin kolestatoma patogenezinde etkisi gösterilmiştir (Huisman vd., 2007). TGF-alfa ve TGF-beta, matriks keratinositlerinden

otokrin olarak salgılanarak epitel dokunun proliferasyonuna katkıda bulunur (Kuo, 2015). Sudhoff vd.'nin kolesteatoma dokusu üzerinde immünohistokimyasal yöntemle yaptığı araştırmada kolesteatoma perimatriksinde VEGF, FGF-2, TGF-alfa, ve TGF-beta1'in ekspresyon artışı izlenmiştir (Sudhoff vd., 2000). Bu alanda yapılacak çalışmalar, gelecekte özellikle TGF-beta'ya yönelik geliştirilen kemoterapotiklerin kolesteatoma tedavisine katkı sağlaması açısından önem arz etmektedir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) inflamasyonun birçok basamağında rol alan geniş bir proteinaz ailesidir (Fingleton, 2017). Kaya vd. tarafından yapılan çalışmada kolesteatomada MMP-2, -9, -10, -11, -13, -14, -15, -16 ekspresyonunun artışı, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genlerinin ekspresyonunun azalışı saptanmıştır (Kaya vd., 2020). MMPler farklı hücre tipleri tarafından salgılanabilmektedir. Bu enzimlerin aşırı ekspresyonu kemik destrüksiyonuna neden olarak kolesteatomanın daha agresif seyir izlemesine yol açar (Olszewska vd., 2004).

2.2.10. Kolesteatoma Oluşumunda Etkili Genetik Mekanizmalar

Son yıllarda genetik alanında meydana gelen gelişmeler sonucunda geniş çaplı genomik analizler yapılabilir hale gelmiştir. Bu durum kolesteatoma çalışmalarına da yansımıştır (Klenke vd., 2012). Kolesteatoma üzerinde uygulanan moleküler analizler kolesteatoma etiyopatogenezinde genetik bir mekanizmanın bulunabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, kolesteatoma dokusunda hücre siklus kontrolü, apoptozis, inflamasyona karşı cevap ve proliferasyonun kontrolü başta olmak üzere birçok hücre içi yolakta bozulmalar bildirilmiştir. Bunlardan başlıcaları şunlardır:

2.2.10.1 P53

P53 geni, hücre siklus kontrolü ve apoptozda çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Albino vd. tarafından yapılan çalışmada kolesteatoma dokusunda p53 ekspresyon artışı gözlenmiştir (Albino vd., 1998). Huisman vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise postauriküler epitele kıyasla kolesteatomada p53 ve p21 ekspresyonlarının artışı tespit edilmiştir (Huisman vd., 2003).

2.2.10.2 C-myc

C-myc proteinini kodlayan MYC geni, hücre büyümesi, DNA replikasyonu ve hücre siklus kontrolünde kritik roller üstlenen bir proto-onkogendir. Bu gen 8. kromozomun q24 bölgesinde lokalizedir. Yıldırım vd. tarafından FISH analizi kullanılarak yapılan bir çalışmada, kolesteatoma dokusunda 8 nolu kromozomun anöploidisi gösterilmiştir

(Yıldırım vd., 2003). MYC genine yönelik hazırlanan primerler kullanılarak yapılan yine FISH tabanlı başka bir çalışmada ise bu genin amplifikasyona uğradığı saptanmıştır (Öztürk vd., 2006). Genom bazında tespit edilen bu değişimler sonucu c-myc proteinin hücre içinde anormal artışı nedeniyle onkogenik aktivite göstermesi beklenir. Keza, Holly vd. tarafından immünohistokimya yöntemiyle yapılan çalışmada c-myc ekspresyon artışı kolesteatoma dokusunda gösterilmiştir (Holly vd., 1995).

2.2.10.3. EGFR/PI3K/Akt/cyclinD1 yolağı

EGFR/PI3K/Akt/cyclinD1 yolağı hücre siklusu ve hücre farklılaşmasında önemli role sahiptir. Bu yolakta meydana gelen bozukluklar küçük hücre dışı akciğer kanseri ve gliom başta olmak üzere çeşitli kanser türlerine neden olur (Lemmon vd., 2014).

Daha önceki çalışmalarda, EGFR, Akt, cyclinD1 ve PCNA ekspresyon seviyelerinin kolesteatomada yüksek olduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2013; Kaya vd., 2020). Liu vd. tarafından yapılan çalışmada dış kulak yolu epiteli EGF ile indüklenmiş ve EGFR/PI3K/Akt/cyclinD1 sinyal yolağının aktivasyonu sonucu hücrelerin proliferasyonu gözlenmiştir. Sonrasında, EGF ile aktive olmuş hücrelere uygulanan EGF inhibitörü AG1478 ve PI3K inhibitörü wortmanninin hücre proliferasyonunu durdurduğu saptanmıştır (Liu vd., 2013). Bu bulgular, farmakoterapötiklerin gelecekte kolesteatoma tedavisine katkıda bulunabilmesi açısından umut vericidir.

2.2.10.4. PTEN

PTEN, EGFR/PI3K/Akt yolağında inaktive edici etki gösterir. Yune ve Byun tarafından yapılan immünohistokimyasal çalışmada kolesteatoma dokusu ile retro-auriküler deri dokusu karşılaştırılmış ve kolesteatoma dokusunda PTEN ekspresyonunun azaldığı, aktif formdaki fosforile Akt(p-Akt)'nin arttığı saptanmıştır (Yune ve Byun, 2009). Bu durum, PTEN inaktivasyonunun kolesteatomada EGFR/PI3K/Akt yolak aktivasyonu ile benzer etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Friedland vd.'nin yaptığı başka bir çalışma ise kolesteatoma dokusunda insan mikroRNA-21'in artışı, PTEN ve PDCD4 ekspresyonunun azalışını tespit etmiştir (Friedland vd., 2009). Tüm bu bulgular göz önüne alındığında PTEN inaktivasyonunun kolesteatoma ile ilişkili olduğu görülmektedir.

2.2.10.5. MAPK yolağı

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ailesi, hücre siklusu, farklılaşması ve apoptozis gibi hücresel olaylarda önemli roller üstlenir. P38MAPK, extracelluar signal-regulated kinase (ERK)1/2, ve c-Jun N-terminal kinase (JNK), MAPK ailesinin üyeleridir.

Proinflatuar sitokinlerin hücre zarındaki reseptör kinazları uyarması sonucu P38MAPK, (ERK)1/2 ve JNK enzimleri aktive olur ve hücre içinde NF-kB ve diğer transkripsiyon faktörleri üzerinden hücre proliferasyonuna ve farklılaşmasına yol açarlar (Xie vd., 2016). NF-kB, hücre proliferasyonunda rol almasının yanında nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) üzerinden kemik rezorpsiyonuna da neden olur (Kawai vd., 2006). Kolesteatoma dokusunda retroauriküler deriye kıyasla P38MAPK, (ERK)1/2 ekspresyonunda artış görülmektedir (Huisman vd., 2006; Kim ve Jung, 2004). Bunun yanında, NF-kB'nin ekspresyon artışı da kolesteatoma dokusunda bildirilmiştir (Liu vd., 2014). Bu bulgular göz önüne alındığında, hücre içi veya hücre dışı etkenler nedeniyle kolesteatomada bazı MAPK enzimlerinde aktivite artışı olduğu anlaşılmaktadır.

2.2.10.6. IL-6/JAK/STAT3 yolağı

IL-6, JAK/STAT yolağında etkili proinflatuar bir sitokindir. Hücre zarındaki reseptöre bağlanan IL-6, STAT3 aktivasyonuna yol açar. Aktif STAT3; NF-kB, cyclinD1, survivin, Bcl-2, ve vascular endothelial growth factor (VEGF) üzerinden hücre proliferasyonuna neden olur. Kolesteatoma dokusu üzerinde yapılan çalışmalarda IL-6/JAK/STAT3 yolağının aktivasyonu gösterilmiştir (Liu vd., 2014; Xie vd., 2016).

2.2.10.7. Sitogenetik değişimler

Şimdiye kadar adı geçen moleküler değişimlere ek olarak literatürde sitogenetik anomalilerin tespit edildiği yayınlar da mevcuttur. Yukarıda bahsedildiği gibi 8 nolu kromozomun anöploidisi kolesteatomada bildirilmiştir (Yıldırım vd., 2003). Lavezzi vd. nin yaptığı başka bir çalışmada ise kolesteatoma dokusunda trizomi 7 varlığı ve trizomi 7'li olgularda normal kromozom kuruluşuna sahip (öplid) vakalara kıyasla proliferatif aktivitenin artışı gösterilmiştir (Lavezzi vd., 1998). Dokudan yapılan sitogenetik analizlerin zorluğu nedeniyle literatürde bu alanda yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır. Yeni nesil moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla bu bariyer aşılabilir ve daha farklı sitogenetik değişimlerin tespiti mümkün olabilir.

2.3. Kolesteatoma ve Kanser İlişkisi

Yukarıda bahsedilen, kolesteatomada bildirilen gen, yolak ve sitogenetik temelli anomalilerin çoğunlukla kanser oluşumunda da önemli role sahip olması kolesteatoma ve kanser patogeneğinde benzer öğeler bulunabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, invazyon, migrasyon, kontrolsüz proliferasyon, farklılaşma bozukluğu, agresif seyir, osteoliz ve nüks, hem kolesteatoma hem de neoplazilerin ortak özellikleridir (Albino vd.,

1998; Kuo, 2015). Ayrıca, kolesteatoma ve orta kulak karsinomunun birlikteliğiyle ilgili literatürde bildirilmiş vakalar bulunmaktadır (Lewis, 1973; Westerman vd., 1981; Kenyon vd., 1985; Takahashi vd., 2005; Rothschild vd., 2009).

Kolesteatoma ve kanser arasındaki tüm bu benzerlikler ve klinik bildirimler göz önüne alındığında bu iki olgunun aralarındaki ilişkinin araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, kanserin karakteristik özelliklerinin bilinmesi, konunun ayrıntılı biçimde işlenebilmesini kolaylaştıracaktır.

2.4. Kanserın Karakteristik Özellikleri

Neoplazik hastalıkların daha bütüncül anlaşılabilmesi adına Hanahan ve Weinberg tarafından 2000 yılında kanserin karakteristik özellikleri öne sürülmüştür. Bu yayında kanserin altı karakteristik özelliği: proliferatif sinyalin devamlılığı, büyüme baskılayıcılarından kaçış, hücre ölümüne karşı direnç, replikatif ölümsüzlük, anjiogenezin indüklenmesi, ve invazyon ve metastazın aktivasyonu olarak belirtilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bu karakteristik özellikler, bilimsel camiada genel kabul görmüştür. 2011 yılında, aynı yazarlar tarafından bu özelliklere enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün yıkımdan kaçış eklenmiştir. Ayrıca, genomik instabilite ve inflamasyon zemin hazırlayıcı özellikler olarak belirtilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2011) (Şekil-3). Bu özelliklere kısaca bakılacak olursa;

2.4.1. Proliferatif Sinyalin Devamlılığı

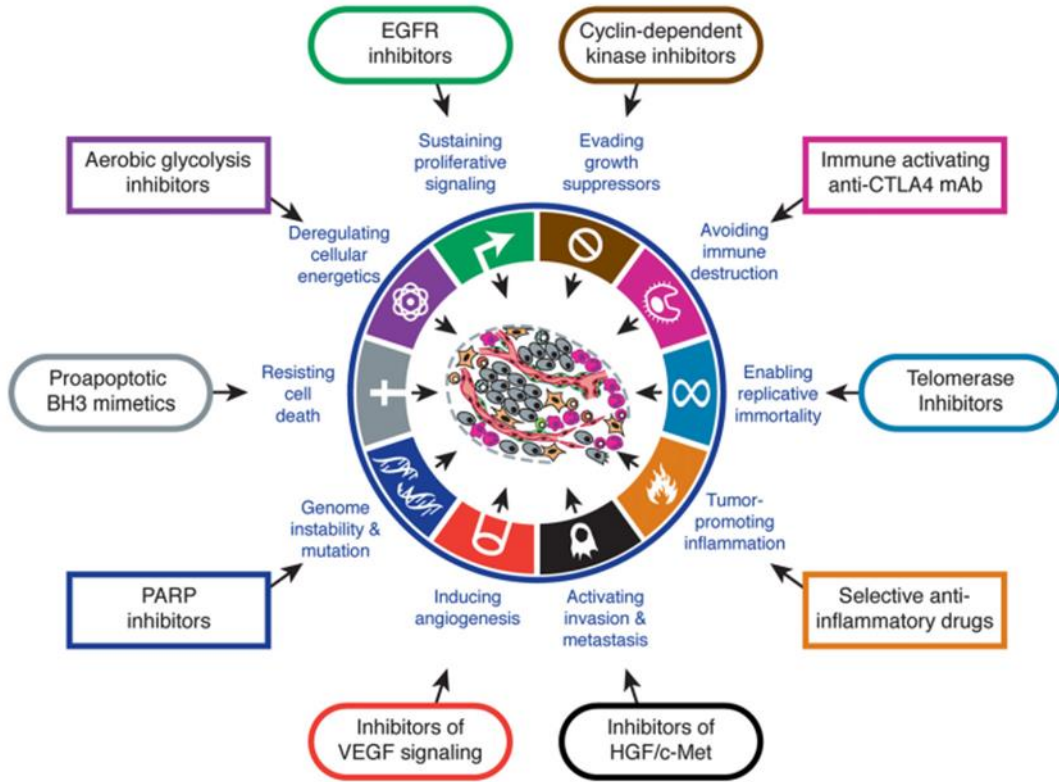
Normal dokudaki hücre bölünmesi sıkı bir kontrol altındadır. Dokudaki hücre bölünmesinin tetikleyicisi çoğunlukla büyüme faktörleridir. Büyüme faktörlerinin reseptörleri hücre yüzeyinde bulunur ve çoğunlukla hücre içi tirozin kinaz özellikleri sayesinde çekirdeğe kadar ulaşan mitotik yolları aktive ederler. Ortamda büyüme faktörlerinin artışı, hücre yüzeyindeki reseptörlerin artışı veya reseptörlerin ligand bağımsız aktivasyonu sonucu kontrolsüz proliferasyona zemin hazırlanır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.4.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış

Tümör supresör genler hücre siklusunda kritik role sahiptirler. Bunların başında “genomun gardiyanı” olarak adlandırılan TP53 ve RB genleri gelir. Ayrıca, NF2 gibi kontakt inhibisyon yoluyla hücre bölünmesinin önlenmesi de büyüme baskılayıcı mekanizmalardan biridir. Birçok neoplazide büyüme baskılayıcılarının birinde veya daha fazlasında fonksiyon kaybı gözlenir (Hanahan ve Weinberg, 2011)..

2.4.3. Hücre Ölümüne Karşı Direnç

Apoptozis, organizmanın neoplaziye karşı savunmasındaki en önemli mekanizmalarından biridir. Apoptozis sayesinde DNA hasarına uğrayan hücrelerin bölünerek devamlılığını sağlaması önlenmiş olur. TP53 foksiyonunun kaybı veya Bcl-2 gibi antiapoptotik faktörlerin ekspresyonunun artışı veya Bax, Bim, Puma gibi proapoptotik faktörlerin downregulasyonu apoptozisi engelleyerek hücrenin ölümsüzlük kazanmasına katkı sağlar (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2. 17: Kanserin karakteristik özellikleri ve bunlara yönelik geliştirilen tedaviler (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.4.4. Replikatif Ölümsüzlük

Normal hücrelerde her bölünme sonrası kısalan telomerler, neoplazik hücrelerdeki artmış telomerez aktivitesi sayesinde uzunluğunu korur. Böylece neoplazik hücreler apoptozise uğramadan genomik bütünlüğünü koruyarak sınırsız olarak bölünebilir.

2.4.5. Anjiogenezin İndüklenmesi

Kazandığı sınırsız bölünme kabiliyeti sayesinde büyüyen neoplazik doku tüm dokularda olduğu gibi vaskülarizasyona ihtiyaç duyar. Çoğu tümörde hücrelerin artan metabolik ihtiyaçları için gerekli olan vaskülarizasyon vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), EGFR, TGF-beta ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi anjiogenik faktörlerin aktivitesindeki artışla mümkün olur (Ferrara, 2009; Baeriswyl ve Christofori, 2009; Fukudome vd., 2013).

2.4.6. İnvazyon ve Metastaz

Büyüyen tümöral dokudan kaynaklanan neoplazik hücrelerin vücudun diğer bölgelerine ulaşabilmesi için sistemik dolaşıma erişmesi ve sonrasında vasküler bariyeri aşarak normal dokuya kolonize olması gerekir. Bu kabiliyeti kazanan tümörlerde doku mimarisinin bozulduğu ve özellikle karsinomlarda hücrelerin epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçirdiği gözlenmiştir (Klymkowsky ve Savagner, 2009). Doku mimarisini sağlamada adezyon molekülleri önemli bir yer tutar. Özellikle CDH1 geninin kodladığı E-cadherin epitel doku yapısının devamlılığını sağlar. E-cadherin ekspresyonundaki azalma karsinomların invazyon ve metastazına katkı sağlar (Berx ve van Roy, 2009). Ayrıca, CTNNB1 geninin kodladığı beta-catenin de benzer bir fonksiyona sahiptir (Peifer, 1993).

2.4.7. Enerji Metabolizmasının Yeniden Programlanması

Neoplazik hücrelerde metabolizmanın glikoliz lehine değişimi ilk defa Warburg tarafından keşfedilmiştir (Warburg, 1956). Onkogen aktivasyonu ve tümör supresör gen deaktivasyonunda glikolizin artması da yine yüksek bölünme hızına sahip hücrelerde enerji metabolizmasının oksidatif fosforilasyondan glikoliz lehine kaydığını göstermektedir (DeBerardinis vd., 2008; Jones ve Thompson, 2009). Ayrıca, glikoliz yolağında rol alan izositrat dehidrogenaz enzimini kodlayan IDH1 ve IDH2 genlerinin aktivite artışına yol açan mutasyonların da kanser patogenezindeki etkisi gösterilmiştir (Yen vd., 2010). Bu genlerdeki patojenik değişimler hem santral sinir sistemi tümörlerine ve hem de hepatobiliyer kansere neden olmaktadır (Yan vd., 2009).

2.4.8. İmmün Yıkımdan Kaçış

Organizmanın neoplazi ile mücadelesi sadece hücre içine sınırlı değildir. İmmün sistem de adaptif ve humoral komponentleri ile neoplazik hale gelmiş hücrelerin eradikasyonu veya sınırlandırılmasında önemli bir role sahiptir. İmmün sistemin neoplaziye karşı mücadelesinde en önemli rolü CD8+ sitotoksik T ve NK hücreleri oynar. İmmünkompetan

bireylerde gelişen kanserlerde immün yıkımdan kaçış tümör dokusunun evolüsyonu açısından önemli bir basamak teşkil etmekte ve tedavi açısından yeni yöntemlerin yolunu açmaktadır.

2.4.9. Genomik İnstabilite

Kanser, ister herediter ister sporadik olsun patogeneze açısından genetik bir hastalıktır. Hücrenin neoplazik hale gelebilmesi için yukarıda belirtilen karakteristik özelliklerle ilişkili fizyolojik mekanizmaların bozulması gerekir. Bu mekanizmaların bozulması tümör supresör genlerin fonksiyon kaybı, proto-onkogenlerin aktivitesinin artması veya kontakt inhibisyonu sağlayan genlerin ekspresyonunun azalması gibi genetik anomaliler nedeniyle oluşur. Genetik anomaliler oluşum şekillerine göre geniş bir spektrum arzederler. Tek nükleotid değişimleri bunun en sık gözlenen ve tipik bir örneğidir. Bunun dışında delesyon veya duplikasyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler, ve epigenetik değişiklikler kanser patogenezinde rol alabilir.

Kanser hücresinin uzun yılları kapsayan evolüsyonu esnasında birçok fizyolojik yolağın bozulması gerekir. Bu bozulmalar genetik veya epigenetik değişimler sonucu oluşur. Normal bir DNA replikasyonunda her 10 milyon baz çiftinde (bç) bir yeni mutasyon meydana gelir. Ancak bu değişimlerin büyük bir kısmı DNA tamir mekanizmaları sayesinde düzeltilir ve her bir bç için hücre bölünmesi başına bir mutasyondan daha düşük (1×10^{-10}) seviyelere kadar indirilir (Nussbaum vd., 2016). Tamir edilemeyen mutasyonların çoğunluğu ise genomun kodlanmayan bölgelerindedir ve genellikle fizyolojik bir etkileri olmaz. DNA tamir genlerinde meydana gelen fonksiyon kayıplarıyla beraber replikasyon esnasında oluşan değişimler düzeltilemez ve katlanarak artar. Normal bir hücrede böyle bir durumda TP53 geninin kontrolü altında hücre bölünmesi durur ve tamirin mümkün olmaması halinde hücre apoptozise gider. Ancak çoğu kanserde olduğu gibi TP53 geninin fonksiyon kaybında hücre bu kabiliyetini kaybeder ve bölünme yeni mutasyonlarla tamamlanır. TP53'ün fonksiyon kaybı nedeniyle her replikasyonda yeni mutasyonlar birikerek sonraki hücrelere aktarılır. Bu şekilde genomik stabilitesini kaybeden hücreler çok daha hızlı bir şekilde neoplazik değişimlere uğrayabilirler. DNA tamirinde etkili başka bir gen grubu ise BRCA1 ve BRCA2 genleridir. Bu genler DNA tamiri, hücre siklus kontrolü ve genomun stabilitesinde önemli bir role sahiptir (Wang vd., 2009). BRCA1 ve BRCA2'deki patojenik değişimler meme, over, prostat, ve pankreas kanserlerine yakalanma riskini yüksek oranda artırır (Miki vd., 1994; Petrucelli vd., 2020).

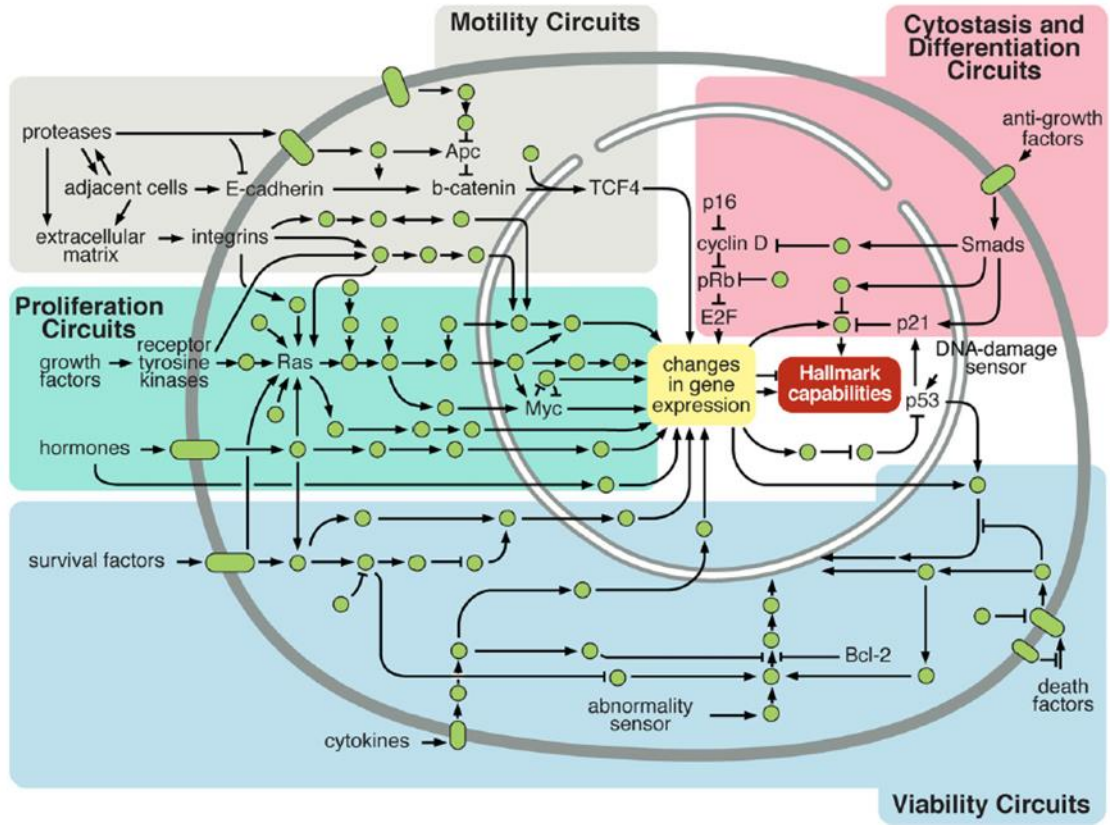
Genomun stabilitesini bozan diğerk bir faktör ise telomer bölgelerinin kısalmasıdır. Bu durumda kromozomal yeniden düzenlenmeler daha kolay oluşur ve bazı kanser türlerinde çok sık gözlenen translokasyon, delesyon, duplikasyon ve diğerk sitogenetik anomaliler meydana gelir.

2.4.10. İnflamasyon

İnflamasyon, tümör mikroçevresinde neoplazinin gelişimini kolaylaştırıcı etki yapmasının yanında açığa çıkan oksijen radikalleriyle mutagenesi de arttırmaktadır (Grivennikov, Greten ve Karin, 2010). Ortaya çıkan radikallerin yol açtığı somatik değişimler, kanser patogeneğinde etkili genlerde fonksiyon kaybı veya kazanımına neden olarak tümör evolusyonunu kolaylaştırır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Yukarıda bahsedilen “kanserin karakteristik özellikleri” katı maddeler silsilesi olmaktan ziyade yeni gelişmelerle şekillenen dinamik bir şablondur. Bu şablonun ana amacı kanserin patogeneğini daha iyi anlamak ve tedavi edici yöntemleri geliştirebilmektir. Adı geçen 10 karakteristik özellik birçok sinyal yolağı ve gen üzerinden birbirleriyle bağlantılıdır ve hücre ve doku bazında girift bir ağ oluşturur (Şekil 2.18).

Kolesteatoma oluşumunda etkili genetik mekanizmalar başlığı altında değerlendirilen gen ve yolaklar ile kanserin karakteristik özellikleri bölümünde incelenen genlerin arasındaki benzerlikler göz önüne alındığında bu iki olgunun ortak genetik patogeneğ mekanizmalarına sahip olabileceğı düşünülebilir. Literatüre bakıldığında kolesteatoma ile tümör supresör genler ve onkogenler arasındaki ilişki üzerine yapılan araştırmaların yetersiz olduğu görölmektedir. Çalışmamız bu alandaki boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır.



Şekil 2. 18: Hücre içi ve hücreler arası yolların birbirleriyle etkileşimi (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.5. Araştırmada Yer Alan Neoplazi İlişkili Genler

Belirtildiği üzere, kolesteatoma üzerinde şimdiye kadar yapılmış genetik temelli çalışmaların sonuçları ile kanserin karakteristik özellikleri ve bu özelliklerin ortaya çıkmasında etkili olan genetik bozukluklar arasında benzerlikler bulunmaktadır. Çalışmamızda, bu durumu aydınlatmak amacıyla neoplazi patogenezinde etkisi bilinen genlerdeki nükleotid değişimleri kolesteatoma dokusunda değerlendirilmiştir. Bu kapsamda analizi yapılan genler şunlardır:

ABL1 geni hücre büyümesi, farklılaşması, bölünmesi ve apoptozunda görevli tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proto-onkogendir (Sawyers vd., 1994). ABL1 geninin aktivasyonu ile karakterize değişimler hematolojik neoplazilerde gösterilmiştir (McWhirter vd., 1993).

AKT1 geni hücre içi protein kinaz kodlayan bir protoonkogendir (Manning ve Toker, 2017). Bu gendeki patojenik değişiklikler Cowden sendromu, meme kanseri, kolorektal kanser, endometrium ve ovaryan kanserlerle ilişkilendirilmiştir.

ALK tirozin kinaz reseptörü kodlayan bir protoonkogendir ve küçük hücre dışı akciğer kanseri ve nöroblastoma ile ilişkilendirilmiş (Hallber ve Palmer, 2013).

APC geni Wnt sinyal yolağı üzerine inhibitor etkili bir tümör baskılayıcı gendir. APC geninin ayrıca hücre migrasyonu, adezyon, kromozom segregasyonu ve apoptoz üzerine de etkinliği bildirilmiştir (Hanson ve Miller, 2005). APC genindeki patojenik varyantlar ile kolesteatoma ilişkisi ile ilgili literatürde bildirilmiştir (Shaoul vd., 1999).

ATM geni, fosfatidilinositol-3 kinaz ailesine mensup DNA tamiri ve hücre siklus kontrolünde görevli bir protein kodlar. ATM geninin homozigot germline patojenik varyantları ataksi telenjektazi kliniğine yol açar. Ayrıca, ATM genindeki patojenik varyantlar lenfoma ve meme kanseri ile de ilişkilendirilmiştir (Vorechovsky vd., 1997; Stredrick vd., 2006).

BRAF, akciğer adenokanseri, kolorektal kanser, tiroid kanseri, ve melanoma ile ilişkili, RAS-MAP kinaz yolağında etkili bir protoonkogendir (Wellbrock vd., 2004).

BRCA1 ve BRCA2 genleri; DNA tamiri, hücre siklus kontrolü ve genomun stabilitesinde önemli bir role sahiptirler (Wang vd., 2009). BRCA1 ve BRCA2'nin patojenik varyantları meme, over, prostat, ve pankreas kanserlerinin patogeneziyle doğrudan ilişkilidir (Miki vd., 1994; Petrucelli vd., 2020).

CDH1 geni epitel hücre adhezyonunda önemli bir rolü olan E-cadherin proteinini kodlar. CDH1 geni patojenik varyantları herediter diffüz gastrik kanser, endometrial karsinom, over kanseri ve tübüler tip meme kanserinde tespit edilmiştir (Frebourg vd., 2006; Risinger vd., 1994; Berx vd., 1995).

CDKN2A geni p16 ve p14 proteinlerini kodlar. p16, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü olarak görev alırken p14, p53'ü stabilize eden MDM2'ye bağlanır (Robertson ve Jones, 1999). CDKN2A geni malign melanom ve pankreas kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Binni vd., 2010; Harink vd., 2012).

CSF1R geni koloni stimulan faktör 1(CSF1) reseptörünü kodlar. Bu gendeki patojenik değişimler meme kanseri ve hematolojik neoplaziler ile ilişkilendirilmiştir (Morandi vd., 2011; Chase vd., 2009).

CTNNB1 geni hücre adezyonunda görevli beta-catenin proteinini kodlar ve bu protein yoluyla hücre çoğalması ve kontakt inhibisyonunda görev alır (Peifer, 1993). Bu gendeki bozuklukların kolorektal kanser (İlyas vd., 1997) ve hepatoblastomaya yol açtığı bildirilmiştir (Koch vd., 1999).

DLC1 geni 8. kromozomda lokalizedir. Bu gendeki patojenik değişimler kolorektal kanser ve hepatoselüler karsinomda gözlenmiştir (Yuan vd., 1998; Wilson vd., 2000).

EGFR geni reseptör tirozin kinaz fonksiyonuna sahip bir proteini kodlar ve küçük hücre dışı akciğer kanseri ve gliom gibi birçok kanserle ilişkilidir (Lemmon vd., 2014).

ERBB2 ve ERBB4 genleri mesane kanseri, meme kanseri ve endometrial kanser gibi birçok kanserle ilişkili protoonkogenlerdir (Lee-Hoeflich vd., 2008; Das vd., 2010).

ESR1 geni östrojen reseptör alfa isimli transkripsiyon faktörünü kodlar ve meme kanseri başta olmak üzere çeşitli neoplazilerde rol oynar (Merenbakh-Lamin vd., 2013).

FBXW7 geni siklin E ile etkileşime girerek hücre bölünmesinin regülasyonunda görev alan bir tümör supresör gendir. Endometrial kanser ve kolorektal kanser başta olmak üzere bazı kanser türlerinde bu gendeki fonksiyon kaybı gösterilmiştir (Tong vd., 2017).

FGFR1 geni fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1'I kodlar. Bu reseptör MAP-kinaz ve fosfotidilinositol-3-kinaz(PI3-kinaz) yolları üzerinden birçok dokuda hücre büyümesi ve bölünmesinin kontrolünde görev alır. Bu gendeki patojenik değişimler akciğer, meme, prostat ve baş-boyun kanserleri başta olmak üzere birçok neoplazide izlenmektedir (Zhang vd., 2006).

FGFR2 genindeki patojenik değişimler birçok kraniosinotoza sebep olmakla beraber hepatobiliyer kanser, endometrial kanser ve gastrik kanserde de bu gendeki değişimler gösterilmiştir (Wein vd., 2017).

FGFR3 geni diğer fibroblast büyüme faktörü reseptörleri ile benzer biyolojik etkilere sahiptir. Bu gendeki fonksiyon kazanımı ile karakterize değişimler mesane kanseri ve multipl myelom başta olmak üzere birçok kanser türünde bildirilmiştir (Bernard-Pierrot vd., 2006; Keats vd., 2006).

FTSJ3 geni RNA metilasyonunda görev alır. Bu gendeki bozukluklar meme kanserli hastalarda gözlenmiştir (Manning vd., 2020).

GNA11 ve GNAQ genleri kodladıkları farklı G-protein alt üniteleriyle hücre içi sinyal iletiminde görev alırlar. Bu genlerdeki patojenik değişimler melanomada gösterilmiştir (Van Raamsdonk vd., 2010; O'Hayre vd., 2013).

GNAS geni hücre içi sinyal yollarında görev alır ve endokrin neoplaziler ile McCune-Albright sendromu ile ilişkilendirilmiştir (O'Hayre vd., 2013).

HNF1A, karaciğere spesifik bir transkripsiyon faktörünü kodlar (Odom vd., 2004). Bu gendeki bozukluklar hepatoselüler adenom, endometrial kanser ve kolorektal kanserde gösterilmiştir (Bluteau vd., 2002).

HRAS GTPaz aktivitesine sahip bir protein kodlar. HRAS genindeki fonksiyon kazandıran değişimler mesane kanseri ve tiroid kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Prior vd., 2012).

IDH1 ve IDH2 genleri izositrat dehidrogenaz enzimini kodlarlar. Bu genlerdeki patojenik varyantlar santral sinir sistemi tümörlerinde ve hepatobiliyer kanserde bildirilmiştir (Yan vd., 2009).

JAK2 eritrosit ve trombosit üretiminde görev alan tirozin kinaz aktivitesine sahip janus kinaz 2'yi kodlar (Parganas vd., 1998). Bu gendeki patojenik değişimler myeloproliferatif hastalıklar ve çeşitli neoplazilerde saptanmıştır (Thomas vd., 2015).

JAK3 geni STAT ve MAP-kinaz yollarında etkili janus kinaz 3'ü kodlar. Bu gendeki değişimler çoğunlukla hematolojik olmak üzere çeşitli neoplazilerde gösterilmiştir (Bergmann vd., 2014).

KCNB2, 20. kromozomda lokalizedir ve voltaj bağımlı potasyum kanalı Kv2.1'i kodlar. Bu gendeki bozukluklar özellikle kolorektal kanser olmak üzere gastrointestinal sistem kanserleri ile ilişkilendirilmiştir (Barbirou vd., 2020).

KDR geni VEGFR2 olarak da bilinir ve kinaz domain reseptörünü kodlar. Bu protein angiogenezde rol alır. KDR geninde meydana gelen fonksiyon kazanımı ile karakterize değişimler melanoma ve endometrium kanserinde bildirilmiştir (Chakravarty vd., 2017).

KIT geni kodladığı tirozin kinaz reseptöründe meydana gelen fonksiyon kazanıcı değişimler ile gastrointestinal stromal tümör (GIST), germ hücreli tümör, ve akut myeloid lösemiye neden olan major bir protoonkogendir (Rubin vd., 2001).

KRAS geni MAP-kinaz ve fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3-kinaz) yollarında etki gösteren mesane, meme, pankreas, kolorektal ve akciğer kanserlerinde etkisi tanımlanmış bir protoonkogendir (Stephen vd., 2014).

MET, tirozin kinaz ailesine mensup bir protoonkogendir. Bu gendeki fonksiyon kazanımı, ekspresyon artışı veya amplifikasyon ile karakterize değişimler küçük hücre dışı akciğer kanseri ve renal hücreli karsinoma neden olmaktadır (Tsao vd., 1998)

MLH1, DNA mismatch tamirinde görevli önemli bir gendir. Bu gende bozukluğa sahip tümörlerde mikrosatellit instabilitesi gözlenir. Özellikle kolon, mide ve endometrium kanserleri olmak üzere birçok malignitede saptanmaktadır (Peltomaki vd., 1993).

MYC, hücre siklusunun regülasyonunda görevli önemli bir transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir (Dang, 2012). Bu gendeki bozukluklar non-Hodgkin lenfoma ve baş-boyun tümörlerinde bildirilmiştir (Chakravarty vd., 2017).

MYCN geni, MYC geni ile aynı aileye mensuptur. Bu gendeki patojenik varyantlar özellikle nöral kökenli tümörler başta olmak üzere birçok solid doku tümöründe gözlenebilir (Schwab, 2004).

NOTCH1, hücre-hücre sinyal iletiminde rol alan transmembran bir protein kodlar (Ntziachristos vd., 2014). Bu gendeki fonksiyon kazandırıcı değişimler hematolojik malignansilerde, fonksiyon kaybettiren değişimler ise baş boyun karsinomlarında gözlenmektedir (Ferrarotto vd., 2017; Nyman vd., 2018).

NRAS geni MAP-kinaz ve PI3-kinaz yollarının kontrolünde etkili bir GTPaz kodlar (Gupta vd., 2011), bu gendeki patojenik değişiklikler tiroid kanseri, melanoma ve hematolojik kanserlerde gösterilmiştir (Stephen vd., 2014).

NRXN1 geninin kodladığı protein sinapslarda nörotransmisyonunda görev alan Ca(2+) bağımlı neurexin/neurologin kompleksinin yapısına katılır (Reissner vd., 2008). Bu gendeki değişimler gastrik kanserde bildirilmiştir (Park vd., 2016).

PDGFRA, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa1 kodlar. Bu reseptör RAS-MAP-kinaz ve PI3-kinaz yolları üzerinden hücre çoğalmasını sağlamaktadır

(Demoulin ve Essaghir, 2014). Bu genin onkojenik aktivasyonu ile karakterize değişimler GIST, melanoma ve glioblastomada gösterilmiştir (Battochio vd., 2010; Dai vd., 2013; Ozawa vd., 2010).

PIK3CA geni, hücre çoğalmasında görevli fosfotidilinositol-3-kinazın katalitik alt ünitesini kodlar. Fosfotidilinositol-3-kinaz yolağı kanser gelişiminde rol alan ana yollardan biridir. PIK3CA genindeki patojenik varyantlar birçok kanser türünde gösterilmiştir (Bader vd., 2005).

PTEN, PI3-kinaz yolağı ve DNA tamiri üzerine etkili bir tümör supresör gendir (Cantley, 2002; Bassi vd., 2013; Pezzolesi vd., 2007). Bu genin fonksiyonunu bozan varyantlar birçok kanserde gösterilmiştir (Sansal ve Sellers, 2004). Ayrıca PTEN genindeki germline patojenik değişiklikler tiroid, meme ve endometrium kanserleri ile ilişkili Cowden sendromuna sebep olmaktadır (Liaw vd., 1997).

PTPN11 birçok hücre içi sinyal yolağının regülasyonunda görevli bir tirozin fosfatazdır (Chan vd., 2008). Bu gendeki germline bozukluklar Noonan ve LEOPARD sendromuna yol açmaktadır. Somatik olarak PTPN11 geninin patojenik varyantları juvenil lösemilerde bildirilmiştir (Tartaglia vd., 2006).

RB1 geni hücre siklus kontrolünde önemli bir yere sahiptir (Weinberg, 1995). RB1 geninde fonksiyon bozukluğuna sebep olan varyantlar retinoblastoma, küçük-hücreli akciğer kanseri ve mesane kanserinde tespit edilmiştir (Horowitz vd., 1990).

RBAK, RB1 ile etkileşime girerek oluşan proteinin fonksiyonuna katkı sağlamaktadır (Skapek vd., 2000). Bu gendeki bozukluklar küçük hücre dışı akciğer kanserinde gösterilmiştir. (He vd., 2019).

RET, MAP-kinaz ve PI3-kinaz yolları üzerinde etkili bir proto-onkogendir. Hücre yüzeyinde bulunan RET reseptör tirozin kinazının ekspresyon artışı çeşitli sitogenetik yeniden düzenlenmeler veya fonksiyon kazanımı ile sonuğlanan tek nükleotid değişimleri sonucunda meydana gelebilir. Bu gendeki germline değişimler çoklu endokrin neoplazilere sebep olurken somatik bozuklukları ise papiller tiroid kanser ve akciğer adenokarsinomunda saptanmaktadır (Mulligan, 2014). Kim ve Jung tarafından yapılan çalışmada, kolestatoma dokusunda RET geminin ekspresyon artışı saptanmıştır (Kim ve Jung, 2004).

ROS1, küçük hücre dışı akciğer kanseri, gastrik karsinom ve kolanjiokarsinom başta olmak üzere birçok neoplazide fonksiyon kazanımı gösterilmiş bir protoonkogendir (Bergethon vd., 2012; Lee vd., 2013; Gu vd., 2011).

SMAD4 geni TGF- β ve BMP1 proteinlerinin sinyal iletiminde rol oynar (Davis vd., 2008). Bu gendeki patojenik değişiklikler, juvenil polipozis sendromuna yol açmaktadır (Howe vd.,1998).

SMARCB1 kromatin remodellemesinde önemli bir role sahiptir (Wang vd., 2017). Bu gendeki bozukluklar meningioma başta olmak üzere birçok neoplazide gözlenmektedir (Christiaans vd., 2011).

SMO, embriyonal ve nöral gelişimde rol alan hedgehog sinyal yolağında görevlidir (Briscoe vd., 2013). Bu gendeki bozukluklar bazal hücreli karsinom ve medullablastomda bildirilmiştir (Bonilla vd., 2016).

SMURF1, Smad ubiquitin regulatuar faktör 1 proteinini kodlar. Bu protein E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile proteinlerin ubiquitinizasyonunda ve degradasyonunda görev alır. Bu gendeki değişimler akciğer kanserinde gösterilmiştir (Li vd., 2017)

SRC geni hücre bölünmesi, büyümesi ve migrasyonunda görevli bir non-reseptör tirozin kinazı kodlar (Roskoski Jr, 2015). Bu gendeki bozukluklar kolorektal kanser ve meme kanserinde bildirilmiştir (Wheeler vd., 2009).

SSFA2, KRAS ile etkileşime girerek hücre bölünmesi ve apoptozunda rol alır. Bu gendeki değişimler glioma hastalarında saptanmıştır (Zhu vd., 2019).

STK11 geni hücre enerji metabolizması ve polaritesinde görevli bir serin-treonin kinaz kodlar (Xu vd., 2013). Bu protein ayrıca, p53 aracılı apoptozun kontrolünde de görev alır (Karuman vd., 2001). STK genindeki bozukluklar Peutz-Jeghers sendromuna sebep olmaktadır (Jenne vd., 1998).

TP53 geni en önemli tümör supresör genlerden biridir. Bu genin kodladığı p53 proteini tümör baskılayıcı etkiye sahiptir ve hücre siklusunda, DNA tamirinde, apoptoz üzerinde ve hücre içindeki birçok yolda etkinliğe sahiptir. TP53 geninin patojenik varyantları birçok kanser türünde tespit edilmiştir (Yue vd., 2017).

VHL geninin kodladığı p30 ve p19 proteinleri mikrotübül stabilizasyonu, tümör supresyonu ve sitokin sinyal yollarının kontrolü gibi birçok önemli role sahiptir

(Nordstrom-O'Brien vd., 2010). Bu gendeki patojenik değişiklikler von Hippel-Lindau sendromunun yanında izole hemanjioblastom (Kanno vd., 1994) ve kongenital polisitemide de bildirilmiştir (Pastore vd., 2003).

ZNF594 geni, çinko parmak 594 proteinini kodlar. Bu gendeki patojenik varyantlar endometrium kanserinde bildirilmiştir (Grossman vd., 2016).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma prospektif klinik çalışmadır.

3.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı

Araştırmamızın hasta grubu 2020-2021 yıllarında Konya ve çevre illerden Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi (NEÜMTF) Kulak Burun Boğaz kliniğine başvuran hastalardan oluşmaktadır.

3.3. Araştırma Evreni ve Yeri

Araştırmamızın evreni NEÜMTF Kulak Burun Boğaz kliniğinde, kolesteatoma tanısı nedeniyle opere edilen hastaları içermektedir. Araştırma sürecinde yapılan genetik analizler NEÜMTF Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi moleküler laboratuvarında çalışılmıştır.

3.4. Örneklem Seçme Kriterleri

- Otoskopik muayene veya radyolojik görüntüleme ile kolesteatoma tanısı almış olmak
- Klinik bulgular ve radyolojik görüntülemeler sonucunda cerrahi rezeksiyon endikasyonu almış olmak
- Araştırmaya katılmaya gönüllü olmak

Tablo 3. 1: Hasta Grubu Özellikleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet
H-1	43	K
H-2	65	E
H-3	37	E
H-4	60	K
H-5	28	E
H-6	36	K
H-7	53	K

H-8	38	E
H-9	18	E
H-10	35	K
H-11	27	E
H-12	31	E
H-13	23	E
H-14	45	K
H-15	38	E

3.5. Araştırma Öncesi Bilgilendirme

Örneklem seçme kriterlerini karşılayan hastalara araştırmanın konusu ile ilgili genel bilgiler ve araştırma ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir. Araştırmada kolesteatoma dokusundan kanser ilişkili genlere yönelik DNA dizi analizi yapılacağı, yapılacak analizde kolesteatoma rezeksiyonu esnasında rutin olarak çıkarılan dokuların kullanılacağı ve araştırma için hastaya herhangi bir ek cerrahi işlem uygulanmayacağı anlatılmıştır. Araştırmanın uzmanlık tezi olarak projelendirildiği ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce finanse edildiği anlatılmıştır. Yapılan bilgilendirme sonrası araştırmaya katılmaya gönüllü olan hastalara bilgilendirilmiş gönüllü onam formu okutulmuş ve onayladıklarına dair imzaları alınmıştır (Ek-1).

3.6. Araştırmanın İzni ve Etik Durum

NEÜMTF etik kuruluna araştırma öncesinde gerekli belgeler sunulmuş ve araştırmamız 05.06.2020 tarihli 2020/2581 sayılı kararla etik kurul onayı almıştır (Ek-2, Ek-3).

3.7. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.7.1. Kullanılan Cihazlar:

- Yeni Nesil Dizileme cihazı (İllumina Miniseq)
- PZR cihazı (Thermo Fisher Scientific SimpliAmp Thermal Cycler)
- Mikrosantrifüj (Biosan)
- 4°C buzdolabı (Beko)

- -20°C soğutucu (Regal®)
- -80°C soğutucu (New Brunswick U570)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- Otomatik mikropipetler
- Vorteks karıştırıcı
- Kuru ısı bloğu
- Rotatör

3.7.2. Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler:

- DNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics High Pure PCR Template Preparation Kit) (Tablo 3.2)
- Yeni nesil dizileme kiti (Celegics Solid Tumor Kit) (Tablo 3.3)
- KAPA kütüphane amplifikasyon karışımı (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Kaliforniya, ABD)
- RPMI 1640 besiyeri (Lonza)
- İzopropanol
- %80'lik etanol
- PZR kartuşu
- Steril, filtreli pipet uçları
- Filtre tüpü
- Toplama tüpleri
- Eppendorf tüpleri
- ddH₂O, nükleaz içermeyen saf, steril su
- 15 ml'lik falkon tüpleri

Tablo 3. 2: DNA İzolasyon Kiti İçeriği

Kit İçeriği	Kullanılan Miktar (Her Bir Örnek İçin)
Yıkama tamponu	1000 µl
Proteinaz K	40 µl
Bağlama tamponu	200 µl

İnhibitör uzaklaştırma tamponu	500 µl
Lizis tamponu	200 µl
Elüsyon tamponu	200 µl

Tablo 3. 3: Yeni Nesil Dizileme Kiti İçeriği

Kit İçeriği	Kullanılan Miktar (Her Bir Örnek İçin)
dsDNA fragmentaz	1 µl
fragmentaz tamponu	1 µl
Celemics DNA saflaştırma boncukları	260 µl
10x ERA tampon	5 µl
5x ER/A-Tailing enzim karışımı	10 µl
Adaptör	10 µl
Ligasyon reaksiyon karışımı	40 µl
USER enzimi	3 µl
PZR indeks primer	5 µl
Master karışımı	30 µL
Block karışımı	5.6 µL
Hibridizasyon tamponu	25 µL
Capture kütüphane karışımı	7 µL
Streptavidin boncuk	50 µL
Yıkama tamponu #1	800 µL
Yıkama tamponu #2	500 µL
Yıkama tamponu #3	2000 µL
Capture sonrası PZR forward primeri	2.5 µL
Capture sonrası PZR reverse primeri	2.5 µL

3.8. Doku Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Araştırmaya katılmaya karar veren gönüllülerden kolesteatoma rezeksiyonu esnasında rutin olarak çıkarılan kolesteatoma dokusu ve normal doku RPMI 1640 (Lonza, Verviers,

Belçika) besiyeri içeren tüplere alındı ve NEÜMTF Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi bünyesinde -80°C’de DNA izolasyonu yapılmak üzere saklandı.

3.9. DNA İzolasyonu

İlk aşamada, DNA eldesini arttırmak için RPMI 1640 besiyerinde saklanan örneklerden yaklaşık 25 mg doku alınarak bistüri yardımıyla steril ortamda manuel olarak küçük parçalara ayrıldı. Sonrasında High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak aşağıdaki işlemler uygulanarak DNA izolasyonu yapıldı:

- Parçalanmış dokular 1,5 ml’lik steril, nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- 200 µl lizis tamponu ve 40 µl proteinaz K çözeltisi, örnek üzerine eklendi, 16 saat boyunca 55°C’de inkübasyonda bırakıldı.
- 200 µl bağlama tamponu eklendi, 70°C’de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- 100 µl izopropanol eklendi ve 1 ml’lik pipet ucuyla çözünmemiş parçacıklar ayrıldı.
- Geriye kalan sıvı, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş filtre tüpüne aktarıldı, 1 dakika boyunca 8.000 g’de santrifüj edildi.
- Filtre tüpü, toplama tüpünden alındı. Toplama tüpünde kalan süzölmüş sıvı atıldı. Filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklendi. 1 dakika boyunca 8.000 g’de santrifüj edildi.
- Filtre tüpü, toplama tüpünden alındı. Toplama tüpünde kalan süzölmüş sıvı atıldı. Filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl yıkama tamponu eklendi. 1 dakika boyunca 8.000 g’de santrifüj edildi. Bu işlem bir defa daha tekrarlandı.
- Filtre tüpü, toplama tüpünden alındı. Toplama tüpünde kalan süzölmüş sıvı atıldı. Filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 11.000 g’de 10 saniye santrifüj edildi.
- Filtre tüpü, toplama tüpünden alındı. Toplama tüpünde kalan süzölmüş sıvı atıldı. Filtre tüpü, 1,5 ml’lik steril, nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 65 °C’de ısıtılmış 200 µl elüsyon tamponu eklendi. 1 dakika boyunca 8.000 g’de santrifüj edildi.
- Filtre tüpü, mikrosantrifüj tüpünden alındı ve atıldı.

DNA saflık kontrolü:

- İzole edilen DNA'nın kalitesi Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) cihazı ile değerlendirildi.
- 260/280 ve 260/230 nm nükleik asit saflık oranları normal sınırlarda saptandı (sırasıyla 1.7-2.0 ve 2.0-2.2).

3.10. Yeni Nesil Dizileme

3.10.1 DNA Fragmentasyonu

- Nükleik asit saflık oranları yeterli görülen DNA'dan 8 µL alınarak üzerine, 1 µL dsDNA fragmentaz (Celemics, Seul, Güney Kore) ve 1 µL fragmentaz tamponu (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- 37°C'da 25 dakika inkübe edildi.

3.10.2. Saflaştırma

- Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) ile fragmente edilen DNA 1.8:1 oranında 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- Vorteks ve spin edildikten sonra 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi.
- Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant alınarak atıldı.
- Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi.
- 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı.
- Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi.
- Spin edildi ve etanolün kalanı atıldı.
- 2 dakika boyunca oda ısısında bekletildi.
- 37 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Tüpler tekrar manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi.
- Süpernatant çekilerek PZR tüpüne alındı.

3.10.3. Uç tamiri ve A-tailing

- 5 µl 10x ERA tampon (Celemics, Seul, Güney Kore) ve 35 µl saflaştırılmış DNA PZR tüpüne alındı.
- 10µL 5x ER/A-Tailing enzim karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) tüplere eklendi.

- Tüpler spin edildi ve 4°C deki termal cycler a alındı ve Tablo 3.4'te belirtilen döngü uygulandı.
- PZR bittiğinde tüpler buz üzerine alındı.

Tablo 3. 4: Uç tamiri ve A-tailing PZR Protokolü

Adım	Sıcaklık °C	Süre
1	4	1 dk
2	20	30 dk
3	65	30 dk
4	4	Dur

3.10.4. Adaptör Ligasyonu

- 10 µL Adaptör (Celemics, Seul, Güney Kore), PZR tüplerindeki uç tamiri ve A-tailing yapılmış DNA üzerine eklendi.
- 40 µL ligasyon reaksiyon karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- 20°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi.
- 3 µL USER enzimi (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.

3.10.5. Saflaştırma

- Adaptör ligasyonu yapılan DNA üzerine 100 µL Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Vorteks ve spin sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi.
- Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant atıldı.
- Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi.
- 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı.
- Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi.
- Spin yapıldı ve etanolün kalanı atıldı.
- 2 dakika oda ısısında bekletildi.
- 32 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi.

- Süpernatant çekilerek PZR tüplerine alındı.

3.10.6. Amplifikasyon

- 15 µL Adaptör ligasyonu yapılmış DNA üzerine, 5 µL PZR İndeks Primer (Celemics, Seul, Güney Kore) ve 30 µL Master karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi ve spin edildi.
- PZR tüpleri PZR cihazına (Thermo Fisher Scientific, SimpliAmp Thermal Cycler) yerleştirildi ve Tablo 3.5'deki daki protokol uygulanarak amplifikasyon yapıldı.

Tablo 3. 5: PZR Protokolü

İşlem	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı	Analiz modu
Denatürasyon	98	45 sn	1	Polimeraz aktivasyonu
Amplifikasyon	98	15 sn	10	Denatürasyon
	65	30 sn		Bağlanma
	72	60 sn		Uzama
Erime Eğrisi	72	10 dk	1	Özgüllük kontrolü
Soğutma	4	1 dk	1	

3.10.7. Saflaştırma

- Amplifiye edilen DNA'dan 50 µL 1.5 mL'lik tüpe alındı ve üzerine 50 µL Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Vorteks ve spin sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi.
- Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant atıldı.
- Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi.
- 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı.
- Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi.
- Spin yapıldı ve etanolün kalanı atıldı.
- 2 dakika oda ısısında bekletildi.
- 32 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi.

- Süpernatant çekilerek PZR tüplerine alındı.

3.10.8. DNA Saflık Kontrolü

- Saflaştırma işleminden sonra DNA'nın kalitesi Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) cihazı ile değerlendirildi.
- 260/280 ve 260/230 nm nükleik asit saflık oranları normal sınırlarda saptandı (sırasıyla 1.7-2.0 ve 2.0-2.2).

3.10.9. Hibridizasyon ve Yıkama

- Her bir kolonda 8 kuyucuk bulunan PZR kartuşunun ilk kolonundaki her bir kuyucuğa 5.6 µL Block karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Block karışımı eklenen kuyucuklara hazırlık basamakları tamamlanan ve kalite kontrolden geçen DNA'dan 3.4 µL eklendi ve pipetaj yapıldı.
- PZR kartuşu kapatıldı ve santrifüj edildi.
- Termal döngü cihazına konuldu ve 95°C sıcaklıkta 5 dakika bekletildikten sonra 65°C'ye getirildi.
- PZR kartuşunun ikinci kolonunun her bir kuyucuğa 65°C'de 5 dakika bekletilmiş Hibridizasyon Tamponundan (Celemics, Seul, Güney Kore) 25 µL eklendi.
- Kartuşun kapağı kapatılarak 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- PZR kartuşunun ikinci kolonunun her bir kuyucuğa 7 µL Capture kütüphane karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Kartuşun kapağı kapatılarak 65°C'de 2 dakika inkübe edildi.
- Kartuşun ikinci kolonundaki Hibridizasyon Tamponundan 16'şar µL çekilerek üçüncü kolondaki kuyucuklara eklendi ve pipetaj yapıldı.
- PZR kartuşunun birinci kolonundaki DNA'dan 9'ar µL çekilerek üçüncü kolondaki kuyucuklara eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Kartuşun kapağı kapatılarak 65°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.10.10. Streptavidin Boncuk Solüsyonunun Hazırlanması

- 1,5 mL'lik tüpe 50 µL streptavidin boncuk (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Tüpe, 200 µL yıkama tamponu #1 (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Vortekslendikten sonra tüp manyetik ayrıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı.
- Önceki iki basamak işlem iki kez tekrar edildi.
- Tüpe, 200 µL yıkama tamponu #1 eklenerek 250 µL'ye tamamlandı.

3.10.11. Target Captured Kütüphanenin Seçilmesi

- Hibridizasyon basamağından elde edilen DNA'yı içeren karışım 65°C'ye getirildi ve hazırlanan 250 µL streptavidin boncuk solüsyonu içeren 1,5 mL'lik tüplerin üzerine eklendi.
- Elde edilen solüsyon 30 dakika rotatörde karıştırıldı ve sonrasında spin edildi.
- Tüpler, manyetik ayrıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı.
- Manyetik ayrıştırıcıdan alınan tüplere 500 µL yıkama tamponu #2 (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Vorteklendikten sonra spin edildi.
- 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Tüpler, manyetik ayrıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı.
- 500 µL 70°C'ye ısıtılmış yıkama tamponu #3 (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Vortekslendi ve spin edildi.
- 10 dakika boyunca 70°C'deki ısı bloğunda inkübe edildi.
- Tüpler, manyetik ayrıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı.
- Yıkama tamponu #3 ile yıkama işlemi (önceki dört basamak) üç kez tekrarlandı.
- Tüplere 30 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi.
- Vortekslendi ve spin edildi.

3.10.12. Captured Kütüphanenin Amplifikasyonu

- 0.2 mL'lik PZR tüpüne 15 µL On-beads Captured DNA, 5 µL nükleaz içermeyen saf su, 2.5 µL Capture sonrası PZR forward primeri (Celemics, Seul, Güney Kore), 2.5 µL Capture sonrası PZR reverse primeri (Celemics, Seul, Güney Kore), ve 25 µL KAPA kütüphane amplifikasyon karışımı (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Kaliforniya, ABD) eklendi.
- PZR tüpleri PZR cihazına (SimpliAmp Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD) yerleştirildi ve Tablo 3.6'daki protokol uygulanarak amplifikasyon yapıldı.

Tablo 3. 6: Captured Kütüphane PZR Protokolü

İşlem	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı	Analiz modu
Denatürasyon	98	45 sn	1	Polimeraz

				aktivasyonu
Amplifikasyon	98 60 72	15 sn 30 sn 60 sn	16	Denatürasyon Bağlanma Uzama
Erime Eğrisi	72	10 dk	1	Özgüllük kontrolü
Soğutma	4	1 dk	1	

3.10.13. Saflaştırma

- Amplifiye edilen DNA'dan 50 µL 1.5 mL'lik tüpe alındı ve üzerine 90 µL Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi.
- Vorteks ve spin sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi.
- Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant atıldı.
- Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi.
- 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı.
- Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi.
- Spin yapıldı ve etanolün kalanı atıldı.
- 2 dakika oda ısısında bekletildi.
- 32 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Tüpler manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi.
- Süpernatant çekilerek PZR tüplerine alındı.

3.10.14. DNA Saflık Kontrolü

- Saflaştırma işleminden sonra DNA'nın kalitesi Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) cihazı ile değerlendirildi.
- 260/280 ve 260/230 nm nükleik asit saflık oranları normal sınırlarda saptandı (sırasıyla 1.7-2.0 ve 2.0-2.2).

3.10.15. Kütüphanenin Dizilenmesi

- Kalite kontrolü yapılan amplifiye edilmiş kütüphane, köprü PZR tabanlı yeni nesil dizileme yöntemiyle çalışan Illumina Miniseq Platformu (Illumina, San Diego, Kaliforniya, ABD)'na yüklendi.

- Dizileme esnasında ortaya çıkan optik görüntülerden dönüştürülen FASTQ formatındaki veri setleri elde edildi.

3.11. Veri Analizi

FASTQ formatındaki veri setlerine GRCh37(h19) referans genomu üzerinden SEQ (Genomize, İstanbul, Türkiye) platformu kullanılarak hizalama yapıldı. Bu işlem sonrasında elde edilen BAM formatındaki dizi verileri Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.8.6 (Robinson vd., 2011) programı kullanılarak değerlendirildi. Okumaların, genlerin tüm ekzonlarını ve ekzon-intron bileşkelerini x20 okuma derinliğinde kapladığı kontrol edilerek doğrulandı. Referans genomdan farklı olan varyantlar IGV 2.8.6. programı üzerinden kontrol edilerek doğrulandı. Germline değişimler için allel fraksiyonu %35-65 arası olan varyantlar heterozigot, >%65 olan varyantlar homozigot olarak kabul edildi. Somatik değişimlerde allel fraksiyonu >%5 olan varyantlar pozitif olarak değerlendirildi. Tespit edilen varyantlar, İnsan Genom Varyasyon Cemiyeti (HGVS) Dizi Varyantı Adlandırma (den Dunnen vd., 2016) kurallarına uygun olarak isimlendirildi.

3.12. Varyant Sınıflandırma

Belirlenen varyantların popülasyon frekansları, gnomAD (Karczewski vd., 2020), TOPMed Bravo, GME Variome (Scott vd., 2016) popülasyon veritabanları üzerinden değerlendirildi. Ayrıca Clinvar ve COSMIC veritabanlarından tespit edilen varyantlar ile ilgili daha önceden bildirilmiş klinik bilgiler tarandı. Bu veri tabanlarında herhangi bir klinik veri bulunmayan varyantlar için olası klinik ve/veya fonksiyonel yayınlar açısından varyanta özel literatür taraması yapıldı. Ayrıca, tespit edilen varyantlar in-siliko analiz algoritmalarında değerlendirildi. Missense değişimler için: SIFT (Sim vd., 2012), PolyPhen2 (Adzhubei vd., 2010), FATHMM (Shibab vd., 2013), DANN (Quang vd., 2015), REVEL (Ioannidis vd., 2016); splicing varyantları için SpliceAI (Jaganathan vd., 2019), ve dbSCNV (Jian ve Liu, 2017) kullanıldı. Elde edilen veriler eşliğinde tespit edilen varyantlar, Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu (ACMG) tarafından belirlenen standartlara (Richards vd., 2015) uygun şekilde “benign”, “muhtemel benign”, “önemi bilinmeyen varyant”, “muhtemel patojenik” veya “patojenik” olarak sınıflandırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

Araştırma grubundaki hastalar 18-65 yaş arasında olup yaş ortalaması 38,46 idi. Hastaların %40'ı (n=6) kadın, %60'ı (n=9) erkekti.

Tablo 4. 1: Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve kolesteatoma yerleşim durumu

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Kolesteatoma Yerleşimi
H-1	43	K	BİLATERAL
H-2	65	E	SAĞ
H-3	37	E	SOL
H-4	60	K	SOL
H-5	28	E	SOL
H-6	36	K	SOL
H-7	53	K	SAĞ
H-8	38	E	SOL
H-9	18	E	SOL
H-10	35	K	SOL
H-11	27	E	BİLATERAL
H-12	31	E	SOL
H-13	23	E	SOL
H-14	45	K	SOL
H-15	38	E	SAĞ

4.2. Tespit Edilen Dizi Analizi Varyantları

Hastalarda 3 somatik, 12 germline olmak üzere 15 farklı varyant tespit edildi. Tespit edilen varyantlar ACMG standartlarına (Richards vd., 2015) uygun olarak sınıflandırıldı. 12 germline varyantın biri muhtemel patojenik, 9'u önemi bilinmeyen varyant ve 2'si

muhtemel benign olarak sınıflandırıldı. 3 somatik varyantın biri muhtemel patojenik, ikisi önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirildi (Şekil 4).



Şekil 4. 1: Tespit edilen dizi analizi varyantlarının dağılımı

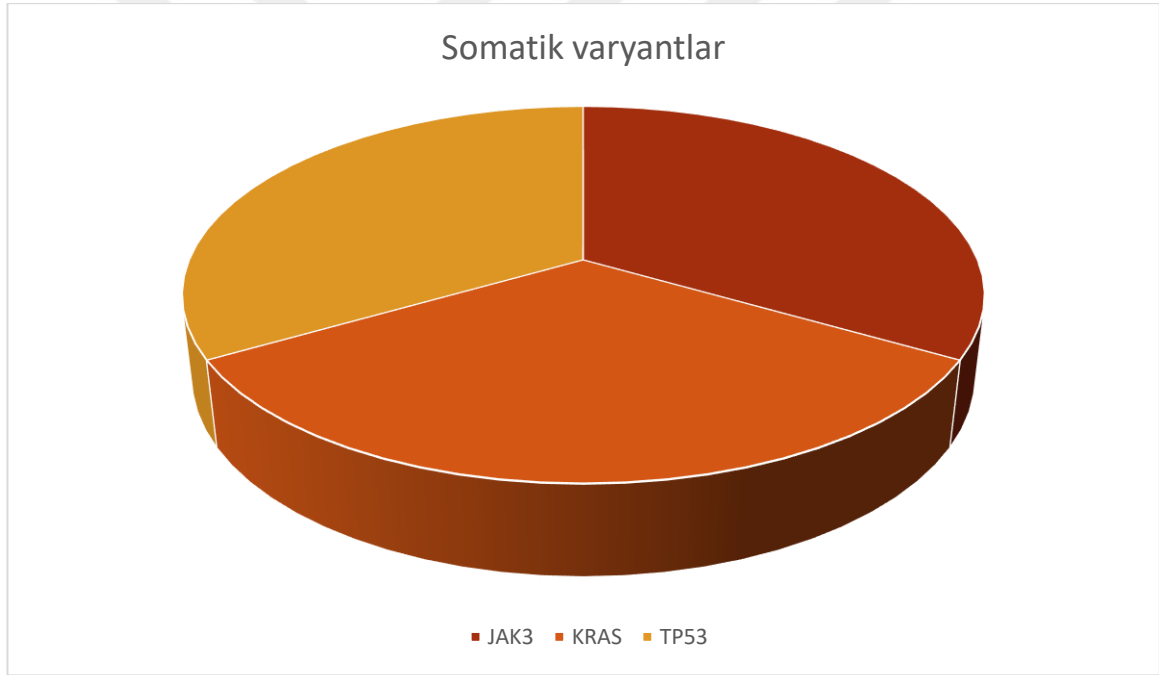
4.2.1. Somatik Varyantlar

H-6'nın kolesteatoma dokusunda JAK3 geninde %8 oranında missense c.2164G>A (ENST00000458235.1)/p.Val722Ile (ENSP00000391676.1) değişimi saptandı. Varyant sınıflandırma aşamasında önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

H-8'in kolesteatoma dokusunda TP53 %10 oranında c.284delC (ENST00000269305.4)/p.Ser95PhefsTer28 (ENSP00000269305.4) çerçeve kayması değişimi saptandı. Yapılan ileri biyoinformatik analizler sonucu muhtemel patojenik olarak sınıflandırıldı. Yine H-8'de KRAS geni c.377A>T (ENST00000256078.4)/p.Asp126Val (ENSP00000256078.4) varyantı kolesteatoma dokusunda %5 oranında tespit edildi ve önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı (Tablo 4.2, Şekil 4.2).

Tablo 4. 2: Tespit Edilen Somatik Varyantlar

Hasta No	Gen Adı	Varyant Koordinatı	Protein Koordinatı	Allel Fraksiyonu	dbSNP ID	Varyant Tipi	Varyant Sınıflandırması
H-6	JAK3	ENST00000458235.1 c.2164G>A	ENSP00000391676.1 p.Val722Ile	%8	rs3213409	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-8	TP53	ENST00000269305.4 c.284delC	ENSP00000269305.4 p.Ser95PhefsTer28	%10	-	Frameshift	Muhtemel Patojenik
H-8	KRAS	ENST00000256078.4 c.377A>T	ENSP00000256078.4 p.Asp126Val	%5	-	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant



Şekil 4. 2: Somatik varyantların gen bazında dağılımı

4.2.2. Germline Varyantlar

H-2’de VHL geni c.5C>T (ENST00000256474.2)/p.Pro2Leu (ENSP00000256474.2) varyantı hem kolesteatoma dokusunda, hem de normal dokuda heterozigot olarak tespit edildi. Sınıflandırma aşamasında önemi bilinmeyen varyant olarak belirlendi. Aynı hastada JAK2 geninde c.2674C>G (ENST00000381652.3)/ p.Leu892Val (ENSP00000381652.3) değişimi de her iki dokuda da heterozigot olarak saptandı. Yapılan analizler sonucu önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

H-3 nolu hastada MYCN c.1093C>G (ENST00000281043.3)/ p.Pro365Ala (ENSP00000281043.3) missense değişimi hem kolesteatoma dokusunda hem de normal dokuda heterozigot olarak tespit edildi. Sınıflandırma basamağında muhtemel benign olarak yorumlandı.

H-4'te üç farklı varyant saptandı bunlar sırasıyla BRCA2 c.6550C>G (ENST00000544455.1)/ p.Gln2184Glu (ENSP00000439902.1); APC c.3653C>T (ENST00000457016.1)/ p.Thr1218Met (ENSP00000413133.1); SMO c.704C>T (ENST00000249373.3)/ p.Ala235Val (ENSP00000249373.3) varyantları idi. Her üç varyant da kolesteatoma ve normal dokuda heterozigot olarak görüldü ve sınıflandırma aşamasında önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirildi.

H-9 nolu hastada ROS1 c.5942delC (ENST00000368508.3)/ p.Thr1981IlefsTer2 (ENSP00000357494.3) çerçeve kayması değişimi her iki dokuda da heterozigot olarak görüldü. İleri analizler sonucu bu varyant, muhtemel patojenik olarak sınıflandırıldı.

H-10'da SMAD4 geninde splicing bölgeyi etkileyen c.424+5G>A (ENST00000342988.3) değişimi hem kolesteatoma hem de normal dokuda heterozigot olarak tespit edildi. Yapılan analizler neticesinde önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

H-12 nolu hastada BRCA2 geninde iki farklı varyant her iki dokuda da heterozigot olarak saptandı. Bunlardan c.6131G>C (ENST00000544455.1)/ p.Gly2044Ala (ENSP00000439902.1) değişimi muhtemel benign, c.5386G>T (ENST00000544455.1)/ Asp1796Tyr (ENSP00000439902.1) ise, önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

H-14'te STK11 c.1225C>T (ENST00000326873.7)/ p.Arg409Trp (ENSP00000324856.6) missense değişimi hem kolesteatoma hem de normal dokuda heterozigot olarak saptandı. Sonrasında yapılan analizlerde önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirildi.

H-15'de NOTCH1 c.4031C>T (ENST00000277541.6)/ p.Thr1344Met (ENSP00000277541.6) varyantı, hastanın her iki dokusunda da heterozigot olarak görüldü. Bu değişim, önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı (Tablo 4.3, Şekil 4.3).

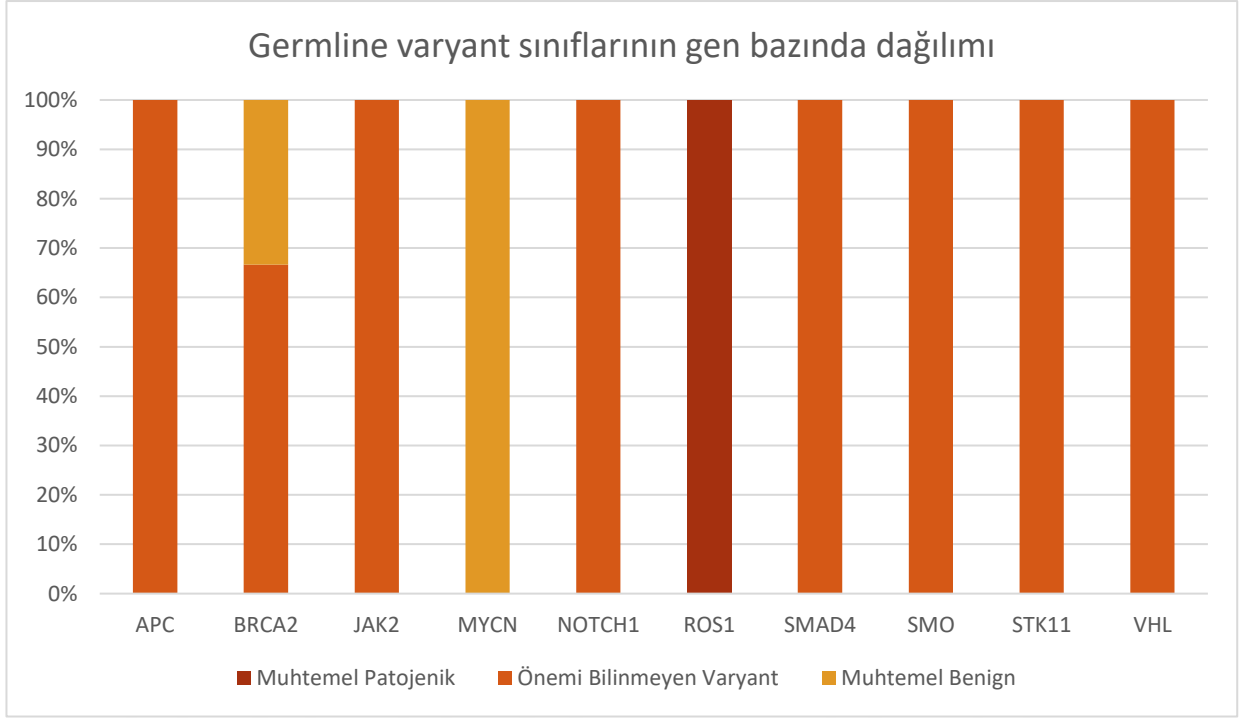
H-1, H-5, H-7, H-11 ve H-13 nolu hastalarda, varyant sınıflandırma kriterlerine göre herhangi bir patojenik, muhtemel patojenik veya önemi bilinmeyen varyant saptanmadı.

Hastalarda tespit edilen benign ve muhtemel benign varyantlar araştırmamız dışında tutulmuştur. Sadece H-3'deki MYCN c.1093C>G ve H-12'deki c.6131G>C değişimleri, sınıflandırma aşamasında muhtemel benign olarak belirlenmelerine rağmen olası klinik önemleri göz önüne alınarak tartışılan varyantlar arasına dahil edilmiştir.

Tablo 4. 3: Tespit Edilen Germline Varyantlar

Hasta No	Gen Adı	Varyant Koordinatı	Protein Koordinatı	Zigosite	dbSNP ID	Varyant Tipi	Varyant Sınıflandırması
H-2	VHL	ENST00000256474.2 c.5C>T	ENSP00000256474.2 p.Pro2Leu	Het	rs111246617	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-2	JAK2	ENST00000381652.3 c.2674C>G	ENSP00000381652.3 p.Leu892Val	Het	rs201551707	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-3	MYCN	ENST00000281043.3 c.1093C>G	ENSP00000281043.3 p.Pro365Ala	Het	rs140276895	Missense	Muhtemel Benign
H-4	BRCA2	ENST00000544455.1 c.6550C>G	ENSP00000439902.1 p.Gln2184Glu	Het	rs80358887	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-4	APC	ENST00000457016.1 c.3653C>T	ENSP00000413133.1 p.Thr1218Met	Het	rs377640390	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-4	SMO	ENST00000249373.3 c.704C>T	ENSP00000249373.3 p.Ala235Val	Het	rs142599757	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-9	ROS1	ENST00000368508.3 c.5942delC	ENSP00000357494.3 p.Thr1981IlefsTer2	Het	-	Frameshift	Muhtemel Patojenik
H-10	SMAD4	ENST00000342988.3: c.424+5G>A	-	Het	rs200772603	Splice Bölgesi	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-12	BRCA2	ENST00000544455.1 c.6131G>C	ENSP00000439902.1 p.Gly2044Ala	Het	rs56191579	Missense	Muhtemel benign
H-12	BRCA2	ENST00000544455.1 c.5386G>T	ENSP00000439902.1 p.Asp1796Tyr	Het	rs1064793715	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
H-14	STK11	ENST00000326873.7 c.1225C>T	ENSP00000324856.6 p.Arg409Trp	Het	rs368466538	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant

H-15	NOTCH1	ENST000000277541.6 c.4031C>T	ENSP000000277541.6 p.Thr1344Met	Het	rs201215245	Missense	Önemi Bilinmeyen Varyant
------	--------	---------------------------------	------------------------------------	-----	-------------	----------	--------------------------------



Şekil 4. 3: Germline varyant sınıflarının gen bazında dağılımı

5. TARTIŞMA

Kolesteatoma, orta kulak ve temporal kemikte yassı epitel çoğalması ile karakterize 100.000'de 4-12,6 arasında yıllık insidansa sahip progresif seyirli bir hastalıktır (Kemppainen vd., 1999; Aquino vd., 2011). Kolesteatoma, çevresindeki dokularda meydana getirdiği hasar sonucu ciddi morbidite ve mortaliteler ile sonuçlanabilecek komplikasyonlara neden olmaktadır.

Kolesteatoma, literatürde, histopatolojik açıdan benign olarak değerlendirilmesine rağmen kanser ile arasında önemli benzerlikler bulunmaktadır. İnvazyon, migrasyon, kontrolsüz proliferasyon, farklılaşma bozukluğu, agresif seyir, osteoliz ve nüks, bunlardan başlıcalarıdır (Albino vd., 1998; Kuo, 2015). Ek olarak, kolesteatoma ve orta kulak karsinomu birlikteliğini bildiren birçok yayın bulunmaktadır (Lewis, 1973; Westerman vd., 1981; Kenyon vd., 1985; Takahashi vd., 2005; Rothschild vd., 2009). Yapılan bilimsel araştırmalara ve ortaya atılan farklı teorilere rağmen kolesteatomanın etiyopatogeneziyle ilgili hala net bir resim ortaya konulamamıştır. Tüm bu veriler, bu alanda daha kapsamlı araştırmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Kanser, genel anlamda insanlığın karşılaştığı en kompleks hastalık olarak kabul edilebilir. Geçtiğimiz on yıllarda, genetik bilimindeki gelişmelere paralel olarak yaygınlaşan yeni nesil teknolojilerin getirdiği imkanlar sayesinde kanser patogenezinin kısmi de olsa aydınlatılmasıyla kanser tedavisinde devrim niteliğinde gelişmeler olmuştur. Bu nedenle, herhangi bir hastalıkta etiyopatogenezin anlaşılması kritik öneme sahiptir. Kanser özelinde Hanahan ve Weinberg'in ortaya koyduğu karakteristik özellikler neoplazilerin daha bütüncül anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Bu özellikler; proliferatif sinyalin devamlılığı, büyüme baskılayıcılarından kaçış, hücre ölümüne karşı direnç, replikatif ölümsüzlük, anjiogenezin indüklenmesi, invazyon ve metastaz, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, immün yıkımdan kaçış, genomik instabilite ve inflamasyon olarak sıralanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücrelerine bu özellikleri kazandıran, farklı sinyal yolları üzerinde etkili yüzlerce gen ve binlerce varyant bulunmaktadır (Vogelstein vd., 2013). Araştırmamızda, her biri kanser patogenezinde etkisi ispatlanmış 60 farklı onkogen ve tümör supresör gen kolesteatoma dokusunda normal dokuyla karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, üç farklı hastada kolesteatoma dokusunda saptanıp normal dokuda gözlenmeyen üç farklı değişim tespit edilmiştir. Bunlar JAK3 c.2164G>A (p.Val722Ile), TP53 c.284delC

(p.Ser95PhefsTer28), ve KRAS c.377A>T (p.Asp126Val)'dir. Bu değişimler aşıağıda ayrıntılı biçimde incelenmiştir:

JAK3

JAK3, tirozin kinaz etkili bir proto-onkogendir. Bu gendeki patojenik değişimler çoğunlukla hematolojik olmak üzere çeşitli neoplazilerde gösterilmiştir (Bergmann vd., 2014). JAK3 c.2164G>A varyantı valinden izolösine dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Proteinin 722. amino asitinde bulunan bu değişim JAK3'ün tirozin kinaz domaininde bulunur. Kolesteatoma dokusunda varyantın allel fraksiyonu %8 olarak saptandı ve somatik olarak kabul edildi. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.008382'dir ve homozigot olarak 21 bireyde gözlenmiştir. TOPMed Bravo veritabanındaki frekansı 0.007109'dur ve homozigot olarak iki kişide saptanmıştır. GME Variome veritabanında ise 0.01712 oranında bildirilmiştir ve homozigot olarak hiçbir bireyde görülmemiştir. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili beş germline iki somatik bildirim bulunmaktadır. Germline bildirimlerin ikisi benign, üçü muhtemel benign'dir. Somatik bildirimlerin ise ikisi de muhtemel patojeniktir. Bu varyant için yapılan in-siliko analizlerin ikisi patojenite (SIFT:0,03, DANN:0,98), üçü benign (FATHMM:0,06, REVEL:0,16, PolyPhen2:0,01) lehine sonuçlandı. Popölasyon frekansının yüksek olması, Clinvar'da benign ve olası benign germline bildirimlerin bulunması ve in-siliko analizlerin bir kısmının benign olarak sonuçlanması bu varyant açısından benign yönünde bulgulardır. Ancak varyant ile ilgili somatik bildirimlerin muhtemel patojenik olması ve in-siliko analizlerden ikisinin protein fonksiyonunu bozucu yönde sonuçlanması patojenite lehinedir. Tüm bu veriler dikkate alınarak bu değişim önemi bilinmeyen varyant olarak yorumlanmıştır.

JAK3 c.2164G>A varyantının sadece kolesteatoma dokusunda saptanması ve aynı vakaya ait normal dokuda görülmemesi dikkate değerdir. Patojenik germline JAK3 varyantları otozomal resesif ağır kombine immün yetmezliğe neden olmaktadır ve bildirilen patojenik varyantlar, fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Ama JAK3 genindeki onkogenik aktiviteye sahip varyantlar fonksiyon kazanımı ile karakterizedir. Bu gendeki fonksiyon kazanımına neden olan değişimlerin çoğunluğu genin protein psödokinaz bölgesinde lokalizedir (Degryse vd., 2014). MacConaill vd. (2014)'nin yaptığı, farklı tiplerdeki 5000 kanser hastasının tümör dokusundan 41 kanser ilişkili genin incelendiği çalışmada c.2164G>A (V722I) varyantı hastaların %2.67'sinde saptanmıştır. Ancak

çalışmada karşılaştırmalı analiz için normal doku verisi bulunmadığından tespit edilen varyantların somatik/germline ayırımı bulunmamaktadır. Başka bir çalışmada 91 pediatrik ALL vakasının 11'inde bu değişim gözlenmiştir (Yin vd., 2015). Walters vd. (2006), tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise JAK3 c.2164G>A değişiminin hematopoetik hücre hattında faktör bağımsız çoğalmaya neden olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada V722I mutant pro-B Ba/F3 hücre hattında faktör bağımsız aktivasyon saptanmış, JAK3 inhibitörü CP-690 550 uygulaması sonucunda ise faktör bağımlı büyümeye dönüş gözlenmiştir (Yin vd., 2015). Ayrıca, literatürde V722I ve PD-L1 tedavisine yanıt ile ilgili ilginç bir araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada Van Allen vd. (2015), anti-PD-L1 tedavisine yanıt veren akciğer adenokarsinomlu bir vakada germline heterozigot V722I değişimini tespit etmiş ve hastadan metastatik dokudan elde edilen DNA'da bu varyantın heterozigosite kaybını göstermiştir. Heterozigosite kaybı, özellikle herediter kanserler olmak üzere birçok kanser ilişkili genin neoplaziye yol açmasında önemli bir mekanizmadır. Heterozigot bir varyantın tümör dokusunda heterozigosite kaybının gösterilmesi varyantın patojenitesi yönünde önemli bir kanıttır. Ayrıca aynı çalışmada V722I değişiminin JAK3 proteininde otofosforilasyon ve otoaktivasyona yol açtığı ve PD-L1 ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Van Allen vd., 2015). Bu bulgular, anti-PD-L1 ajanların kanser tedavisindeki etkinliği düşünüldüğünde kolesteatomaya getirilecek farmakoterapötik çözümler açısından da umut vericidir.

Sonuç olarak, JAK3 c.2164G>A varyantının daha önce farklı neoplazilerde bildirilmiş olması ve JAK3 proteinin enzimatik aktivite gösteren bölgesinde bulunuyor olması patojenite ihtimalini güçlendirmektedir. Ancak varyantın kolesteatoma ile ilişkisinin netleşmesi için daha geniş örneklemli çalışmalara ihtiyaç vardır.

TP53

TP53, birçok kanser tipinde patojenik değişimi tespit edilen, kanser patogenezinde çok önemli bir tümör supresör gendir (Suzuki ve Matsubara, 2011). H-8'de tespit edilen TP53 c.284delC varyantı, çerçeve kaymasına neden olarak 28 kodon ilerisinde oluşan dur kodonu nedeniyle translasyonun erken sonlanmasına yol açar. Allel fraksiyonu %10 olarak saptanan varyant, somatik değişim olarak değerlendirildi. GnomAD, TOPMed ve GME Variome veritabanlarında bu değişim hiç bildirilmemiştir. Clinvar veritabanında ise bu varyant ile ilgili herhangi bir bildirim bulunmamaktadır. İn-siliko analizler, varyantın

neden olduğu kompleks protein değişimi nedeniyle uygulanamadı. Tüm bu veriler dikkate alınarak bu varyant muhtemel patojenik olarak yorumlandı.

Literatürde, TP53 ekspresyon artışı kolesteatoma dokusunda birden fazla çalışma ile gösterilmiştir (Albino vd., 1998; Huisman vd., 2003). Ancak bu çalışmalar ekspresyon temelli yapılmıştır ve TP53 genindeki değişimler incelenmemiştir. Ayrıca p53 upreglasyonunun kolesteatoma dokusundaki hiperproliferasyonun bir sonucu olarak oluştuğuna dair çıkarımlar farklı yayınlarda geçmektedir (Albino vd., 1998; Huisman vd., 2003; Olszewska vd., 2013). Dolayısıyla, TP53n gen bazındaki değişimler yönünden değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

Literatürde, TP53 fonksiyon kaybı veya bu gendeki dizi analizi varyantlarının kolesteatoma ile ilişkisini inceleyen bir yayın saptanmamıştır. TP53, kanserde en sık mutasyona uğrayan gendir (Suzuki ve Matsubara, 2011). Bu açıdan bakıldığında, kolesteatomada TP53 fonksiyon kaybının tespit edilmesi patogenezin aydınlatılmasına büyük katkı yapacaktır. Hastada bu değişimin saptanması kolesteatomada TP53 geninin olası fonksiyon kaybının gösterilmesi açısından bir ilktir. Ancak bu varyantın daha önce bildirilmemiş olması klinik öneminin anlamlandırılmasını zorlaştırmaktadır. Gelecekte, TP53 c.284delC varyantı özelinde yapılacak fonksiyonel analizler bu konuda daha net çıkarımların yapılabilmesini sağlayacaktır.

KRAS

KRAS, MAPK yolağı üzerinde etkili önemli bir proto-onkogendir. Bu gendeki patojenik değişimler mesane, meme, pankreas, kolorektal ve akciğer kanseri gibi birçok neoplazide bildirilmiştir (Stephen vd., 2014). H-8de TP53deki varyanta ek olarak, KRAS geninde aspartik asitten valine dönüşüme yol açan missense c.377A>T değişimi tespit edildi. Kolesteatoma dokusunda allel fraksiyonu %5 saptanan ve normal dokuda tespit edilmeyen bu varyant somatik olarak değerlendirildi. GnomAD, TOPMed ve GME Variome veritabanları tarandığında bu değişime dair bir veriye rastlanmamıştır. Aynı şekilde, Clinvar veritabanında da bu varyant ile ilgili herhangi bir bildirim bulunmamaktadır. Yapılan literatür taraması sonucunda bu varyantın sadece bir meme kanseri hastasında somatik olarak bildirildiği görülmektedir (Lefebvre vd., 2016). İn-siliko analizlerin ise ikisi patojenite (SIFT:0,01, DANN:0,98,),  benign (FATHMM:-1,07, REVEL:0,61, PolyPhen2:0,004) lehineydi. Bu veriler dikkate alınarak KRAS c.377A>T değişimi önemi bilinmeyen varyant olarak yorumlandı.

Kolesteatomada MAPK yolağı aktivasyonu farklı yayınlarda bildirilmektedir (Xie vd., 2016). Ancak şimdiye kadar bu aktivasyonun MAPK yolağındaki genetik değişimler ile ilişkisi incelenmemiştir. KRAS genindeki fonksiyon kazanımıyla giden değişimlerin birçok kanser tipindeki etkinliği bilinmektedir. Bu açıdan bakıldığında, kolesteatoma dokusunda tespit ettiğimiz somatik KRAS değişimi ekstra önem kazanmaktadır. KRAS c.377A>T varyantının literatürde bir meme kanseri vakasında somatik olarak bildirilmiş olması dikkate değerdir (Lefebvre vd., 2016). Fakat, bu değişim ile ilgili net bir çıkarım yapılabilmesi için yetersizdir. MAPK yolağını hedefleyen ilaçların kanser tedavisindeki etkinliği göz önüne alındığında bu alanda yapılacak yeni çalışmaların önemi daha da öne çıkmaktadır.

Çalışmamız, yukarıda tartışılan somatik değişimlerin yanı sıra değerlendirdiğimiz genlerdeki germline varyantlarla ilgili de yeni bulgular ortaya koymuştur. Bu varyantların daha ayrıntılı incelenmesi, literatüre yapacağı katkının yanında kolesteatoma genetiğinin aydınlatılmasına yardımcı olabilecektir. Hastalarda germline varyant bulduğumuz genler aşağıda belirtilmiştir:

VHL

VHL, protein degradasyonu, mikrotübül stabilizasyonu, ve sitokin sinyal yollarının kontrolü gibi birçok önemli role sahip bir tümör supresör genidir (Nordstrom-O'Brien vd., 2010). VHL aynı zamanda çeşitli transkripsiyon faktörleri ve VEGF gibi pro-anjiogenik faktörler üzerinden anjiogenezde de etkindir (Gossage vd., 2015). Çalışmamızda bir hastada heterozigot olarak saptanan VHL geni c.5C>T varyantı prolinden lösine dönüşüme neden olan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.00008179'dur ve homozigot olarak hiç tespit edilmemiştir. Ayrıca, TOPMed Bravo veritabanında iki kişide heterozigot olarak (0.000069) saptanan varyant, GME Variome veritabanında hiç görülmemiştir. Clinvar veritabanında ise bu varyant ile ilgili beş girdi bulunmaktadır. Bunların üçü önemi bilinmeyen varyant, ikisi muhtemel benigndir. Yapılan in-siliko analizlerin ise üçü patojenite (SIFT:0,02, FATHMM:-1,83, DANN:0,97), ikisi benign (PolyPhen2:0,01, REVEL:0,27) yönünde sonuçlanmıştır. Tüm bu veriler dikkate alınarak bu varyant önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirilmiştir.

Literatüre bakıldığında VHL ve kolesteatoma ilişkisinin incelendiği bir yayın saptanmıştır. Adunka vd. (2003) tarafından immünohistokimyasal boyama yöntemiyle

yapılan çalışmada kolesteatoma dokusunda VHL ve hypoxia inducible factor 1 (HIF1a) protein seviyelerinde artış olduğu görülmüştür. Sudhoff vd. (2000) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise kolesteatoma dokusunda VEGF'nin ekspresyon artışı bildirilmiştir. VEGF'nin hipoksi kaynaklı anjiogeneze HIF1a ve VHL ile ilişkisi düşünüldüğünde bu çalışmalar, kolesteatomada hipoksi aracılı anjiogeneze varlığını destekler niteliktedir. Bir hastada saptadığımız VHL c.5C>T varyantı ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu varyant ile ilgili yapılacak fonksiyon analizleri ve kolesteatoma özelinde yapılacak hastalık modellemeleri ile VHL geni ve kolesteatoma arasındaki ilişkinin aydınlatılması mümkün olabilir.

JAK2

JAK2, eritrosit ve trombosit üretiminde etkili tirozin kinaz aktivitesine sahip janus kinaz 2'yi kodlayan bir proto-onkogendir (Parganas vd., 1998). Bu gendeki fonksiyon kazanımıyla seyreden değişimler STAT yolağının aktivasyonu ile onkojenik etki göstermektedir (Babon vd., 2014). Bir hastada heterozigot olarak tespit ettiğimiz JAK2 geni c.2674C> varyantı, lösinden valine dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.0006562'dir ve bir kişide homozigot olarak saptanmıştır. TOPMed Bravo ve GME Variome veritabanlarında ise bu varyant, birer defa heterozigot olarak bildirilmiştir. Frekansları sırasıyla 0.000034 ve 0.000504'tür. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili tek bir bildirim bulunmaktadır ve muhtemel benign şeklindedir. Ek olarak, yapılan in-siliko analizlerin ikisi patojenite (FATHMM:-1,66, DANN:0,99), üçü benign (SIFT:0,22, PolyPhen2:0,65, REVEL:0,14) lehine sonuçlandı ve yukarıdaki veriler göz önüne alınarak bu varyant önemi bilinmeyen varyant olarak yorumlandı.

Literatüre bakıldığında, kolesteatoma dokusunda IL-6/JAK/STAT3 yolağının aktivasyonunu bildiren farklı yayınlar bulunmaktadır (Liu vd., 2014; Xie vd., 2016). Bunun yanında Eskiizmir vd. (2014) tarafından immünohistokimyasal boyama yöntemiyle yapılan bir çalışmada JAK-STAT yolağı proteinlerinin deri dokusuna kıyasla kolesteatoma dokusunda az eksprese edildiği ya da hiç eksprese edilmediği saptanmıştır. Kantitatif PZR temelli başka bir çalışmada ise orta kulak mukozası ve kolesteatoma dokusu karşılaştırılmış ve STAT5B'nin downregülasyonu saptanmış, ama JAK1, JAK2, JAK3, ve STAT5A ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Westerberg vd., 2021). Literatürdeki bu veriler değerlendirildiğinde JAK-STAT yolağı ve kolesteatoma

arasındaki ilişkinin net olarak aydınlatılmamış olduğu görülmektedir. Çalışmamızda bir hastada tespit edilen değişimin (p.Leu892Val), JAK2'nin kinaz bölgesinde bulunması patojenite ihtimalini artırmaktadır. Ancak, bu varyantın protein fonksiyonu üzerindeki etkisi bilinmediğinden kolesteatoma patogenezinde hangi yönde etkisi olabileceği tam olarak kestirilememektedir.

MYCN

MYCN, hücre döngüsü kontrolü ve apoptozda görevli önemli bir proto-onkogendir (Albihn vd., 2010). MYCN geni c.1093C>G varyantı prolinden alanine dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.000914'tür ve bir kişide homozigot olarak saptanmıştır. TOPMed Bravo ve GME Variome veritabanlarındaki frekansları ise sırasıyla 0.000309 ve 0.003021 şeklindedir. Ayrıca bu iki veritabanında da homozigot MYCN c.1093C>G taşıyıcısı bulunmamaktadır. Clinvar veritabanında ise bu varyant ile ilgili iki bildirim bulunmaktadır ve muhtemel benign şeklindedir. İn-siliko analizlerin biri patojenite (DANN:0,85), dördü benign (FATHMM:2,31, SIFT:0,55, PolyPhen2:0, REVEL:0,05) lehine sonuçlandı. Tüm bu veriler dikkate alınarak bu varyant muhtemel benign olarak yorumlandı.

Literatürde, MYCN geni ve kolesteatoma arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. MYCN ile aynı gen ailesine mensup olan MYC geni için ise durum farklıdır. Öztürk vd. (2006) tarafından kolesteatoma dokusunda yapılan FISH temelli çalışmada MYC geni amplifikasyonu bildirilmiştir. Bunun yanında, literatürde kolesteatoma dokusunda MYC geni ekspresyon artışının gösterildiği yayınlar bulunmaktadır (Holly vd., 1995; Palkó vd., 2014). MYC ve MYCN genlerinin aynı aileye ait oluşları ve kanser patogenezindeki rolleri göz önüne alındığında MYCN geninin de MYC'ye benzer şekilde kolesteatoma etiyopatogenezinde rol alabileceğini düşünülebilir. Bir hastada heterozigot olarak tespit ettiğimiz muhtemel benign olarak sınıflandırılan MYCN c.1093C>G varyantı bu çıkarımı yapmak için yetersizdir. Ancak, kolesteatomanın kanserin bütün karakteristik özelliklerine sahip olmaması ve MYCN'nin kolesteatoma oluşumu üzerindeki etkileri konusunda herhangi bir bulgunun bulunmaması nedeniyle bu gendeki değişimlerin etiyopatogeneze ile ilişkileri değerlendirilirken düşük patojeniteye sahip varyantların göz ardı edilmemesi önem arz etmektedir. Sonuç olarak, MYCN ve kolesteatoma arasındaki ilişkiyi konu alan yeni çalışmalar bu konuya ışık tutabilir.

BRCA2

BRCA2, DNA tamiri ve hücre döngüsü kontrolünde etkili bir tümör supresör gendir (Wang vd., 2009). Bu gendeki fonksiyon kaybıyla karakterize varyantların meme, over, prostat, ve pankreas kanserleriyle ilişkisi bilinmektedir (Miki vd., 1994; Petrucelli vd., 2020). Yaptığımız çalışmada iki farklı hastada üç farklı BRCA2 varyantı saptandı. H-4'te tespit edilen BRCA2 c.6550C>G varyantı, glisinden glutamata dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.000012'dir ve homozigot olarak hiçbir bireyde görülmemiştir. TOPMed Bravo ve GME Variome veritabanlarında ise bu değişim hiç saptanmamıştır. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili sekiz bildirimin beşi önemi bilinmeyen varyant, üçü muhtemel benign'dir. Ek olarak, in-siliko analizlerin ikisi patojenite (DANN:0,86, SIFT:0,04), üçü benign (FATHMM:-1,22, PolyPhen2:0,06, REVEL:0,41) lehine sonuçlandı. Tüm bu veriler dikkate alınarak bu varyant önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

Diğer bir hastada (H-12) ise compound heterozigot formda iki farklı BRCA2 varyantı tespit edildi. Bunlardan ilki, proteinin 1796. ammino asitinde aspartik asitten tirozine dönüşüme yol açan missense c.5386G>T değişimiydi. Bu varyant, GnomAD, TOPMed ve GME Variome veritabanlarında bulunmamaktadır. Clinvar veritabanında ise bu değişim iki kez önemi bilinmeyen varyant olarak bildirilmiştir. İn-siliko analizlerin ikisi patojenite (SIFT:0, DANN:0,98), ikisi benign (FATHMM:5,62, REVEL:0,14) yönde sonuçlandı. PolyPhen2 algoritmasından ise bu varyant ile ilgili veri elde edilemedi. Tüm bu bulgular dikkate alınarak, c.5386G>T değişimi önemi bilinmeyen varyant olarak yorumlandı. Aynı hastada heterozigot olarak saptanan diğer bir BRCA2 varyantı ise glisinden alanine dönüşüme yol açan c.6131G>C değişimidir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.000024'tür ve homozigot olarak hiçbir bireyde görülmemiştir. TOPMed ve GME Variome veritabanlarında ise bu değişim hiç saptanmamıştır. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili 12 bildirim bulunmaktadır. Bu bildirimlerin beşi önemi bilinmeyen varyant, dördü muhtemel benign, ve üçü benign şeklindedir. İn-siliko analizler yapıldığında tamamı benign yönünde sonuçlandı (DANN:0,62, FATHMM: 5.89, REVEL:0,17, PolyPhen2:0,02, SIFT:0,07). Tüm bu veriler dikkate alınarak bu varyant muhtemel benign olarak değerlendirildi.

BRCA2 geni ve kolesteatoma ile ilgili literatürde herhangi bir veriye bulunmamaktadır. Ancak, BRCA2 genindeki patojenik değişimler birçok tümör tipinde sıklıkla görülmektedir. Bu konuda BRCA1 geninin sinyal yolları üzerindeki etkilerine bakılacak olursa, BRCA1'in DNA tamirinin yanı sıra PTEN benzeri bir etkiyle PI3K/Akt

yolağını inhibe ettiği görülmektedir (Minami vd., 2014). Benzer bir şekilde, kolesteatoma dokusunda PI3K/Akt yolağının aktivasyonu ve PTEN inhibisyonu, literatürde bulunan birden fazla çalışmayla gösterilmiştir (Liu vd., 2013; Friedland vd., 2009). Bu bilgiler ışığında BRCA1 veya BRCA2'deki fonksiyon kaybına neden olan değişimlerin kolesteatomada PI3K/Akt yolağı aktivasyonu ile proliferasyonu artırma yönünde etki gösterebileceği öne sürülebilir ancak bu konuda yeterli veri bulunmamaktadır. Gerek PI3K, gerek BRCA1 ve BRCA2'ye yönelik hedeflenebilir spesifik ajanların bulunması nedeniyle, bu alanda yapılacak yeni çalışmalar hastaların klinik yönetimini doğrudan etkileme potansiyelini taşımaktadır. Ek olarak, Liu vd. (2013) tarafından yapılan araştırmada, EGF inhibitörü AG1478 ve PI3K inhibitörü wortmanninin hücre kültüründe proliferasyonu azaltıcı yönde etkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamız, BRCA2 ve kolesteatoma ilişkisinin ele alınması açısından bir ilk niteliği taşımaktadır. Ancak, tespit edilen varyantların fonksiyonel etkileri ile ilgili herhangi bir veri bulunmaması daha genel bir çıkarımın yapılmasını engellemektedir.

APC

APC, Wnt sinyal yolağı üzerine etkili bir tümör supresör genidir. Hücre migrasyonu, adezyon, ve apoptoz APC geninin görev aldığı fonksiyonların başlıcalarıdır (Hanson ve Miller, 2005). APC c.3653C>T varyantı proteinin 1218. aminoasitinde treoninden metiyonine dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.000036'dır ve homozigot olarak bir bireyde görülmüştür. Varyantın TOPMed Bravo veritabanındaki frekansı ise 0.000034'tür ve homozigot olarak hiçbir bireyde saptanmamıştır. GME Variome veritabanında bu değişim hiç bildirilmemiştir. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili altısı önemi bilinmeyen varyant, biri muhtemel benign olmak üzere yedi bildirim bulunmaktadır. Ayrıca, yapılan in-siliko analizlerin üçü patojenite (DANN:0,97, FATHMM:-2,77, SIFT:0), ikisi benign (PolyPhen2:0,19, REVEL:0,25) lehineydi. Bu veriler dikkate alınarak APC c.3653C>T değişimi önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

APC ve kolesteatoma ilişkisi literatürde tarandığında, Shaoul vd., (1999) tarafından FAP ve kolesteatoma birlikteliğinin bildirildiği bir yayın göze çarpmaktadır. Bunun dışında literatürde kolesteatomada APC defektinin gösterildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. FAP'ın patogenezinde APC genindeki fonksiyon kaybı kaynaklı hiperproliferasyonun yattığı bilinmektedir. Benzer bir durum kolesteatoma için

de söz konusu olabilir ancak net bir çıkarımın yapılabilmesi için bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

SMO

SMO, hedgehog sinyal yolağında görevli bir proto-onkogendir (Briscoe vd., 2013). Bu gendeki fonksiyon kazanımıyla karakterize değişimler bazal hücreli karsinom ve medullablastoma bildirilmiştir (Bonilla vd., 2016). SMO c.704C>T varyantı alaninden valine dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu değişimin GnomAD ve TOPMed Bravo veritabanlarındaki frekansları sırasıyla 0.000114 ve 0.000068'dir ve homozigot olarak hiçbir bireyde görülmemiştir. GME Variome veritabanında ise bu değişim hiç saptanmamıştır. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili herhangi bir bildirim bulunmamaktadır. Bunun yanında, yapılan in-siliko analizlerin dördü patojenite (DANN:1, FATHMM:-1,83, REVEL:0,81, PolyPhen2:0,44), biri benign (SIFT:0,07) lehine sonuçlanmıştır. Tüm bu veriler dikkate alınarak SMO c.704C>T değişimi önemi bilinmeyen varyant olarak yorumlandı.

Literatürde SMO ve kolesteatoma ilişkisini inceleyen bir veriye rastlanmamıştır. Ancak, yakın zamanda yapılan bir çalışmada kolesteatoma dokusunda sonic hedgehog (Shh) protein artışı gösterilmiştir (Damberg vd. 2021). Hem SMO'nun hem de SHH'nin hedgehog sinyal yolağında bulunmaları, SMO aktivasyonunun SHH ile benzer etki gösterebileceğini düşündürülebilir. Ayrıca, kolesteatomada ve birçok tümör dokusunda upregüle olan miR-802'in (Li ve Qin, 2014) diğer hücre içi sinyal yollarının yanında hedgehog sinyal yolağının da kontrolünde rol aldığı bildirilmiştir (Gao vd., 2021). miR-802'nin birçok hücre içi sinyal yolağı ile karmaşık ilişkilere sahip olması tek bir yolak veya tümör hakkında tek yönlü doğrusal çıkarımlar yapılabilmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle, sağlıklı analizlerin yapılabilmesi için, SMO geninin de içinde olduğu hedgehog sinyal yolağı ve kolesteatoma ilişkisinin incelendiği yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

ROS1

ROS1 geni, başta küçük hücreli dışı akciğer kanseri olmak üzere birçok kanser tipinde translokasyonları saptanan reseptör tirozin kinaz yapısında bir proto-onkogendir (Bergethon vd., 2012; Lee vd., 2013; Gu vd., 2011). ROS1 yeniden düzenlenmeleri küçük hücreli dışı akciğer kanseri vakalarının %1 ila 2'sinde görülür (Giustini ve Bazhenova, 2020). H-9'da saptanan c.5942del varyantı 1981. kodonda meydana getirdiği tek nükleotid

delesyonuyla çerçeve kaymasına neden olan bir değişimdir. Bu varyantla ilgili GnomAD, TOPMed Bravo ve GME Variome veritabanlarında hiçbir bildirim bulunmamaktadır. Ayrıca, Clinvar veritabanında da bu varyant ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Varyantın çerçeve kaymasına neden olması nedeniyle in-siliko analizler uygulanamamıştır. Tüm bu bulgular ışığında, ROS1 c.5942del varyantı muhtemel patojenik olarak sınıflandırılmıştır.

Bir proto-onkogen olan ROS1 ve kolesteatoma ilişkisi ile ilgili literatürde herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Ayrıca ROS1 geninde fonksiyon kaybına neden olan değişimlerin etkileri konusunda da yeterli veri mevcut değildir. ROS1 geninin kanserle ilişkisinin yeniden düzenlenmeler sonucu onkogenik aktivasyon üzerinden olduğu düşünüldüğünde bu gendeki fonksiyon kaybı değişimlerinin neoplazi üzerine etkisi belirsizdir. Dolayısıyla, net çıkarımların yapılabilmesi için bu alanda daha fazla bilgiye ihtiyaç bulunmaktadır.

SMAD4

SMAD4, TGF- β yolağında rol alan bir tümör supresör gendir (Davis vd., 2008). Bu gendeki germline patojenik varyantlar, juvenil poliposis sendromuna (Howe vd.,1998), somatik değişimler ise pankreas ve kolorektal kanser başta olmak üzere farklı kanser tiplerine yol açabilmektedir (Zhao vd., 2018). Bir hastada heterozigot olarak tespit edilen SMAD4 c.424+5G>A varyantı, ekzon-intron bileşkesinin intronik tarafında bulunan splicing bölge değişimidir. Bu varyantın GnomAD veritabanındaki frekansı 0.000209'dur ve homozigot olarak hiçbir bireyde görülmemiştir. TOPMed Bravo veritabanındaki frekansı ise 0.000103'tür ve aynı şekilde hiçbir bireyde homozigot olarak bildirilmemiştir. Ek olarak, GME Variome veritabanında bu değişim bulunmamaktadır. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili 13 bildirimin altısı önemi bilinmeyen varyant, altısı muhtemel benign, ve biri benignidir. Splice varyantlar için kullanılan in-siliko analizlerin ise biri patojenik (dbSNV Ada:1), diğeri benign (SpliceAI:0,02) olarak sonuçlandı. Bu veriler ışığında, SMAD4 c.424+5G>A varyantı önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

Kolesteatomada TGF- β yolağının aktivasyonu birden fazla çalışmayla gösterilmiştir (Sudhoff vd., 2000; Huisman vd., 2007). TGF- β 'nin en bilinen özelliği olan profibrotik etkisinin yanında epitel proliferasyonunu artırdığı da bildirilmektedir (Kuo, 2015). Literatürde SMAD4 ve kolesteatoma ilişkisini irdeleyen herhangi bir yayın

bulunmamaktadır. Ancak, kolesteatomada TGF- β yolağının etkinliğine yönelik yayınlar göz önüne alındığında SMAD4 geninin özellikle incelenmesi ayrıca önem kazanmaktadır.

STK11

STK11 geni serin-treonin kinaz fonksiyonlu bir tümör supresördür. Bu gen, hücre enerji metabolizması ve hücre polaritesinde etkilidir (Xu vd., 2013). Ayrıca, p53 aracılı apoptozun kontrolünde de görev alır (Karuman vd., 2001). STK11 c.1225C>T varyantı arjininden triptofana dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD, TOPMed Bravo ve GME Variome veritabanlarındaki frekansları sırasıyla 0.000087, 0.000069 ve 0.002035 şeklindedir. Ayrıca, bu üç veritabanının hiçbirinde STK11 c.1225C>T değişimi homozigot olarak görülmemiştir. Clinvar veritabanında bu varyant ile ilgili on bildirimin yedisi önemi bilinmeyen varyant, üçü muhtemel benign şeklindedir. İnsiliko analizlerin ise üçü patojenite (DANN:0,99, PolyPhen2:0,8, SIFT:0), ikisi benign (FATHMM:-0,57, REVEL:0,24) yönünde sonuçlanmıştır. Tüm bu veriler dikkate alınarak bu varyant önemi bilinmeyen varyant olarak yorumlanmıştır.

Literatürde STK11 değişimlerinin kolesteatoma dokusunda incelendiği herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Ancak, STK11 ve PTEN arasında enzim-substrat ilişkisi olduğuna dair bilgiler mevcuttur (Mehenni vd., 2005). Kolesteatomada PTEN inaktivasyonunu gösteren çalışmalar (Freidland vd., 2009; Yune ve Byun, 2009) göz önüne alındığında, STK11 genindeki değişimlerin kolesteatoma dokusunda PTEN üzerinden etki gösterebileceği öne sürülebilir. Fakat, bu konudaki çalışmaların yetersizliği ileri çıkarımların yapılmasını zorlaştırmaktadır.

NOTCH1

NOTCH1, hücre-hücre sinyal iletiminde rol alan bir transmembran reseptördür (Ntziachristos vd., 2014). Bu gen, hem proto-onkogen hem tümör supresör gen niteliklerine sahiptir. NOTCH1 geninin fonksiyon kazandıran değişimleri T-hücreli akut lenfoblastik lösemiye neden olurken (Ferrarotto vd., 2017), fonksiyon kaybıyla seyreden varyantlar yassı hücreli baş ve boyun karsinomuna yol açmaktadır (Nyman vd., 2018). NOTCH1 c.4031C>T varyantı, proteinin 1344. amino asitinde treoninden metiyonine dönüşüme yol açan missense bir değişimdir. Bu varyantın GnomAD ve TOPMed Bravo veritabanlarındaki frekansları sırasıyla 0.000454 ve 0.00024'tür. Ayrıca her iki veritabanında da bu varyant ile ilgili homozigot bir bildirim bulunmamaktadır. GME Variome veritabanında ise bu değişim hiç gözlenmemiştir. Bunun yanında, Clinvar veritabanında

bu varyant ile ilgili altı bildirimden dördü önemi bilinmeyen varyant, ikisi muhtemel benignidir. İn-siliko analizlerin ise ikisi patojenite (DANN:0,99, PolyPhen2:0,84), üçü benign (SIFT:0,07, FATHMM:1,24, REVEL:0,21) yönünde sonuçlandı. Bu bulgular ışığında, NOTCH1 c.4031C>T değişimi önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirildi.

Yakın zamanda, Fukuda vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada kolesteatoma dokusunda NOTCH1 ekspresyonunun dış kulak yolu epiteline kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. NOTCH1 genindeki fonksiyon kaybının yassı hücreli baş ve boyun karsinomu ile ilişkisi bilinmektedir (Nyman vd., 2018). Bu açıdan bakıldığında epitel dokuda NOTCH1'in tümör supresör etkinliğe sahip olduğu görülmektedir. Yassı hücreli baş ve boyun karsinomundaki etkisine benzer bir şekilde kolesteatoma dokusunda da NOTCH1 genindeki fonksiyon kaybına neden olan değişimler proliferatif etki gösterebilir. Bu veriler göz önüne alındığında, NOTCH1 ve kolesteatoma ilişkisini inceleyecek çalışmaların gelecek vadettiği söylenebilir.

Yukarıda ayrıntılı bir biçimde tartışılan germline değişimlerin tamamı tek hastada gözlenmiştir. Ayrıca, germline olarak tespit edilen on iki varyantın ikisi muhtemel benign, dokuzu önemi bilinmeyen varyant ve biri muhtemel patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyantlarda sınıflamanın netleşmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Dolayısıyla, saptanan değişimler ile ilgili net çıkarım yapmak mümkün olmamıştır. Her hâlükârda, bahsedilen varyantların literatüre kazandırılmasının yeni bilimsel araştırmalar için yön verici etkileri olacağı düşünülmektedir.

Öte yandan, yapılan analizlerde bilinen patojenik varyant tespit edilmeyişi, kolesteatoma patogenezinin doğasından kaynaklanan bir durum olabilir. Çünkü, literatürde kesin patojenik olarak sınıflandırılan kanser ilişkili varyantların çoğunlukla protein fonksiyonunun tamamen bozulduğu null varyantlar veya bilinen onkojenik aktiviteye sahip fonksiyon kazanımı varyantları olduğu görülmektedir. Kolesteatomanın kansere kıyasla hem histopatolojik hem de klinik olarak daha benign seyretmesi bu konuda düşük penetranslı varyantların söz konusu olabileceğini düşündürülebilir.

Örneklem boyutunun küçük oluşu çalışmamız açısından kısıtlayıcı etki göstermiştir. Ayrıca özellikle dünya çapında nadir görülen varyantların analizinde Türkiye'yi kapsayan popülasyon veritabanlarının bulunmaması varyant sınıflandırma sürecini zorlaştırmıştır. Bu alanda ilerleyen dönemde yapılacak genom tabanlı popülasyon veritabanı projelerinin bu kısıtı ortadan kaldırabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızda değerlendirilen genler her ne kadar kanser etiyopatogenezindeki etkisi net şekilde bilinen genler olsa da, daha fazla genin dahil olduğu daha geniş çalışmalar yeni veriler ortaya koyabilecektir. Bu bağlamda, özellikle tüm ekzom veya tüm genom dizileme tekniklerinin kullanıldığı ve elde edilen verilerin genom boyu asosiyasyon çalışmalarıyla değerlendirildiği araştırmalar fayda sağlayabilir.

Çalışmamızda kullandığımız yeni nesil dizi analizi teknolojisi aynı anda birçok genin birçok bölgesinin çok yüksek derinlikte dizilenmesini sağlaması bakımından avantajlıdır. Ancak bu yöntem geniş delesyon, duplikasyon ve yapısal değişimleri saptama konusunda dezavantajlıdır. Gelecekte planlanacak çalışmalarda bu dezavantajın karşılanmasında geniş delesyon, duplikasyon ve yapısal değişimleri saptayabilen FISH, MLPA, ve mikrodizin gibi yöntemler kullanılabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda sitogenetik olarak kolesteatoma dokusunda çeşitli anöploidilerin ve onkogen amplifikasyonlarının saptanmış olduğu göz önüne alındığında ilerleyen dönemlerde delesyon/duplikasyon analizi temelli araştırmalar çalışmamızı tamamlayıcı mahiyette olacaktır.

Aynı şekilde, çalışmamızda kullanılan yeni nesil dizileme yöntemi, genomdaki epigenetik değişimleri tespit edememektedir. Kolesteatomada DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kromatin remodellingini konu alan yeni çalışmalar özellikle çevresel faktörlerin etkilerinin araştırılmasında anlamlı veriler ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir.

Sonuç olarak kolesteatoma; etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen; ister genomik, ister epigenomik, ister çevresel faktörler nedeniyle olsun, patogenezi çeşitli genetik mekanizmaların rol aldığı kompleks bir hastalıktır. Literatüre bakıldığında, kolesteatoma dokusunda kanser ilişkili genlerin normal doku ile karşılaştırmalı olarak somatik analizinin yapıldığı başka bir yayın saptanmamıştır. Çalışmamız bu yönüyle bir ilk özelliği taşımaktadır. Ayrıca, çalışmamız sonucu ortaya çıkan somatik ve germline değişimler sayesinde gelecekte yapılacak araştırmaların planlanmasında yön verici veriler ortaya çıkmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. SONUÇLAR

- Çalışmamızda kolesteatoma hastalarında klinik anlamı olabilecek 13 farklı gende 15 farklı varyant saptandı.
- Tespit edilen varyantların üçü somatik, on ikisi germline olarak izlendi. Somatik varyantların hepsi kolesteatoma dokusunda pozitifken normal dokuda negatifti.
- Bir hastanın kolesteatoma dokusunda somatik olarak saptanan JAK3 c.2164G>A (p.Val722Ile) değişimi, popülasyon frekansı yüksek olmasına rağmen literatürde onkojenik aktivite artışına neden olabileceği yönündeki fonksiyonel analizler göz önüne alındığında potansiyel klinik anlam taşımaktadır.
- Somatik olarak tespit edilen TP53 c.284delC (p.Ser95PhefsTer28) varyantı daha önce literatürde hiç bildirilmemişti ve çerçeve kaymasına neden olmaktaydı. Bu varyant, kolesteatoma dokusunda TP53 genindeki muhtemel patojenik bir değişimin somatik olarak gösterilmesi bakımından bir ilk niteliğindedir.
- KRAS c.377A>T (p.Asp126Val), bir hastada kolesteatoma dokusunda bulunurken normal dokuda saptanmadı. Literatürde bu değişimin meme kanserinde somatik olarak bildirilmesi dışında herhangi bir veriye rastlanmadı.
- Klinik anlamı olabilecek VHL c.5C>T, JAK2 c.2674C>G, MYCN c.1093C>G, BRCA2 c.6550C>G, APC c.3653C>T, SMO c.704C>T, ROS1 c.5942del, SMAD4 c.424+5G>A, BRCA2 c.6131G>C, BRCA2 c.5386G>T, STK11 c.1225C>T, NOTCH1 c.4031C>T varyantları hastalarda germline olarak tespit edildi. Toplumda çok nadir olarak izlenen bu varyantların hiçbirisi daha önce kolesteatoma ile ilişkilendirilmemişti.

6.2. ÖNERİLER

- Kolesteatoma dokusunun heterojen yapısı göze alındığında yapılan genetik analizlerde kullanılan numunenin elde edildiği alan önem kazanmaktadır. Solid tümörlerde görülen tümöral heterojeniteye benzer şekilde kolesteatoma dokusunda da çeşitli genetik değişimler dokunun sadece belirli alanlarında görülebilir. Bu sorundan kaçınmak için çoklu alanlardan analiz yapılabilir. Ayrıca, gelecekte tek hücre dizileme ve in situ dizileme gibi yeni teknolojilerin kullanımının yaygınlaşması sayesinde solid dokudaki düşük fraksiyona sahip değişimlerin tespiti kolaylaşabilir.

- Kolesteatoma ile ilgili ekspresyon temelli birçok yayın bulunmaktadır. Fakat gen bazındaki değişimlerin direkt dokudan incelendiği çalışmalar gayet sınırlıdır. Genetik değişimlerin hücre, doku ve organizma temelinde çevresel faktörlere göre çok daha derin etkilerinin bulunduğu göz önüne alındığında bu alanda yapılacak gen/genom düzeyinde çalışmalar, kolesteatoma patogenezinin aydınlatılmasına ve hastalık yönetiminin iyileştirilmesine katkı sağlayacaktır.
- Bunun yanında, transkriptom ve proteom temelli daha geniş kapsama sahip çalışmalar, kolesteatomada epigenetik ve çevresel faktörlerin sinyal yolakları üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılmasına yol açabilir.



KAYNAKLAR

- Acuin J. Chronic suppurative otitis media. *BMJ Clin Evid*. 2007 Feb 1;2007:0507. PMID: 19454051; PMCID: PMC2943814.
- Adunka O, Gstoettner W, Knecht R, Kierner AC. Expression of hypoxia inducible factor 1 alpha and Von Hippel Lindau protein in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2003 Jul;113(7):1210-5. doi: 10.1097/00005537-200307000-00018. PMID: 12838021.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9. doi: 10.1038/nmeth0410-248. PMID: 20354512; PMCID: PMC2855889.
- Albihn A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res*. 2010;107:163-224. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07006-5. PMID: 20399964.
- Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sassoon J, Desloge RB, Parisier SC (1998) Expression of p53 protein in human middle ear cholesteatomas: pathogenetic implications. *Am J Otol* 19: 30–36
- Aquino JE, Cruz Filho NA, de Aquino JN. Epidemiology of middle ear and mastoid cholesteatomas: study of 1146 cases. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011 Jun;77(3):341-7. English, Portuguese. doi: 10.1590/s1808-86942011000300012. PMID: 21739009.
- Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J*. 2014 Aug 15;462(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20140712. PMID: 25057888; PMCID: PMC4112375.
- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 2005 Dec;5(12):921-9. doi: 10.1038/nrc1753. PMID: 16341083.
- Barbirou M, Sghaier I, Bedoui S, Ben Abderrazek R, Kraiem H, Farah A, Hassiki R, Mokrani A, Mezlini A, Almawi WY, Loueslati-Yacoubi B, Bouhaouala-Zahar B. KCNB1 gene polymorphisms and related indel as predictor biomarkers of

- treatment response for colorectal cancer - toward a personalized medicine. *Tumour Biol.* 2020 Jun;42(6):1010428320925237. doi: 10.1177/1010428320925237. PMID: 32484056.
- Bassi C, Ho J, Srikumar T, Dowling RJ, Gorrini C, Miller SJ, Mak TW, Neel BG, Raught B, Stambolic V. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science.* 2013 Jul 26;341(6144):395-9. doi: 10.1126/science.1236188.
- Battochio A, Mohammed S, Winthrop D, Lefresne S, Mulder K, Chu Q, O'Hara C, Lai R. Detection of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors: comparison of DHPLC and DNA sequencing methods using a single population-based cohort. *Am J Clin Pathol.* 2010 Jan;133(1):149-55. doi: 10.1309/AJCP1FNW7RGZFTYU. PMID: 20023271.
- Baysal E, Aksoy N, Kara F, Taysi S, Taşkın A, Bilinç H, Cevik C, Celenk F, Kanlıkama M. Oxidative stress in chronic otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013 Mar;270(4):1203-8. doi: 10.1007/s00405-012-2070-z. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22711004.
- Benmoussa N, Fabre C, Deo S, Prêtre C, Charlier P. The first description of cholesteatoma by Hippocrate. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2020 Jun;277(6):1651-1653. doi: 10.1007/s00405-020-05899-8. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162060.
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 10;30(8):863-70. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22215748; PMCID: PMC3295572. Bergmann AK, Schneppenheimer S, Seifert M, et al. 2014. "Recurrent mutation of JAK3 in T-cell prolymphocytic leukemia", *Genes Chromosomes Cancer*, 53(4), 309-316.
- Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Lardé C, Caillaud A, Diez de Medina SG, Cappellen D, Graff G, Thiery JP, Chopin D, Ricol D, Radvanyi F. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis.* 2006 Apr;27(4):740-7. doi: 10.1093/carcin/bgi290. Epub 2005 Dec 7. PMID: 16338952.

- Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*. 1995 Dec 15;14(24):6107-15. PMID: 8557030; PMCID: PMC394735.
- Binni F, Antogni I, De Simone P, Majore S, Silipo V, Crisi A, Amantea A, Pacchiarini D, Castori M, De Bernardo C, Catricalà C, Grammatico P. Novel and recurrent p14 mutations in Italian familial melanoma. *Clin Genet*. 2010 Jun;77(6):581-6. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01298.x. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20132244.
- Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marqués JM, Blanc JF, Bui H, Beaudoin JC, Franco D, Balabaud C, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet*. 2002 Oct;32(2):312-5. doi: 10.1038/ng1001. Epub 2002 Sep 23. PMID: 12355088.
- Bonilla X, Parmentier L, King B, Bezrukov F, Kaya G, Zoete V, Seplyarskiy VB, Sharpe HJ, McKee T, Letourneau A, Ribaux PG, Popadin K, Basset-Seguin N, Ben Chaabene R, Santoni FA, Andrianova MA, Guipponi M, Garieri M, Verdan C, Grosdemange K, Sumara O, Eilers M, Aifantis I, Michielin O, de Sauvage FJ, Antonarakis SE, Nikolaev SI. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2016 Apr;48(4):398-406. doi: 10.1038/ng.3525. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26950094.
- Briscoe, J., & Théron, P. P. 2013. "The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(7), 416–429.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1655-7. doi: 10.1126/science.296.5573.1655. PMID: 12040186.
- Castle JT. Cholesteatoma Pearls: Practical Points and Update. *Head Neck Pathol*. 2018 Sep;12(3):419-429. doi: 10.1007/s12105-018-0915-5. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30069838; PMCID: PMC6081285.
- Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, Rudolph JE, Yaeger R, Soumerai T, Nissan MH, Chang MT, Chandarlapaty S, Traina TA, Paik PK, Ho AL, Hantash FM, Grupe A, Baxi SS, Callahan MK, Snyder A, Chi P, Danila D, Gounder M, Harding JJ, Hellmann MD, Iyer G, Janjigian Y, Kaley T, Levine DA,

- Lowery M, Omuro A, Postow MA, Rathkopf D, Shoushtari AN, Shukla N, Voss M, Paraiso E, Zehir A, Berger MF, Taylor BS, Saltz LB, Riely GJ, Ladanyi M, Hyman DM, Baselga J, Sabbatini P, Solit DB, Schultz N. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol.* 2017 Jul;2017:PO.17.00011. doi: 10.1200/PO.17.00011. Epub 2017 May 16. PMID: 28890946; PMCID: PMC5586540.
- Chan, G., Kalaitzidis, D., & Neel, B. G. 2008. "The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer", *Cancer metastasis reviews*, 27(2), 179–192.
- Chase A, Schultheis B, Kreil S, Baxter J, Hidalgo-Curtis C, Jones A, Zhang L, Grand FH, Melo JV, Cross NC. Imatinib sensitivity as a consequence of a CSF1R-Y571D mutation and CSF1/CSF1R signaling abnormalities in the cell line GDM1. *Leukemia.* 2009 Feb;23(2):358-64. doi: 10.1038/leu.2008.295. Epub 2008 Oct 30. PMID: 18971950.
- Christiaans I, Kenter SB, Brink HC, van Os TA, Baas F, van den Munckhof P, Kidd AM, Hulsebos TJ. Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. *J Med Genet.* 2011 Feb;48(2):93-7. doi: 10.1136/jmg.2010.082420. Epub 2010 Oct 7. PMID: 20930055.
- Dai J, Kong Y, Si L, Chi Z, Cui C, Sheng X, Mao L, Li S, Lian B, Yang R, Liu S, Xu X, Guo J. Large-scale analysis of PDGFRA mutations in melanomas and evaluation of their sensitivity to tyrosine kinase inhibitors imatinib and crenolanib. *Clin Cancer Res.* 2013 Dec 15;19(24):6935-42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1266. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24132921.
- Damberg K, Sumeraga G, Pilmane M. Complex Evaluation of Tissue Factors in Pediatric Cholesteatoma. *Children (Basel).* 2021 Oct 16;8(10):926. doi: 10.3390/children8100926. PMID: 34682191; PMCID: PMC8534875.
- Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell.* 2012 Mar 30;149(1):22-35. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003. PMID: 22464321; PMCID: PMC3345192.
- Das PM, Thor AD, Edgerton SM, Barry SK, Chen DF, Jones FE. Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene.* 2010 Sep 16;29(37):5214-9. doi: 10.1038/onc.2010.271. Epub 2010 Jul 5. PMID: 20603612; PMCID: PMC3007096.

- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008 Jul 3;454(7200):56-61. doi: 10.1038/nature07086. Epub 2008 Jun 11. PMID: 18548003; PMCID: PMC2653422.
- Degryse S, de Bock CE, Cox L, Demeyer S, Gielen O, Mentens N, Jacobs K, Geerdens E, Gianfelici V, Hulselmans G, Fiers M, Aerts S, Meijerink JP, Tousseyn T, Cools J. JAK3 mutants transform hematopoietic cells through JAK1 activation, causing T-cell acute lymphoblastic leukemia in a mouse model. *Blood*. 2014 Nov 13;124(20):3092-100. doi: 10.1182/blood-2014-04-566687. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25193870.
- Demoulin JB, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Jun;25(3):273-83. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.03.003. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24703957.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016 Jun;37(6):564-9. doi: 10.1002/humu.22981. Epub 2016 Mar 25. PMID: 26931183.
- Eskiizmir G, Seda Vatansever H, Ozgür E, Aslan A, Tanyeri G, Gözüaık D, Kemal Özbilgin M, Cingi C. Jak-Stat signaling pathway may play a role in the pathogenesis of cholesteatoma. *Am J Otolaryngol*. 2014 Mar-Apr;35(2):130-6. doi: 10.1016/j.amjoto.2013.10.005. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24321752.
- Ferrarotto R, Mitani Y, Diao L, Guijarro I, Wang J, Zweidler-McKay P, Bell D, William WN Jr, Glisson BS, Wick MJ, Kapoun AM, Patnaik A, Eckhardt G, Munster P, Faoro L, Dupont J, Lee JJ, Futreal A, El-Naggar AK, Heymach JV. Activating NOTCH1 Mutations Define a Distinct Subgroup of Patients With Adenoid Cystic Carcinoma Who Have Poor Prognosis, Propensity to Bone and Liver Metastasis, and Potential Responsiveness to Notch1 Inhibitors. *J Clin Oncol*. 2017 Jan 20;35(3):352-360. doi: 10.1200/JCO.2016.67.5264. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27870570; PMCID: PMC5456373.

- Fingleton B. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Nov;1864(11 Pt A):2036-2042. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.010. Epub 2017 May 11. PMID: 28502592.
- Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, Karam R, Manouvrier S, Graziadio C, Vekemans M, Hartmann A, Baert-Desurmont S, Alexandre C, Lejeune Dumoulin S, Marroni C, Martin C, Castedo S, Lovett M, Winston J, Machado JC, Attié T, Jabs EW, Cai J, Pellerin P, Triboulet JP, Scotte M, Le Pessot F, Hedouin A, Carneiro F, Blayau M, Seruca R. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):138-42. doi: 10.1136/jmg.2005.031385. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831593; PMCID: PMC2564630.
- Friedland DR, Eernisse R, Erbe C, Gupta N, Cioffi JA. Cholesteatoma growth and proliferation: posttranscriptional regulation by microRNA-21. *Otol Neurotol.* 2009 Oct;30(7):998-1005. doi: 10.1097/MAO.0b013e3181b4e91f. PMID: 19672202; PMCID: PMC2828528.
- Fukuda A, Kano S, Nakamaru Y, Morita S, Hoshino K, Fujiwara K, Homma A. Notch Signaling in Acquired Middle Ear Cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2021 Oct 1;42(9):e1389-e1395. doi: 10.1097/MAO.0000000000003245. PMID: 34172659.
- Fukudome S, Wang C, Hamajima Y, Ye S, Zheng Y, Narita N, Sunaga H, Fujieda S, Hu X, Feng L, Lin J. Regulation of the angiogenesis of acquired middle ear cholesteatomas by inhibitor of DNA binding transcription factor. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013 Mar;139(3):273-8. doi: 10.1001/jamaoto.2013.1750. PMID: 23657791.
- Gao T, Zou M, Shen T, Duan S. Dysfunction of miR-802 in tumors. *J Clin Lab Anal.* 2021 Nov;35(11):e23989. doi: 10.1002/jcla.23989. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34558723; PMCID: PMC8605121.
- Giustini NP, Bazhenova L. ROS1-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *Thorac Surg Clin.* 2020 May;30(2):147-156. doi: 10.1016/j.thorsurg.2020.01.007. PMID: 32327173.
- Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jan;15(1):55-64. doi: 10.1038/nrc3844. PMID: 25533676.

- Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019 Jul 16;51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025. PMID: 31315034; PMCID: PMC6831096.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PMID: 20303878; PMCID: PMC2866629.
- Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, Staudt LM. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *N Engl J Med*. 2016 Sep 22;375(12):1109-12. doi: 10.1056/NEJMp1607591. PMID: 27653561; PMCID: PMC6309165.
- Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, Wang Y, Deng G, Zhu L, Tan Z, Hu Y, Wu C, Nardone J, MacNeill J, Ren J, Reeves C, Innocenti G, Norris B, Yuan J, Yu J, Haack H, Shen B, Peng C, Li H, Zhou X, Liu X, Rush J, Comb MJ. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2011 Jan 6;6(1):e15640. doi: 10.1371/journal.pone.0015640. PMID: 21253578; PMCID: PMC3017127.
- Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2013 Oct;13(10):685-700. doi: 10.1038/nrc3580. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2013 Nov;13(11):820. PMID: 24060861.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
- Hanson CA, Miller JR. Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene*. 2005 Nov 21;361:1-12. doi: 10.1016/j.gene.2005.07.024. Epub 2005 Sep 26. PMID: 16185824.
- Harinck F, Kluijt I, van der Stoep N, Oldenburg RA, Wagner A, Aalfs CM, Sijmons RH, Poley JW, Kuipers EJ, Fockens P, van Os TA, Bruno MJ. Indication for CDKN2A-mutation analysis in familial pancreatic cancer families without melanomas. *J Med Genet*. 2012 Jun;49(6):362-5. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100563. Epub 2012 May 25. PMID: 22636603.

- He B, Wang B, Wang H, Zhang C, Wu Y, Fu L, Yu G. RBAK is upregulated in non-small cell lung cancer and promotes cell migration and invasion. *Exp Ther Med*. 2019 Oct;18(4):2942-2948. doi: 10.3892/etm.2019.7900. Epub 2019 Aug 16. PMID: 31555381; PMCID: PMC6755425.
- Holly A, Sittinger M, Bujia J (1995) Immunohistochemical demonstration of c-myc oncogene product in middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252: 366–369
- Homøe P, Rosberg J. Family cluster of cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 2007;121:65–7
- Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Apr;87(7):2775-9. doi: 10.1073/pnas.87.7.2775. PMID: 2181449; PMCID: PMC53773.
- Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*. 1998 May 15;280(5366):1086-8. doi: 10.1126/science.280.5366.1086. PMID: 9582123.
- Huisman MA, Heer ED, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol* 2003;123:377–82
- Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Terminal differentiation and mitogen-activated protein kinase signaling in human cholesteatoma epithelium. *Otol Neurotol*. 2006 Apr;27(3):422-6. doi: 10.1097/00129492-200604000-00021. PMID: 16639284.
- Huisman MA, de Heer E, Dijke PT, Grote JJ. Transforming growth factor b and wound healing in human cholesteatoma. *Laryngoscope* 2007;118:94–8
- Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10330-4. doi: 10.1073/pnas.94.19.10330. PMID: 9294210; PMCID: PMC23362.

- Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, MacInnis RJ, Maier C, Hsieh CL, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS, Sieh W. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016 Oct 6;99(4):877-885. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.016. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27666373; PMCID: PMC5065685.
- Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, Chow ED, Kanterakis E, Gao H, Kia A, Batzoglou S, Sanders SJ, Farh KK. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.* 2019 Jan 24;176(3):535-548.e24. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.015. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30661751.
- Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1):38-43. doi: 10.1038/ng0198-38. PMID: 9425897.
- Jennings BA, Prinsley P, Philpott C, Willis G, Bhutta MF. The genetics of cholesteatoma. A systematic review using narrative synthesis. *Clin Otolaryngol.* 2018 Feb;43(1):55-67. doi: 10.1111/coa.12900. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28485112.
- Jian X, Liu X. In Silico Prediction of Deleteriousness for Nonsynonymous and Splice-Altering Single Nucleotide Variants in the Human Genome. *Methods Mol Biol.* 2017;1498:191-197. doi: 10.1007/978-1-4939-6472-7_13. PMID: 27709577.
- Kanno H, Kondo K, Ito S, Yamamoto I, Fujii S, Torigoe S, Sakai N, Hosaka M, Shuin T, Yao M. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;54(18):4845-7. PMID: 8069849.
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M,

- Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria AH, Minikel EV, Weisburd B, Lek M, Ware JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferriera S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME; Genome Aggregation Database Consortium, Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020 May;581(7809):434-443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7. Epub 2020 May 27. Erratum in: *Nature*. 2021 Feb;590(7846):E53. PMID: 32461654; PMCID: PMC7334197.
- Karuman P, Gozani O, Odze RD, Zhou XC, Zhu H, Shaw R, Brien TP, Bozzuto CD, Ooi D, Cantley LC, Yuan J. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1307-19. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00258-1. PMID: 11430832.
- Kaya İ, Avcı ÇB, Şahin FF, Özateş NP, Sezgin B, Kurt CÇ, Bilgen C, Kirazlı T. Evaluation of significant gene expression changes in congenital and acquired cholesteatoma. *Mol Biol Rep*. 2020 Aug;47(8):6127-6133. doi: 10.1007/s11033-020-05689-9. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32740796.
- Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006;169:987–998.
- Keats JJ, Reiman T, Belch AR, Pilarski LM. Ten years and counting: so what do we know about t(4;14)(p16;q32) multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2006 Nov;47(11):2289-300. doi: 10.1080/10428190600822128. PMID: 17107900.
- Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipilä MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol*. 1999;119(5):568-72. doi: 10.1080/00016489950180801. PMID: 10478597.

- Kenyon GS, Marks PV, Scholtz CL, Dhillon R. Squamous cell carcinoma of the middle ear. A 25-year retrospective study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985 May-Jun;94(3):273-7. PMID: 4014949.
- Kim JL, Jung HH. Proteomic analysis of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol*. 2004 Sep;124(7):783-8. doi: 10.1080/00016480410017882. PMID: 15370560.
- Klenke C, Janowski S, Borck D, Widera D, Ebmeyer J, Kalinowski J, Leichtle A, Hofestädt R, Upile T, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Sudhoff H. Identification of novel cholesteatoma-related gene expression signatures using full-genome microarrays. *PLoS One*. 2012;7(12):e52718. doi: 10.1371/journal.pone.0052718. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23285167; PMCID: PMC3527606.
- Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*. 1999 Jan 15;59(2):269-73. PMID: 9927029.
- Kuo CL. Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research. *Laryngoscope*. 2015 Jan;125(1):234-40. doi: 10.1002/lary.24890. Epub 2014 Aug 14. PMID: 25123251.
- Lavezzi A, Mantovani M, Cazzulo A, Turconi P, Maturri L. Significance of trisomy 7 related to PCNA index in cholesteatoma. *Am J Otolaryngol*. 1998 Mar-Apr;19(2):109-12. doi: 10.1016/s0196-0709(98)90105-3. PMID: 9550442.
- Lee J, Lee SE, Kang SY, Do IG, Lee S, Ha SY, Cho J, Kang WK, Jang J, Ou SH, Kim KM. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer*. 2013 May 1;119(9):1627-35. doi: 10.1002/cncr.27967. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23400546.
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res*. 2008 Jul 15;68(14):5878-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0380. PMID: 18632642.
- Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, Massard C, Lévy C, Arnedos M, Lacroix-Triki M, Garrabey J, Boursin Y, Deloger M, Fu Y, Commo F, Scott V, Lacroix L, Dieci MV, Kamal M, Diéras V, Gonçalves A, Ferrer JM,

- Romieu G, Vanlemmens L, Mouret Reynier MA, Théry JC, Le Du F, Guiu S, Dalenc F, Clapisson G, Bonnefoi H, Jimenez M, Le Tourneau C, André F. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Med.* 2016 Dec 27;13(12):e1002201. doi: 10.1371/journal.pmed.1002201. PMID: 28027327; PMCID: PMC5189935.
- Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Apr 1;6(4):a020768. doi: 10.1101/cshperspect.a020768. PMID: 24691965; PMCID: PMC3970421.
- Lewis JS. Squamous carcinoma of the ear. *Arch Otolaryngol* 1973; 97:41–2.
- Li N, Qin ZB. Inflammation-induced miR-802 promotes cell proliferation in cholesteatoma. *Biotechnol Lett.* 2014 Sep;36(9):1753-9. doi: 10.1007/s10529-014-1545-y. Epub 2014 May 28. PMID: 24867318.
- Li H, Xiao N, Wang Y, Wang R, Chen Y, Pan W, Liu D, Li S, Sun J, Zhang K, Sun Y, Ge X. Smurf1 regulates lung cancer cell growth and migration through interaction with and ubiquitination of PIPKI γ . *Oncogene.* 2017 Oct 12;36(41):5668-5680. doi: 10.1038/onc.2017.166. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28581524.
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet.* 1997 May;16(1):64-7. doi: 10.1038/ng0597-64. PMID: 9140396.
- Liu W, Ren H, Ren J, Yin T, Hu B, Xie S, Dai Y, Wu W, Xiao Z, Yang X, Xie D. The role of EGFR/PI3K/Akt/cyclinD1 signaling pathway in acquired middle ear cholesteatoma. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:651207. doi: 10.1155/2013/651207. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24311896; PMCID: PMC3839121.
- Liu W, Yin T, Ren J, Li L, Xiao Z, Chen X, Xie D. Activation of the EGFR/Akt/NF- κ B/cyclinD1 survival signaling pathway in human cholesteatoma epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014 Feb;271(2):265-73. doi: 10.1007/s00405-013-2403-6. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23463347.

- Liu W, Xie S, Chen X, et al. Activation of the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway in human middle ear cholesteatoma epithelium. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:709–715
- Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *The Journal of Laryngology & Otology* (2010), 124, 587 – 593. doi:10.1017/S0022215109992763
- MacConaill LE, Garcia E, Shivdasani P, Ducar M, Adusumilli R, Breneiser M, Byrne M, Chung L, Conneely J, Crosby L, Garraway LA, Gong X, Hahn WC, Hatton C, Kantoff PW, Kluk M, Kuo F, Jia Y, Joshi R, Longtine J, Manning A, Palescandolo E, Sharaf N, Sholl L, van Hummelen P, Wade J, Wollinson BM, Zepf D, Rollins BJ, Lindeman NI. Prospective enterprise-level molecular genotyping of a cohort of cancer patients. *J Mol Diagn.* 2014 Nov;16(6):660-72. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.06.004. Epub 2014 Aug 23. PMID: 25157968; PMCID: PMC4210463.
- Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017 Apr 20;169(3):381-405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001. PMID: 28431241; PMCID: PMC5546324.
- Manning M, Jiang Y, Wang R, Liu L, Rode S, Bonahoom M, Kim S, Yang ZQ. Pan-cancer analysis of RNA methyltransferases identifies FTSJ3 as a potential regulator of breast cancer progression. *RNA Biol.* 2020 Apr;17(4):474-486. doi: 10.1080/15476286.2019.1708549. Epub 2020 Jan 19. PMID: 31957540; PMCID: PMC7237164.
- McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7587-95. doi: 10.1128/mcb.13.12.7587-7595.1993. PMID: 8246975; PMCID: PMC364830.
- Mehenni H, Lin-Marq N, Buchet-Poyau K, Reymond A, Collart MA, Picard D, Antonarakis SE. LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. *Hum Mol Genet.* 2005 Aug 1;14(15):2209-19. doi: 10.1093/hmg/ddi225. Epub 2005 Jun 29. PMID: 15987703.

- Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, Yelensky R, Brown M, Miller VA, Sarid D, Rizel S, Klein B, Rubinek T, Wolf I. D538G mutation in estrogen receptor- α : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 2013 Dec 1;73(23):6856-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1197. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24217577.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994 Oct 7;266(5182):66-71. doi: 10.1126/science.7545954. PMID: 7545954.
- Minami A, Nakanishi A, Ogura Y, Kitagishi Y, Matsuda S. Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. *Front Oncol.* 2014 Nov 10;4:318. doi: 10.3389/fonc.2014.00318. PMID: 25426449; PMCID: PMC4226230.
- Moore KL, Agur AMR, Dalley AF. Clinically oriented anatomy. 8th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing human: clinically oriented embryology. 10th edition. Philadelphia: Elsevier; 2016.
- Morandi A, Barbetti V, Rivero M, Dello Sbarba P, Rovida E. The colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor sustains ERK1/2 activation and proliferation in breast cancer cell lines. *PLoS One.* 2011;6(11):e27450. doi: 10.1371/journal.pone.0027450. Epub 2011 Nov 9. PMID: 22096574; PMCID: PMC3212567.
- Morris PS, Leach AJ. Acute and chronic otitis media. *Pediatr Clin North Am.* 2009 Dec;56(6):1383-99. doi: 10.1016/j.pcl.2009.09.007. PMID: 19962027; PMCID: PMC7111681.
- Mulligan LM. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat Rev Cancer.* 2014 Mar;14(3):173-86. doi: 10.1038/nrc3680. PMID: 24561444.
- Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, van Brussel A, Voest EE, Giles RH. Genetic analysis

- of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat.* 2010 May;31(5):521-37. doi: 10.1002/humu.21219. PMID: 20151405.
- Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell.* 2014 Mar 17;25(3):318-34. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.018. PMID: 24651013; PMCID: PMC4040351.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. 8th edition. Philadelphia: Elsevier: 2016.
- Nyman PE, Buehler D, Lambert PF. Loss of Function of Canonical Notch Signaling Drives Head and Neck Carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2018 Dec 15;24(24):6308-6318. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3535. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30087145; PMCID: PMC6295262.
- O'Hayre M, Vázquez-Prado J, Kufareva I, Stawiski EW, Handel TM, Seshagiri S, Gutkind JS. The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013 Jun;13(6):412-24. doi: 10.1038/nrc3521. Epub 2013 May 3. PMID: 23640210; PMCID: PMC4068741.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science.* 2004 Feb 27;303(5662):1378-81. doi: 10.1126/science.1089769. PMID: 14988562; PMCID: PMC3012624.
- Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelson M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H et al. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261:6–24
- Olszewska E, Rutkowska J, Minovi A, Sieskiewicz A, Rogowski M, Dazert S. The role of p21 and p53 proteins in congenital cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2013 Feb;34(2):266-74. doi: 10.1097/MAO.0b013e31827c9d8d. PMID: 23324739.
- Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, Huse JT, Pedraza A, Utsuki S, Yasui Y, Tandon A, Fomchenko EI, Oka H, Levine RL, Fujii K, Ladanyi M, Holland EC. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev.* 2010 Oct 1;24(19):2205-18. doi: 10.1101/gad.1972310. PMID: 20889717; PMCID: PMC2947772.

- Ozturk K, Yildirim MS, Acar H, Cenik Z, Keles B. Evaluation of c-MYC status in primary acquired cholesteatoma by using fluorescence in situ hybridization technique. *Otol Neurotol* 2006;27:588–591.
- Palkó E, Póliska S, Csákányi Z, Katona G, Karosi T, Helfferich F, Penyige A, Sziklai I. The c-MYC protooncogene expression in cholesteatoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:639896. doi: 10.1155/2014/639896. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24683550; PMCID: PMC3934790.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998 May 1;93(3):385-95. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81167-8. PMID: 9590173.
- Park S, Lee J, Kim YH, Park J, Shin JW, Nam S. Clinical Relevance and Molecular Phenotypes in Gastric Cancer, of TP53 Mutations and Gene Expressions, in Combination With Other Gene Mutations. *Sci Rep*. 2016 Oct 6;6:34822. doi: 10.1038/srep34822. PMID: 27708434; PMCID: PMC5052597.
- Pastore YD, Jelinek J, Ang S, Guan Y, Liu E, Jedlickova K, Krishnamurti L, Prchal JT. Mutations in the VHL gene in sporadic apparently congenital polycythemia. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1591-5. doi: 10.1182/blood-2002-06-1843. Epub 2002 Oct 10. PMID: 12393546.
- Peifer M. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science*. 1993 Dec 10;262(5140):1667-8. doi: 10.1126/science.8259511. PMID: 8259511.
- Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res*. 1993 Dec 15;53(24):5853-5. PMID: 8261393.
- Petrucelli N, Daly MB, PalT. “BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer” 1998 Sep 4 [Updated 2016 Dec 15]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

- Pezzolessi MG, Zbuk KM, Waite KA, Eng C. Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007 May 1;16(9):1058-71. doi: 10.1093/hmg/ddm053. Epub 2007 Mar 6. PMID: 17341483.
- Potsic WP, Korman SB, Samadi DS, Wetmore RF (2002) Congenital cholesteatoma: 20-year experience at the Children's Hospital of Philadelphia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 409–414
- Prinsley P. Familial cholesteatoma in East Anglia, UK. *J Laryngol Otol.* 2009 Mar;123(3):294-7. doi: 10.1017/S0022215108002673. Epub 2008 May 20. PMID: 18492311.
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012 May 15;72(10):2457-67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612. PMID: 22589270; PMCID: PMC3354961.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011 Oct 13;11(11):761-74. doi: 10.1038/nrc3106. PMID: 21993244; PMCID: PMC3632399.
- Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics.* 2015;31:761-763.
- Reissner C, Klose M, Fairless R, Missler M. Mutational analysis of the neurexin/neurologin complex reveals essential and regulatory components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 30;105(39):15124-9. doi: 10.1073/pnas.0801639105. Epub 2008 Sep 23. PMID: 18812509; PMCID: PMC2551626.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

- Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet.* 1994 May;7(1):98-102. doi: 10.1038/ng0594-98. PMID: 8075649.
- Robertson KD, Jones PA. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene.* 1999 Jul 1;18(26):3810-20. doi: 10.1038/sj.onc.1202737. PMID: 10445844.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011 Jan;29(1):24-6. doi: 10.1038/nbt.1754. PMID: 21221095; PMCID: PMC3346182.
- Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 2015 Apr;94:9-25. doi: 10.1016/j.phrs.2015.01.003. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25662515.
- Rothschild S, Ciernik IF, Hartmann M, Schuknecht B, Lütolf UM, Huber AM. Cholesteatoma triggering squamous cell carcinoma: case report and literature review of a rare tumor. *Am J Otolaryngol.* 2009 Jul-Aug;30(4):256-60. doi: 10.1016/j.amjoto.2008.06.011. Epub 2009 Feb 6. PMID: 19563937.
- Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8118-21. PMID: 11719439.
- Sadler TW. *Langman's medical embryology.* 14th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
- Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol.* 2004 Jul 15;22(14):2954-63. doi: 10.1200/JCO.2004.02.141. PMID: 15254063.
- Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell.* 1994 Apr 8;77(1):121-31. doi: 10.1016/0092-8674(94)90240-2. PMID: 7512450.
- Schwab M. 2004. "MYCN in neuronal tumours", *Cancer letters*, 204(2), 179–187.

- Scott EM, Halees A, Itan Y, Spencer EG, He Y, Azab MA, Gabriel SB, Belkadi A, Boisson B, Abel L, Clark AG; Greater Middle East Variome Consortium, Alkuraya FS, Casanova JL, Gleeson JG. Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery. *Nat Genet.* 2016 Sep;48(9):1071-6. doi: 10.1038/ng.3592. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27428751; PMCID: PMC5019950.
- Shaoul R, Papsin B, Cutz E, Durie P. Congenital cholesteatoma in a child carrying a gene mutation for adenomatous polyposis coli. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999 Jan;28(1):100-3. doi: 10.1097/00005176-199901000-00023. PMID: 9890479.
- Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, Day IN, Gaunt TR. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat.* 2013 Jan;34(1):57-65. doi: 10.1002/humu.22225. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23033316; PMCID: PMC3558800.
- Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W452-7. doi: 10.1093/nar/gks539. Epub 2012 Jun 11. PMID: 22689647; PMCID: PMC3394338.
- Skapek SX, Jansen D, Wei TF, McDermott T, Huang W, Olson EN, Lee EY. Cloning and characterization of a novel Kruppel-associated box family transcriptional repressor that interacts with the retinoblastoma gene product, RB. *J Biol Chem.* 2000 Mar 10;275(10):7212-23. doi: 10.1074/jbc.275.10.7212. PMID: 10702291.
- Soldati D, Mudry A. Knowledge about cholesteatoma, from the first description to the modern histopathology. *Otol Neurotol.* 2001 Nov;22(6):723-30. doi: 10.1097/00129492-200111000-00003. PMID: 11698787.
- Standring S, Neel A, Rolfe B, Patricia C, Alan RC, Michael G, et al. *Gray's Anatomy: the anatomical basis of clinical practice.* 41th edition. Philadelphia: Elsevier; 2016.
- Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell.* 2014 Mar 17;25(3):272-81. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.017. PMID: 24651010.

- Stredrick DL, Garcia-Closas M, Pineda MA, Bhatti P, Alexander BH, Doody MM, Lissowska J, Peplonska B, Brinton LA, Chanock SJ, Struwing JP, Sigurdson AJ. The ATM missense mutation p.Ser49Cys (c.146C>G) and the risk of breast cancer. *Hum Mutat.* 2006 Jun;27(6):538-44. doi: 10.1002/humu.20323. PMID: 16652348; PMCID: PMC1850333.
- Sudhoff H, Dazert S, Gonzales AM, Borkowski G, Park SY, Baird A, Hildmann H, Ryan AF. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 2000 Nov;21(6):793-8. PMID: 11078065.
- Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:978312. doi: 10.1155/2011/978312. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21765642; PMCID: PMC3134396.
- Takahashi K, Yamamoto Y, Sato K, et al. Middle ear carcinoma originating from a primary acquired cholesteatoma: a case report. *Otol Neurotol* 2005;26:105-8.
- Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, Zampino G, Burgt Iv, Palleschi A, Petrucci TC, Sorcini M, Schoch C, Foa R, Emanuel PD, Gelb BD. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet.* 2006 Feb;78(2):279-90. doi: 10.1086/499925. Epub 2005 Dec 7. PMID: 16358218; PMCID: PMC1380235.
- Tekin M, Çelik S. Kolesteatoma epidemiyolojisi ve predispoze faktörler. Topçu İ, editör. Kolesteatomalı Kronik Otitis Media ve Komplikasyonlarına Cerrahi Yaklaşım. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. p.1
- Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer.* 2015 Jul 28;113(3):365-71. doi: 10.1038/bjc.2015.233. Epub 2015 Jul 7. PMID: 26151455; PMCID: PMC4522639.
- Tong J, Tan S, Zou F, Yu J, Zhang L. FBW7 mutations mediate resistance of colorectal cancer to targeted therapies by blocking Mcl-1 degradation. *Oncogene.* 2017 Feb 9;36(6):787-796. doi: 10.1038/onc.2016.247. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27399335; PMCID: PMC5226932.

- Tsao MS, Liu N, Chen JR, Pappas J, Ho J, To C, Viallet J, Park M, Zhu H. Differential expression of Met/hepatocyte growth factor receptor in subtypes of non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. 1998 Apr;20(1):1-16. doi: 10.1016/s0169-5002(98)00007-5. PMID: 9699182.
- Van Allen EM, Golay HG, Liu Y, Koyama S, Wong K, Taylor-Weiner A, Giannakis M, Harden M, Rojas-Rudilla V, Chevalier A, Thai T, Lydon C, Mach S, Avila AG, Wong JA, Rabin AR, Helmkamp J, Sholl L, Carter SL, Oxnard G, Janne P, Getz G, Lindeman N, Hammerman PS, Garraway LA, Hodi FS, Rodig SJ, Dranoff G, Wong KK, Barbie DA. Long-term Benefit of PD-L1 Blockade in Lung Cancer Associated with JAK3 Activation. *Cancer Immunol Res*. 2015 Aug;3(8):855-63. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0024. Epub 2015 May 26. PMID: 26014096; PMCID: PMC4527885.
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Dec 2;363(23):2191-9. doi: 10.1056/NEJMoa1000584. Epub 2010 Nov 17. PMID: 21083380; PMCID: PMC3107972.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1546-58. doi: 10.1126/science.1235122. PMID: 23539594; PMCID: PMC3749880.
- Vorechovský I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarström L, Webster AD, Yuille MA. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):96-9. doi: 10.1038/ng0997-96. PMID: 9288106..
- Walters DK, Mercher T, Gu TL, O'Hare T, Tyner JW, Loriaux M, Goss VL, Lee KA, Eide CA, Wong MJ, Stoffregen EP, McGreevey L, Nardone J, Moore SA, Crispino J, Boggon TJ, Heinrich MC, Deininger MW, Polakiewicz RD, Gilliland DG, Druker BJ. Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2006 Jul;10(1):65-75. doi: 10.1016/j.ccr.2006.06.002. PMID: 16843266.

- Wang B, Hurov K, Hofmann K, Elledge SJ. NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes Dev.* 2009 Mar 15;23(6):729-39. doi: 10.1101/gad.1770309. Epub 2009 Mar 4. PMID: 19261749; PMCID: PMC2661606.
- Wang X, Lee RS, Alver BH, Haswell JR, Wang S, Mieczkowski J, Drier Y, Gillespie SM, Archer TC, Wu JN, Tzvetkov EP, Troisi EC, Pomeroy SL, Biegel JA, Tolstorukov MY, Bernstein BE, Park PJ, Roberts CW. SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. *Nat Genet.* 2017 Feb;49(2):289-295. doi: 10.1038/ng.3746. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27941797; PMCID: PMC5285474.
- Wein L, Savas P, Van Geelen C, Caramia F, Moodie K, Joshi S, Loi S. FGFR2 amplification in metastatic hormone-positive breast cancer and response to an mTOR inhibitor. *Ann Oncol.* 2017 Aug 1;28(8):2025-2027. doi: 10.1093/annonc/mdx194. PMID: 28430863.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995 May 5;81(3):323-30. doi: 10.1016/0092-8674(95)90385-2. PMID: 7736585.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Nov;5(11):875-85. doi: 10.1038/nrm1498. PMID: 15520807.
- Westerberg J, Tideholm E, Piersiala K, Drakskog C, Kumlien Georén S, Mäki-Torkko E, Cardell LO. JAK/STAT Dysregulation With SOCS1 Overexpression in Acquired Cholesteatoma-Adjacent Mucosa. *Otol Neurotol.* 2021 Jan;42(1):e94-e100. doi: 10.1097/MAO.0000000000002850. PMID: 33201080.
- Westerman ST, Sylvia LC, Tepper E. Carcinoma arising out of a primary acquired cholesteatoma. *J Med Soc N J* 1981;78:600-2.
- Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The role of Src in solid tumors. *Oncologist.* 2009 Jul;14(7):667-78. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0009. Epub 2009 Jul 6. PMID: 19581523; PMCID: PMC3303596.
- Wilson PJ, McGlinn E, Marsh A, Evans T, Arnold J, Wright K, Biden K, Young J, Wainwright B, Wicking C, Chenevix-Trench G. Sequence variants of DLC1 in colorectal and ovarian tumours. *Hum Mutat.* 2000;15(2):156-65. doi:

- 10.1002/(SICI)1098-1004(200002)15:2<156::AID-HUMU4>3.0.CO;2-4. PMID: 10649492.
- Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, Liu W. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: Roles of cell proliferation signal pathways. *Laryngoscope*. 2016 Aug;126(8):1923-30. doi: 10.1002/lary.25834. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26989841.
- Xu X, Jin D, Durgan J, Hall A. LKB1 controls human bronchial epithelial morphogenesis through p114RhoGEF-dependent RhoA activation. *Mol Cell Biol*. 2013 Jul;33(14):2671-82. doi: 10.1128/MCB.00154-13. Epub 2013 May 6. PMID: 23648482; PMCID: PMC3700127.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710. PMID: 19228619; PMCID: PMC2820383.
- Yildirim MS, Ozturk K, Acar H, Arbag H, Ulku CH. Chromosome 8 aneuploidy in acquired cholesteatoma. *Acta Otolaryngol*. 2003 Apr;123(3):372-6. doi: 10.1080/00016480310001286. PMID: 12737293.
- Yin C, Sandoval C, Baeg GH. Identification of mutant alleles of JAK3 in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015 May;56(5):1502-6. doi: 10.3109/10428194.2014.957204. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25146434.
- Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res*. 1998 May 15;58(10):2196-9. PMID: 9605766..
- Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol*. 2017 Jun 2;429(11):1595-1606. doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.030. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28390900; PMCID: PMC5663274.

- Yune TY, Byun JY. Expression of PTEN and phosphorylated Akt in human cholesteatoma epithelium. *Acta Otolaryngol.* 2009 May;129(5):501-6. doi: 0.1080/00016480802258802. PMID: 18615333.
- Yung M, Tono T, Olszewska E, Yamamoto Y, Sudhoff H, Sakagami M, Mulder J, Kojima H, İncesulu A, Trabalzini F, Özgirgin N. EAONO/JOS Joint Consensus Statements on the Definitions, Classification and Staging of Middle Ear Cholesteatoma. *J Int Adv Otol.* 2017 Apr;13(1):1-8. doi: 10.5152/iao.2017.3363. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28059056.
- Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem.* 2006 Jun 9;281(23):15694-700. doi: 10.1074/jbc.M601252200. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16597617; PMCID: PMC2080618.
- Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci.* 2018 Jan 12;14(2):111-123. doi: 10.7150/ijbs.23230. PMID: 29483830; PMCID: PMC5821033.
- Zhu A, Li X, Wu H, Miao Z, Yuan F, Zhang F, Wang B, Zhou Y. Molecular mechanism of SSFA2 deletion inhibiting cell proliferation and promoting cell apoptosis in glioma. *Pathol Res Pract.* 2019 Mar;215(3):600-606. doi: 10.1016/j.prp.2018.12.035. Epub 2018 Dec 31. PMID: 30712887.

Ek-1









