



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİMDALI

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM TANILI OLGULARDA YENİ NESİL DİZİLEME İLE SAPTANAN MUTASYON PROFİLİ VE KLİNİKOPATOLOJİK KORELASYONU

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel OSMAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim METEOĞLU

AYDIN-2022

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM TANILI
OLGULARDA YENİ NESİL DİZİLEME İLE
SAPTANAN MUTASYON PROFİLİ VE
KLİNİKOPATOLOJİK KORELASYONU**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Sibel OSMAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim METEOĞLU

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Başta tez çalışmamın kurgulanması ve yazım aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. İbrahim METEOĞLU olmak üzere uzmanlık eğitimim süresince geniş bilgi ve tecrübelerinden faydalanma fırsatı bulduğum saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Nil ÇULHACI, Prof. Dr. Füzûzan KACAR DÖGER, Prof. Dr. Canten TATAROĞLU, Doç. Dr. İbrahim Halil ERDOĞDU, Doç. Dr. Nesibe KAHRAMAN ÇETİN'e,

Birlikte çalışmaktan gurur duyduğum, dostluklarını ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma, bir parçası olmaktan her zaman mutluluk duyduğum bu güzel ekibin tamamına,

Bu zahmetli süreçte desteğini, sabrını ve sevgisini esirgemeyen Dr. Hüsnü Onur DURMAZ'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca olduğu gibi zorlu asistanlık sürecinde de koşulsuz desteklerini hissettiğim kendilerine benzemekten gurur duyduğum, azim ve kararlılıklarını örnek aldığım annem Sabriye OSMAN ve babam Ahmed OSMAN'a, benim için her şeyin en iyisini dilediğini bildiğim güzel yürekli kardeşim Ertan OSMAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Sibel OSMAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kolorektal Adenokarsinom Epidemiyolojisi	2
2.2. Kolorektal Karsinogenez	2
2.2.1. Kromozomal İnstabilite (CIN) Yolağı.....	3
2.2.2. Mikrosatellit İnstabilite (MSI) Yolağı	5
2.2.3. Polimeraz Epsilon (POLE) Yolağı	9
2.3. Kolorektal Karsinomlarda Diferansiyasyon (Derecelendirme).....	10
2.4. Kolorektal Karsinomlarda Prognostik Faktörler	10
2.5. Çalışmaya Dahil Edilen İlgili Genler	11
2.5.1. V-Akt Murin Timoma Viral Onkogen Homolog 1 Kinaz (AKT1).....	11
2.5.2. Adenomatöz Polipozis Koli (APC)	12
2.5.3. Ataksi Telenjiyektazi Mutant (ATM).....	14
2.5.4. B Hücreli Lenfoma 2 (BCL2) İlişkili X (BAX)	15
2.5.5. V-Raf Murin Sarkom Viral Onkogen Homolog B 1 (BRAF).....	15
2.5.6. Meme Kanseri Yatkınlık Geni Tip 1 (BRCA1) ve Meme Kanseri Yatkınlık Geni Tip 2 (BRCA2).....	17
2.5.7. Kaspaz 8 (CASP8).....	17
2.5.8. Hücre Bölünme Döngüsü 27 (Cell Division Cycle 27, CDC27).....	18
2.5.9. Siklin Bağımlı Kinaz 4 (CDK4)	18

2.5.10. Deleted in Colorectal Cancer (DCC).....	19
2.5.11. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)	20
2.5.12. Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EPCAM)	21
2.5.13. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (ERBB2, EGFR2, HER2).....	22
2.5.14. F-Box and WD-40 Domain Containing Protein (FBXW7).....	23
2.5.15. V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog (Protoonkogen C-Kit, KIT)	24
2.5.16. Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-oncogene (KRAS).....	25
2.5.17. Mezenkimal-Epitelyal Transizyon Tirozin Kinaz Reseptör (MET, c-MET)	27
2.5.18. MutL Homolog 1 (MLH1), MutL Homolog 3 (MLH3), MutS Homolog 2 (MSH2), MutS Homolog 3 (MSH3), Postmeiotic Segregation Increased 1 Homolog 2 (PMS1 Homolog 2, PMS2).....	28
2.5.19. Neuroblastom RAS Viral (V-Ras) Onkogen Homolog (NRAS)	29
2.5.20. Fosfotidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz Katalitik Subunit Alfa (PIK3CA)	30
2.5.21. Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN)	31
2.5.22. Rearranged During Transfection (RET)	32
2.5.23. Tansforme Edici Büyüme Faktör Beta Reseptör 2 (TGFB2), Sma ve Mad İlişkili Protein 2 (SMAD2), Sma ve Mad İlişkili Protein 4 (SMAD4)	33
2.5.24. Tümör Protein P53 (TP53)	34
3. MATERYAL VE METOD	36
3.1. Olguların Seçilmesi	36
3.2. Yeni Nesil Dizilime Çalışma Yöntemi	36
3.3. Formalin Fikse Parafine Gömülü Dokulardan DNA Ekstraksiyonu	37
3.4. Yeni Nesil Dizileme Kitaplığı Hazırlama ve Sıralama	37
3.5. DATA Analizi	37
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	38

4. BULGULAR	39
4.1. Klinikopatolojik Parametreler ve Gen Mutasyonları Arasındaki İlişki.....	40
4.1.2. Yaş.....	40
4.1.3. Tümör yerleşim yeri	40
4.1.4. Tümör çapı.....	40
4.1.5. Tümör diferansiyasyonu	41
4.1.6. Tümör evresi.....	41
4.1.7. Lenfovasküler invazyon (LVİ)	42
4.1.8. Perinöral invazyon (PNİ).....	42
4.1.9. Lenf nodu metastazı.....	43
4.2. NGS – Gen Mutasyonları ve Aralarındaki İlişki	43
4.2.1. APC Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	45
4.2.2. ATM Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	45
4.2.3. BAX Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi.....	45
4.2.4. BRAF Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	46
4.2.5. BRCA1 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	46
4.2.6. BRCA2 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	46
4.2.7. CDC27 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi.....	46
4.2.8. DCC Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi.....	47
4.2.9. EGFR Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi.....	47
4.2.10. ERBB2 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	47
4.2.11. FBXW7 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	47
4.2.12. KRAS Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	47
4.2.13. MLH3 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	48
4.2.14. MSH2 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	48
4.2.15. MSH3 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	48

4.2.16. MSH6 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	48
4.2.17. NRAS Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi	49
4.2.18. PIK3CA Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi.....	49
4.2.19. PMS2 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi.....	49
4.2.20. PTEN Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi.....	49
4.2.21. SMAD2 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi	49
4.2.22. SMAD4 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi	50
4.2.23. TGFBR2 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi.....	50
4.2.24. TP53 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi	50
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR.....	73
ÖZET.....	80
ABSTRACT	82
KAYNAKLAR.....	84
EKLER	105
Ek 1. Olgu Rapor Formu	105
Ek 2. Etik Kurul Onayı	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kolorektal Kanserde Kromozomal İnstabilitenin Adenom-Karsinom Sekansı (26)	5
Şekil 2. Kolorektal Karsinom Progresyon Modelleri: Kromozomal İnstabilite ve Mikrosatellit İnstabilite (31).....	8
Şekil 3. Kolorektal adenokarsinomun çok aşamalı genetik modelini düzenleyen yollar: Kromozomal İnstabilite (CIN), Mikrosatellit İnstabilite (MSI), CpG ada Metilatör Fenotip (CIMP) Hipermetilasyonu (32)	8
Şekil 4. POL proofreading ve MMR sisteminin DNA polimeraz hatalarını düzelten ortak yolağı (34)	9
Şekil 5. Kolorektal Karsinom riskini artıran DNA Polimeraz POLE ve POLD1 proofreading bozuklukları (34)	10
Şekil 6. AKT Regülasyon Yolağı (36)	12
Şekil 7. WNT/Beta-catenin Sinyal Yolağı (40).....	14
Şekil 8. MAPK Kaskadı (48)	16
Şekil 9. Siklin D-CDK4/6-INK4-Rb Yolağı (60)	19
Şekil 10. EGFR Yapısı (70)	21
Şekil 11. FBXW7 yapısı (78).....	23
Şekil 12. KIT sinyalizasyonu (84).....	25
Şekil 13. RAS'ın major sinyal yolları (86)	26
Şekil 14. PIK3CA tarafından kodlanan PI3K katalitik subuniti ve PI3K/AKT/mTOR yolağı (104)	30
Şekil 15. Mutant genlerin dağılımı.....	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. NGS ile çalışılan kolorektal panel genleri.....	36
Tablo 2. Olguların klinikopatolojik özellikleri ve dağılımları.....	39
Tablo 3. Birlikte mutasyonu saptanan genler	44
Tablo 4. Uluslararası Literatür, Ulusal Literatür ve Mevcut Çalışmada Saptanan Mutasyon Oranları.....	79



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AKT	: V-Akt Murin Timoma Viral Onkogen Homolog 1
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
APC/C	: Anafaz İlerletici Kompleks/Siklozom
ATM	: Ataksi Telenjektazi Mutant
AURKA	: Aurora A Kinaz
AXIN1	: Axin 1
AXIN2	: Axin 2
BAX	: B Hücreli Lenfoma 2 ilişkili X
BCL2	: B Hücreli Lenfoma 2
BRAF	: Serin/treonin Protein Kinaz B-raf
BRCA1	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni Tip 1
BRCA2	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni Tip 2
CASP8	: Kaspaz 8
CDC27	: Hücre Bölünme Döngüsü 27
CDK4	: Siklin Bağımlı Kinaz 4
CIMP	: CpG Ada Metilatör Fenotip
CIN	: Kromozomal İnstabilite
CtBP	: C terminal Bağlanma Proteini
CTNNB1	: Katenin Beta 1
DCC	: Deleted in Colorectal Cancer (Kolorektal Kanserde Silinen)
Dmmr	: Kusurlu Yanlış Eşleşme Tamiri
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit

EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Transizyon
EPCAM	: Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü
ERBB	: Eritroblastik Onkogen B
ERK	: Extracellular Signal-regulated Kinases (Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazlar)
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FBXW7	: F-Box and WD-40 Domain Containing Protein (F-kutusu / WD Tekrar İçeren Protein 7)
GDNF	: Glial Hücre Derive Nörotropik Faktör
GDP	: Guanozin Difosfat
GIST	: Gastrointestinal Stromal Tümör
GSK3B	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
GTP	: Guanozin Trifosfat
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
HER	: Human Epidermal Growth Factor Receptor (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
HNPCC	: Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanser
INK4	: Siklin Bağımlı Kinaz 4 ve Siklin Bağımlı Kinaz 6 İnhibitörü 4
JNK	: Jun Amino Terminal Kinazlar
KIT	: V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRAS	: Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-oncogene
KRK	: Kolorektal Kanser
LEF	: Lenfoid Güçlendirici Faktör
LOH	: Heterozigosite Kaybı
LVİ	: Lenfovasküler İnvazyon
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz

MEK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz
MET	: Mezenkimal-Epityal Transizyon Tirozin Kinaz
MLH1	: MutL Homolog 1
MLH3	: MutL Homolog 3
MMR	: Mismatch Repair (Yanlış Eşleşme Tamiri)
Mrna	: Messenger Ribonükleik Asit
MSH2	: MutS Homolog 2
MSH3	: MutS Homolog 3
MSH6	: MutS Homolog 6
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite
MSI-H	: Yüksek Mikrosatellik İnstabilite
MSI-L	: Düşük Mikrosatellit İnstabilite
MSS	: Mikrosatellit Stabil
MTOR	: Mammalian Target of Rapamycin (Rapamisinin Mekanik Hedefi)
MVHP	: Mikroveziküler Hiperplastik Polip
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
NGS	: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
NK	: Natural Killer (Doğal Katil)
NRAS	: Neuroblastom RAS Viral (V-Ras) Onkogen Homolog
P53	: Protein 53
PCNA	: Çoğalan Hücre Nükleer Antijeni
PKD1	: 3-Fosfoinozotide Bağımlı Protein Kinaz 1
PI3K	: Fosfoinozitid 3-kinaz
PIK3CA	: Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz
PIP3	: Fosfatidilinozitol trifosfat
PMS2	: Postmeiotic Segregation Increased1 Homolog 2

PNİ	: Perinöral İnvazyon
POLD1	: Polimeraz Delta Katalitik Subunit 1
POLE	: Polimeraz Epsilon
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
RAF	: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RB	: Retinoblastom
RET	: Rearranged During Transfection
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SCF	: Kök Hücre Faktörü
SCNA	: Somatik Kopya Sayısı Değişiklikleri
SMAD2	: Sma ve Mad İlişkili Protein 2
SMAD4	: Sma ve Mad İlişkili Protein 4
SSL	: Sesil Serrated Lezyon
STAT	: Transkripsiyonun Sinyal Transdüser ve Aktivatörleri
TASIN1	: Trunkasyona Uğramış APC Selektif İnhibitörü
TCF	: T Hücre Faktörü
TCF4	: Transkripsiyon Faktör 4
TCGA	: Kanser Genom Atlas
TGFB	:Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TGFBR2	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta Reseptörü 2
TP53	: Tümör Protein 53
TSA	: Traditional Serrated Adenoma
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
WNT	: Wingless Related Integration site

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK) yılda 1.85 milyon yeni vaka ile toplam malignitelerin %10,2'sini oluşturur ve dünya çapında en sık görülen üçüncü malignitedir (1). Yılda 1.03 milyon yeni vaka ile erkeklerde akciğer ve prostat kanserlerinden sonra en sık görülen üçüncü malignitedir. Kadınlarda ise yılda 0.82 milyon yeni vaka ile meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci malignitedir (1). Kolon ve rektum kanserleri, yaklaşık 881.000 ölümle dünya çapında en ölümcül ikinci kanser grubunu oluşturur. Kolon kanseri ise tek başına öngörülen 551.000 ölümle en ölümcül beşinci kanserdir ve tüm ölümlerin %5.8'ini oluşturur (2).

Kolorektal kanser homojen bir hastalık değildir. Kolorektal karsinogenezin farklı moleküler yollarının tanımlanması KRK'nın heterojen doğasını göstermektedir (3, 4). Kolorektal karsinogenezin moleküler temelini anlaşılmaması KRK'nın hem prognozu hem de tedavisi açısından önemli sonuçlara sahiptir (3).

Ülkemizde KRK'ların mutasyon profili ile klinikopatolojik parametrelerle ilişkisine dair yeterli veri bulunmamaktadır. Her geçen gün yeni bir hedefe yönelik tedavi ajanının ortaya çıktığı bu dönemde, doğru hastaya doğru tedavinin uygulanabilmesi için moleküler testler daha da önem kazanmıştır. Moleküler testler sadece tedavi sürecinin belirlenmesinde değil, aynı zamanda tedavi direnç mekanizmalarının anlaşılmasında ve çözümünde, hastalıkların prognozunu tahmininde ve daha da önemlisi kanser patogenezinin anlaşılmasında rol almaktadır. Ülkemizde KRK'ların moleküler verilerinin oluşturulması ve bu verilerin klinik ve patolojik özellikler ile korele edilmesi prognozun öngörülmesi, ilaca spesifik direnç gösteren genlerin tespiti ile hastanın gereksiz ilaç kullanımının engellenmesi, tedavi başarısının artırılması, etkili takip stratejilerinin belirlenmesi, sağkalımın uzaması bakımından önemlidir. Bu çalışmada KRK tanılı olgularda yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) sistemiyle bölümümüzde tespit edilen somatik mutasyonların profilinin belirlenmesi ve bunların oldukça heterojen bir hastalık grubu olan KRK'ların klinikopatolojik parametreleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Literatürde bu alanda oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan bu çalışma ile toplumumuza özgü moleküler değişikliklerin ortaya konması, hem kişiye özgü tedavide yol gösterici olacak, hem de prognoz belirlenmesine önemli katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Adenokarsinom Epidemiyolojisi

Kolorektal kanserde ortalama tanı yaşı kadınlarda 72, erkeklerde 68'dir (1). İnsidans ve ölüm oranı kadınlarda erkeklerden yaklaşık %25 daha düşüktür.(5)Yılda 1.03 yeni vaka ile erkeklerde akciğer ve prostat kanserlerinden sonra en sık görülen üçüncü malignitedir. Kadınlarda ise yılda 0.82 milyon yeni vaka ile meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci malignitedir (1). Kolorektal kanser, yaklaşık 881.000 ölümle dünya çapında en ölümcül ikinci kanserdir. Kolon kanseri öngörülen 551.000 ölümle en ölümcül beşinci kanserdir ve tüm ölümlerin %5.8'ini oluşturur. Rektum kanseri ise tüm ölümlerin %3.2'sini oluşturan 310.000 ölümle en ölümcül onuncu kanserdir (2). Genel olarak kolorektal kanser insidansı tüm popülasyonlarda yaşla birlikte artar. İleri yaşlarda insidans artışında hafif bir düşme gözlenir (6). Her 5 yaş artışında 50 yaşına kadar insidans yaklaşık ikiye katlanır, 55 yaş ve üzerindeki gruplarda ise insidans yaklaşık %30 artmaktadır (7). Kolorektal kanser görülme sıklığı birçok düşük ve orta gelirli ülkede hızla artmakta olsa da yüksek gelirli ülkelerde stabilize durumda veya azalmaktadır (8). Premalign poliplere yönelik 50 yaş ve üzerindeki bireylere uygulanan tarama programları, aynı yaş grubunda görülen KRK insidansındaki düşüşü açıklamaktadır. Bu genel düşüşe karşın tarama programlarının hedeflemediği 50 yaşından daha genç yetişkinlerde KRK insidansının arttığı bildirilmektedir (9).

2.2. Kolorektal Karsinogenez

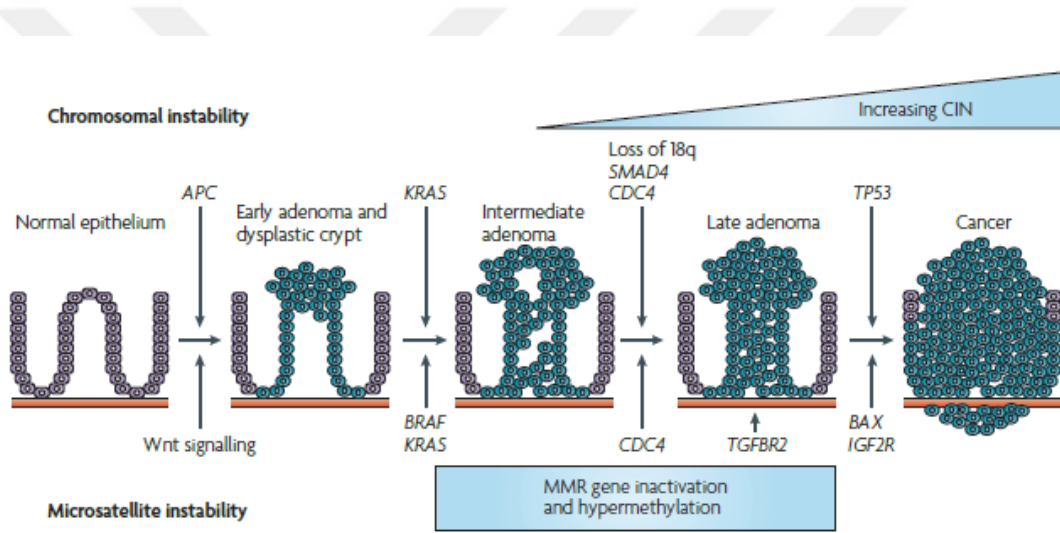
Kolorektal kanserin, karsinogenezinde tanımlanan farklı moleküler yollar ile homojen olmaktan çok heterojen bir doğası olduğu görülmektedir (3, 4). Bu moleküler yolların temelini anlaşılmaması, KRK'nın hem prognozu hem de tedavisinde çok büyük öneme sahiptir. (3). KRK'ların %90'dan fazlasının klasik adenom-karsinom sekansı yoluyla kolorektal adenomlardan geliştiği düşünülmektedir. Bu normal mukozal epitelden adenomlara ve karsinomlara hücrel geçişi içermektedir. Bu durum gelişen tümör hücresi içerisinde genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı birikimi anlamına gelmektedir (10). Kolorektal kanserin önemli bir özelliği üç ana mekanizma ile ortaya çıkan genetik instabilitedir. Bugüne kadar tanımlanmış olan üç farklı moleküler yolak bulunmaktadır: 1) kromozomal instabilite (CIN), 2) mikrosatellit instabilite (MSI) (hipermutant yolak), 3) DNA polimeraz proofreading mutasyonları (ultramutant yolak) (3, 4, 11). Bu yollar birbirini dışlamaz, bazı tümörler birden fazla yolağın özelliklerini gösterebilmektedir (12).

2.2.1. Kromozomal İnstabilite (CIN) Yolağı

Kromozomal instabilite KRK'daki genomik instabilitenin en yaygın nedenidir. Sporadik KRK'ların yaklaşık %84'ünden sorumlu CIN delesyonlar, kazanımlar, translokasyonlar ve diğer kromozomal rearanjmanlar yoluyla kromozom sayısında ve yapısında gerçekleşen büyük değişikliklerle karakterizedir. Bunlar, adenom-karsinom sekansı ile gelişen çoğu tümörün ayırt edici özelliği olan yüksek seviyelerde DNA somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA) olarak saptanmaktadır (3, 4). CIN ile gelişen tümörler APC, KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-oncogene), PIK3CA (Fosfotidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz), BRAF (Serin/treonin Protein Kinaz B-raf), SMAD4 (Sma ve Mad ilişkili Protein 4), TP53 gibi spesifik onkogenlerde ve tümör supresör genlerde oluşan mutasyonların birikimi ile ayırt edilmektedir (13). Bu yolağın aydınlatılması, ailesel adenomatöz polipozisten (FAP) sorumlu gen olan Adenomatöz Polipozis Koli (APC) geninin bulunmasıyla gerçekleşmiştir. APC geni 5. kromozomun uzun kolunda bulunmakta ve kolondaki hücresel proliferasyonun bekçisi olarak tanımlanmaktadır (14). APC inaktivasyonu adenom oluşumunun ana yolağını temsil etmektedir. APC değişiklikleri adenomların ve karsinomların yaklaşık %80'inde bulunan genellikle APC fonksiyonunu inaktive edici mutasyonlardır ve sekansta çok erken meydana geldiği kabul edilmektedir (10). APC geninin fonksiyon görmemesi için her iki allelin de kaybı gerekmektedir (3). Tüm KRK vakalarının yaklaşık %90'ında olduğu gibi APC mutasyonları KRK gelişiminde merkezi bir rol oynayan Wntless-related integration site (Wnt) sinyal yolağını aktive etmektedir (15). Beta-catenin'e bağlanarak Beta-catenin degradasyonunu indüklemekte, böylece negatif Beta-catenin regülatörü görevi görmektedir. Mutasyon, heterozigosite kaybı veya promoter metilasyonu yoluyla APC fonksiyonunun kaybı stoplazmik Beta-catenin birikimine, ardından Beta-cateninin nükleusa translokasyonuna neden olmaktadır. Beta-cateninin nükleusa translokasyonu, transkripsiyon faktörlerinden T hücre faktörü (TCF) ve Lenfoid güçlendirici faktör (LEF) ailesi ile heterodimerleşmesiyle sonuçlanmaktadır (3, 16). Bu durum, Wnt sinyali tarafından düzenlenen ve tümörögenезis ile ilişkili genlerin yapısal aktivasyonuna neden olmaktadır (16). APC'de fonksiyonunun kaybı Wnt aktivasyonuna için tek tetikleyici değildir. Diğer tetikleyiciler arasında Beta-catenini degradasyona dirençli hale getiren Beta-catenin mutasyonları, Axin 1 (AXIN1), Axin 2 (AXIN2), Catenin Beta 1 (CTNNB1) mutasyonları ve Transkripsiyon Faktör 4 (TCF4) mutasyonları bulunmaktadır (17). Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ve Fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) yollarının her ikisi de hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır. KRAS, BRAF ve PIK3CA mutasyonları

kolorektal tümör oluşumunda MAPK/PI3K yollarını en sık etkileyen mutasyonlardır. KRK'ların yaklaşık %40'ı KRAS mutasyonlarını barındırmaktadır ve bunun çoğunlukta adenom progresyonunun erken aşamalarında meydana geldiği düşünülmektedir (10, 18). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal ağının aşağı akış bileşeni olan KRAS gen ürünü, hücre yüzeyinden nükleusa büyümeyi destekleyen sinyalleri kontrol etmektedir. Sinyalleri iletmek için KRAS'ın, guanozin trifosfata (GTP) bağlanarak etkinleştirilmesi gerekmektedir. Aktif GTP'ye bağlı KRAS yirmiden fazla efektör protein ile etkileşime girmekte ve aktif forma geçiş normalde EGFR gibi büyüme faktörü reseptörleri aktive edildiğinde gerçekleşmektedir. KRAS mutasyonları meydana geldiğinde KRAS proteinini EGFR'den bağımsız olarak fonksiyonel olarak aktif kalmakta ve Ras/Raf/MAP/MEK/ERK aşağı akış yollarının yapısal aktivasyonuna yol açmaktadır (19). KRAS ayrıca, V-Akt Murin Timoma Viral Onkogen Homolog 1 (AKT) sinyalizasyonunun aktivasyonu aracılığıyla apoptozun baskılanması için PI3K yolağını beslemektedir (10). BRAF gen ürünü B-raf RAS Guanozin trifosfataz (GTPaz) tarafından aktive edilmekte ve EGFR aracılı MAPK yolağında önemli bir eleman olarak bulunmaktadır (19). KRK'ların yaklaşık %8'i KRAS mutasyonları ile birbirini dışlayan bir BRAF nokta mutasyonunu bulundurmaktadır. PIK3CA, EGFR'nin aşağı akışındaki PI3K sinyal yolağının vazgeçilmez bir elemanıdır. PIK3CA mutasyonu PI3K sinyal yolağını etkinleştirerek hücre proliferasyonunu artırmakta ve sonuç olarak karsinogeneze yol açmaktadır (20). PIK3CA'daki aktive edici mutasyonlar adenom-karsinom sekansında geç ortaya çıkmakta ve KRK'ların %10-20'sinde bulunmaktadır. PIK3CA'daki işlev kazanım mutasyonları Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) aracılığıyla AKT'yi etkinleştirmekte ve hücre proliferasyonunu artırmaktadır (16, 18). Tümör Protein 53 (TP53) en önemli tümör supresör genlerden biridir ve hücre siklus kontrol noktasının ana düzenleyicisidir (21). Kromozom 17'nin kısa kolu üzerinde bulunmakta ve en sık mutasyona uğrayan gen olarak bilinmektedir. TP53 gen ürünü olan protein 53 (P53), DNA onarımını ve oksidatif strese hücre yanıtını düzenleyen genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Kolorektal karsinomlarda mikroskobik invaziv karsinom odakları olan adenomlara göre, invaziv adenomlarda ise benign adenomlara göre P53'teki işlev kaybı değişikliklerine daha sık rastlanmaktadır (22). TP53 mutasyonlarının sıklığı ve lezyon evresi arasındaki bu ilişki, P53'ün mutant formlarının tümörögenезin geç bir aşamasında tümör gelişimini teşvik ettiğini göstermektedir. CIN tümörlerin yaklaşık %60'ında TP53'te inaktivasyon mutasyonları bulunmaktadır (16). TP53, APC genine benzer şekilde non-hipermute KRK'larda hipermute KRK'lara göre daha sık mutasyona uğramaktadır (23). Yalnızca TP53 aktivitesindeki kayıplar değil aynı zamanda işlev

kazanımı mutasyonları da tümör progresyonunu ve invazyonunu destekleyen tümörün metabolik yeniden programlanmasına aracılık etmektedir (20). Transforme edici büyüme faktörü beta (TGFB) sinyalizasyonu, tümör oluşumunu, tümör progresyonunu düzenlemekte ayrıca metastazda, özellikle epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT) indükleyicisi olarak görev almaktadır (24). Transforme edici büyüme faktör reseptörü 2 (TGFB2), SMAD Family Member 2 (SMAD2) ve SMAD Family Member 4 (SMAD4) dahil olmak üzere bu yolağın üyelerindeki mutasyonlar KRK'da yaygın olarak görülmektedir. KRK'ların yaklaşık %30'unda TGFB2 mutasyonları bulunmaktadır (25). SMAD4 proteini bir tümör supresör ve TGFB yolağının kritik bir düzenleyicisidir. SMAD4 mutasyonu bulunan hücreler kontrol dışı çoğalmakta ve bu mutasyon EMT ve metastatik süreçte büyük ölçüde yer almaktadır. Bu mutasyon KRK'lı hastaların %10-20'sinde bulunmaktadır (19).



Şekil 1. Kolorektal Kanserde Kromozomal İnstabilitenin Adenom-Karsinom Sekansı (26)

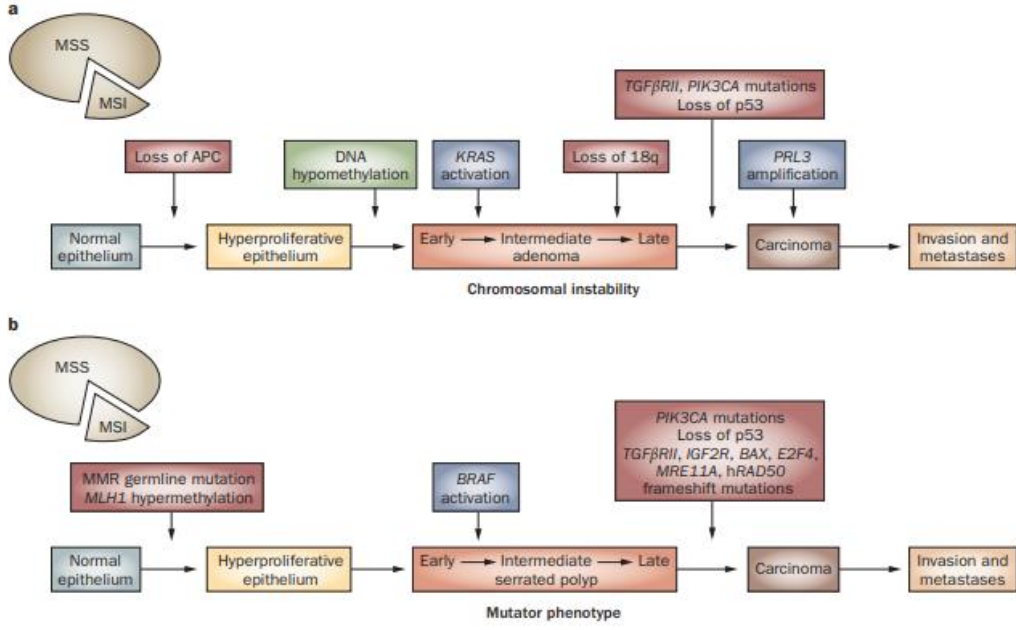
2.2.2. Mikrosatellit İnstabilite (MSI) Yolağı

Mikrosatellitler tüm genom boyunca yayılan ve tekrarlayan yapılarından dolayı replikasyon sırasında hatalara yatkın olan kısa tekrarlı nükleotid dizileridir. Mikrosatellitler insan genomunun yaklaşık %3'ünü oluşturmakta ve yüksek oranda mutasyon bulundurmaya yatkındırlar. Yanlış eşleşme tamir (Mismatch repair, MMR) sistemi DNA replikasyonu sırasında meydana gelen baz çifti uyumsuzluklarını tanımakta ve onarmaktadır. Mikrosatellit instabilitesi MMR sisteminin replikasyon sırasında meydana gelen hataları düzeltmedeki yetersizliğinin bir göstergesi olup mikrosatellitlerde çerçeve kayması mutasyonları ile tanınmaktadır. MMR genlerinin somatik mutasyon veya hipermetilasyon ile susturulması sporadik KRK'ların yaklaşık %15'inde görülmektedir (3, 19). Sporadik

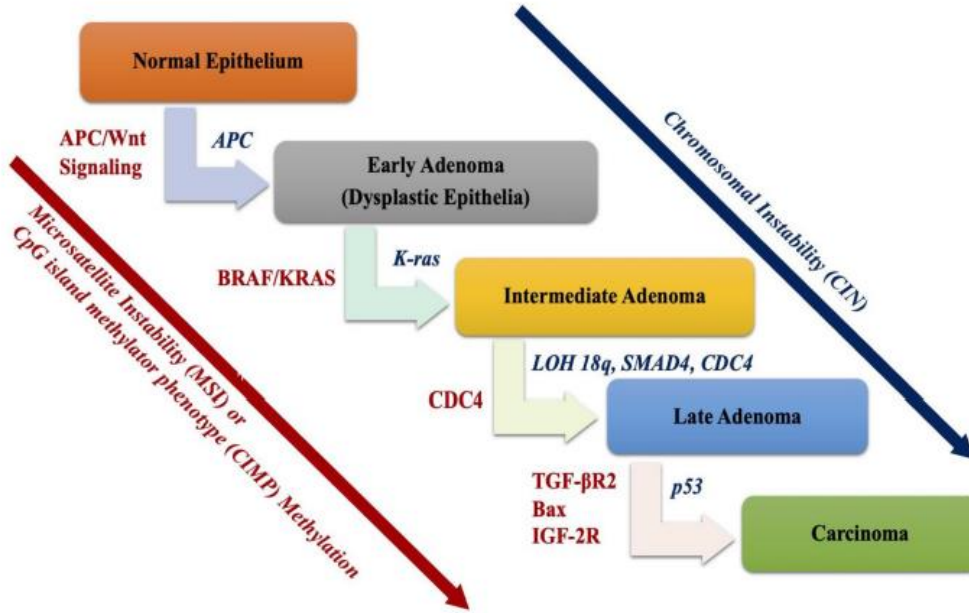
KRK'lerde MMR kusurunun en yaygın nedeni DNA MMR geni MutL Homolog 1 (MLH1)'in promoterhipermetilasyon aracılığıyla epigenetik susturulmasıdır. MSI genellikle MMR genlerinin anormal promoter hipermetilasyonu (MSI KRK'ların %80'i; en sık MLH1) veya MLH1, MutS Homolog 2 (MSH2), MutS Homolog 6 (MSH6) ve Postmeiotic Segregation Increased 1 Homolog 2 (PMS1 Homolog 2, PMS2)'yi içeren MMR genlerinin mutasyonlar nedeniyle inaktivasyonundan (MSI KRK'ların %20'si) kaynaklanmaktadır (20). MSI durumu Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI)/Bethesda Konsensus kılavuzları tarafından tanımlanmış olan standart bir mikrosatellit belirteç paneli kullanılarak belirlenmektedir. Belirleyici genlerin %30 veya daha fazlasında çerçeve kayması bulunan tümörler yüksek-MSI (MSI-H) olarak sınıflandırılmaktadır. Belirleyici genlerin %30'undan azında çerçeve kayması mutasyonlarına sahip tümörler düşük-MSI (MSI-L) olarak sınıflandırılmaktadır. İstabilite bulunmayan tümörler mikrosatellit stabil (MSS) kabul edilmektedirler (27). Sporadik MSI-H tümörlerde sıklıkla BRAFV600E mutasyonu görülmektedir. MMR kusuru olan kanserlerin en uygun tespiti, sporadik MSI-H KRK'ların yaklaşık %80-90'ında bulunan spesifik BRAFV600E mutasyonunun saptanmasıyla gerçekleştirilmektedir. MSI-H tümörlerde daha az heterozigosite kaybı görülmektedir ve MSI-H tümörler diploid olma eğilimindedir. CIN yoluyla gelişen KRK'lara kıyasla APC, KRAS ve TP53 mutasyonları daha az bulunmaktadır (3, 16, 20). Kolonik epitelyal hücre proliferasyonunu önleyen bir proteini kodlayan TGFBR2 genindeki mutasyonlar da MSI'ye neden olan mutasyonlar arasında bulunmaktadır. TGFBR2, MSI KRK'ların %90'ından fazlasında mutasyona uğramıştır. Bu nedenle MSI için olası bir mekanizmayı temsil ettiği düşünülmektedir (28). MSI yolağı aracılığıyla tümörojenezi başlatan olaylar değişiklik gösterebilmektedir. MSI tümörlerin %35-50'sinde APC mutasyonları bulunabilmekte bu nedenle adenom formasyonunu başlatıcı olay CIN ve MSI tümörlerde ortak olabilmektedir. Ancak başlatıcı bir BRAF mutasyonu yoluyla farklı bir MSI tümör dizisi de gelişebilmektedir (16, 23).

Epigenetik değişiklikler, belirli bir genin DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonunda veya işlevindeki değişiklikleri ifade etmektedir. İnsanlardaki epigenetik değişikliklere genellikle DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları neden olmaktadır. Gen promoter bölgesinin metilasyonu, genin susturulmasına neden olmakta, dolayısıyla tümör supresör genlerin fonksiyon kaybı için alternatif bir mekanizma sağlamaktadır (29). Transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG adalarının hipermetilasyonu tümör supresör genlerin susturulmasından sorumlu sıklıkla karşılaşılan bir mekanizmadır. Bu durum genom boyunca meydana geldiğinde CpG ada

metilatör fenotip (CIMP) olarak isimlendirilmektedir (15). Sporadik KRK'ların %15'i CIMP kategorisine girmekte ve genlerin CpG adalarının epigenetik metilasyonu ile gen ekspresyonunun susturulmasına neden olmaktadır (25). CIMP'de birden fazla gende eşzamanlı hipermetilasyon vardır (3). Sporadik KRK'larda CIMP ve MSI yolları arasında örtüşme bulunmaktadır (25). Çoğu CIMP pozitif KRK, MSI tümör fenotipi segilemekte ve CIMP pozitif KRK'ların klinikopatolojik özellikleri MSI KRK'larla örtüşmektedir. CIMP pozitif MSI KRK'lara benzer şekilde, CIMP pozitif MSS KRK'lar da yüksek sıklıkta BRAFV600E mutasyonu ile karakterizedir. APC mutasyonları ve WNT/CTNNB1 sinyal yollarının aktivasyonu ile CIMP arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır (20). CIMP ve MSI tipik olarak hipermutatör tümörler olup 700 veya daha fazla mutasyon bulundurmakta iken CIN ile gelişen tümörlerde tümör başına 60-100 mutasyon bulunmaktadır (25). CIMP pozitif KRK'lar sessiz serrated lezyonlar (SSL) gibi prekürsör bir serrated lezyondan kaynaklanmakta ve BRAF mutasyonları sergilemektedirler. SSL gibi CIMP pozitif KRK'ların prekürsörlerini endoskopik olarak tespit etmek zor olduğundan kolonoskopiden sonraki beş yıl içerisinde tanı alan KRK'ların CIMP pozitif olması muhtemeldir (3, 20). Serrated yolak kolorektal karsinogenezin farklı bir mekanizmasıdır, bu yolak aracılığı ile gelişen tümörler moleküler açıdan heterojendir ve karakteristik mutasyonlara göre kolaylıkla sınıflandırılmamaktadır (4, 16). Serrated yolağın ayırt edici bir özelliği MAPK yolağının komponenti olan BRAF'taki aktive edici V600E mutasyonudur. Mikroveziküler hiperplastik poliplerin (MVHP) büyük bir kısmı BRAF mutasyonları içermekte, bu nedenle bu mutasyonun serrated yolakta erken dönemde meydana geldiğine ve MAPK-ERK yolağının aktivasyonuna, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olduğuna inanılmaktadır (30). BRAF çoğu SSL'de mutant olarak bulunmakta ancak konvansiyonel adenomlarda nadiren mutasyona uğramaktadır. Bu da serrated yolağın KRK gelişimi için alternatif bir yol olduğunu desteklemektedir (16). Serrated neoplazide iki premalign prekürsör lezyon Traditional serrated adenomlar (TSA) ve SSL'lerdir. TSA daha çok distal kolon yerleşimli olup sıklıkla KRAS (yaklaşık %80) veya daha az sıklıkta BRAF (%20-30) mutasyonları bulundurmaktadırlar. Mikrosatellit stabil (MSS) ya da MSI-L lezyonlardır. SSL'ler sıklıkla proksimal kolonda ortaya çıkmakta ve yaklaşık %80 oranında BRAF mutasyonları bulundurmaktadırlar. CIMP SSL'lerin erken bir özelliği olup sıklıkla MLH1 promotor hipermetilasyonu nedeniyle MSI'ye neden olmaktadır (4).



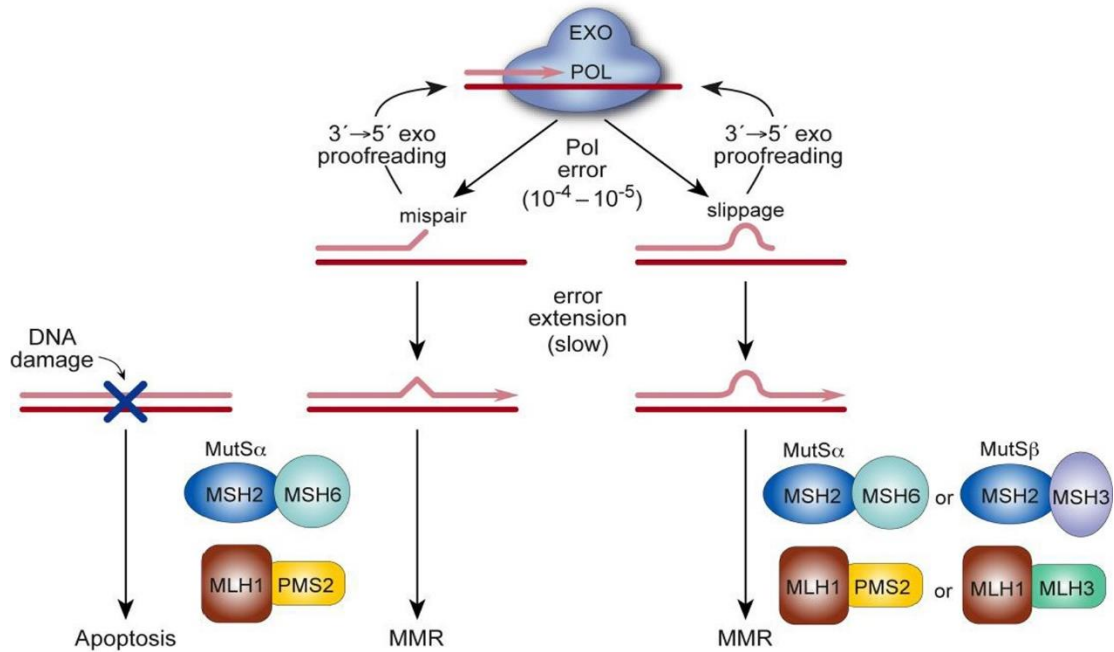
Şekil 2. Kolorektal Karsinom Progresyon Modelleri: Kromozomal İnstabilite ve Mikrosatellit İnstabilite (31)



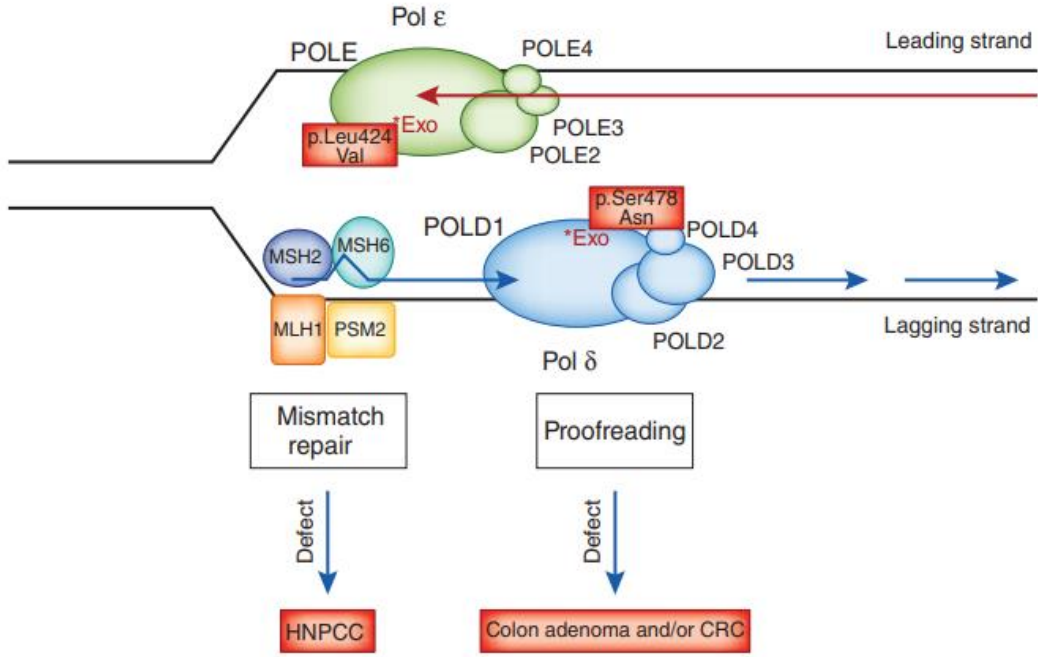
Şekil 3. Kolorektal adenokarsinomun çok aşamalı genetik modelini düzenleyen yollar: Kromozomal İnstabilite (CIN), Mikrosatellit İnstabilite (MSI), CpG ada Metilatör Fenotip (CIMP) Hipermetilasyonu (32)

2.2.3. Polimeraz Epsilon (POLE) Yolağı

Kanser Genom Atlas çalışmasında ultramutasyona uğramış KRK'larda Polimeraz Epsilon (POLE) mutasyonları tanımlanmıştır (23). POLE nükleer DNA'nın replikasyonundan sorumlu olan, DNA onarım sürecinin sentez aşamasında yer alan ve rekombinasyonda da önemli rol oynayan üç polimerazdan (DNA Polimeraz Alfa Katalitik Subunit 1 (POLA1), DNA Polimeraz Delta Katalitik Subunit 1 (POLD1), DNA Polimeraz Epsilon (POLE)) birini kodlamaktadır. Somatik POLE mutasyonları, MSS ultramutasyonlu KRK'lara neden olmaktadır. Tümörogeneizde POLE mutasyonlarının önemi endometriyal kanserler ve KRK'larda gösterilmiştir. POLE veya POLD1 mutasyonu bulunan tümörler MSS olmalarına karşın son derece yüksek mutasyon frekansı (genom başına 1 milyondan fazla) ile karakterizedir. POLE mutant bir KRK, MSS fenotipe sahip klasik KRK'dakinin aksine ultramutasyonlu ancak MSS fenotipi temsil etmektedir (20, 33). APC mutasyonları bu yolaktaki başlatıcı olay gibi görünmektedir ancak bu hipermutasyona uğramış ortamda gelişen aşağı akış mutasyonlarının tam spektrumu henüz açıklanamamaktadır (16). KRK'ların yaklaşık %3'ü POLE'nin ekzonükleaz alanını etkileyen ve çok yüksek mutasyon oranlarına (ultramutan) neden olan mutasyonlar bulundurmaktadır (11).



Şekil 4. POL proofreading ve MMR sisteminin DNA polimeraz hatalarını düzelten ortak yolağı (34)



Şekil 5. Kolorektal Karsinom riskini artıran DNA Polimeraz POLE ve POLD1 proofreading bozuklukları (34)

2.3. Kolorektal Karsinomlarda Diferansiyasyon (Derecelendirme)

KRK derecelendirmesi gland formasyonu temel alınarak yapılmaktadır. İyi ve orta diferansiye olarak derecelendirilen tümörler düşük dereceli (low grade), az diferansiye olarak derecelendirilen tümörler yüksek dereceli (high grade) olarak da sınıflandırılmaktadır. Derecelendirme en az diferansiyasyon gösteren tümör alanı göz önünde bulundurularak yapılmaktadır. Epitelyal-mezenkimal transizyonun bir işareti olan tümör tomurcuklanması (budding) tümör derecelendirilirken dikkate alınmamakta ancak ayrı olarak rapor edilmektedir (11) .

2.4. Kolorektal Karsinomlarda Prognostik Faktörler

Kolorektal karsinomun prognozu bir dizi klinik ve patolojik parametre ile ilişkilendirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün meta-analizlerden elde edilen verilere dayanarak bildirdiği prognostik faktörler arasında;

- Yaş
- Cinsiyet

- Evre
- Mikroskopik tümör tipi
- Mikroskopik derece
- Lenf nodu tutulumu
- İnvazyon derinliği
- İntramural ve ektramural vasküler invazyon
- Lenfatik invazyon
- Perinöral invazyon
- Tümör tomurcuklanması
- Perikolonik tümör depozitleri
- İmmün yanıt
- Tümör anjiogenezi
- Barsak duvarı perforasyonu
- Cerrahi sınır durumu
- Tedavi yanıtı

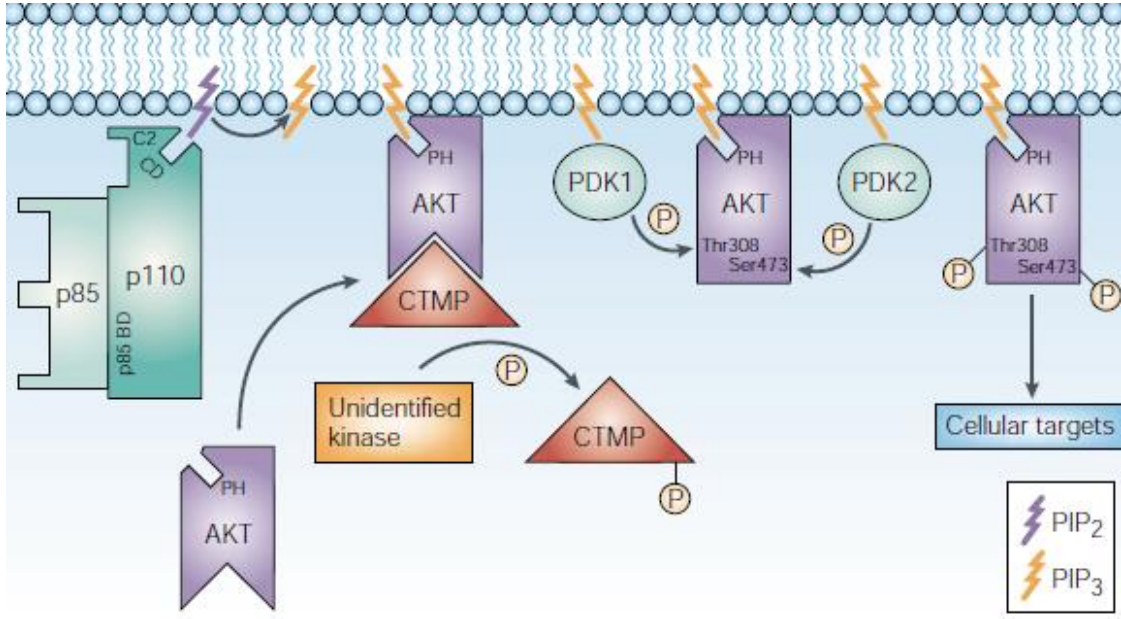
bulunmaktadır (11, 35).

2.5. Çalışmaya Dahil Edilen İlgili Genler

2.5.1. V-Akt Murin Timoma Viral Onkogen Homolog 1 Kinaz (AKT1)

AKT, Retroviral onkogen v-Akt'nin hücrel homologudur ve protein kinaz B olarak da bilinmektedir. AKT ailesinin AKT1, AKT2, AKT3 olmak üzere üç üyesi bulunmaktadır. AKT hem plazma membranına translokasyon hem de Treonin308 ve Serin473'te

fosforilasyon gerektiren ikili bir düzenleyici mekanizma tarafından aktive edilmektedir. PI3K aktivasyonunu takiben plazma membranının iç yüzünde üretilen Fosfatidilinozitol trifosfat (PIP3) PH domaini ile doğrudan etkileşim yoluyla AKT'nin plazma membranına lokasyonuna neden olmaktadır. Membranda PH domaini içeren ve 3-fosfoinozotide bağımlı protein kinaz-1 (PDK1) olarak adlandırılan başka bir serin/treonin kinaz Treonin 308 üzerinden AKT fosforilasyonu yapmakta ve AKT aktivasyonuna neden olmaktadır (36).



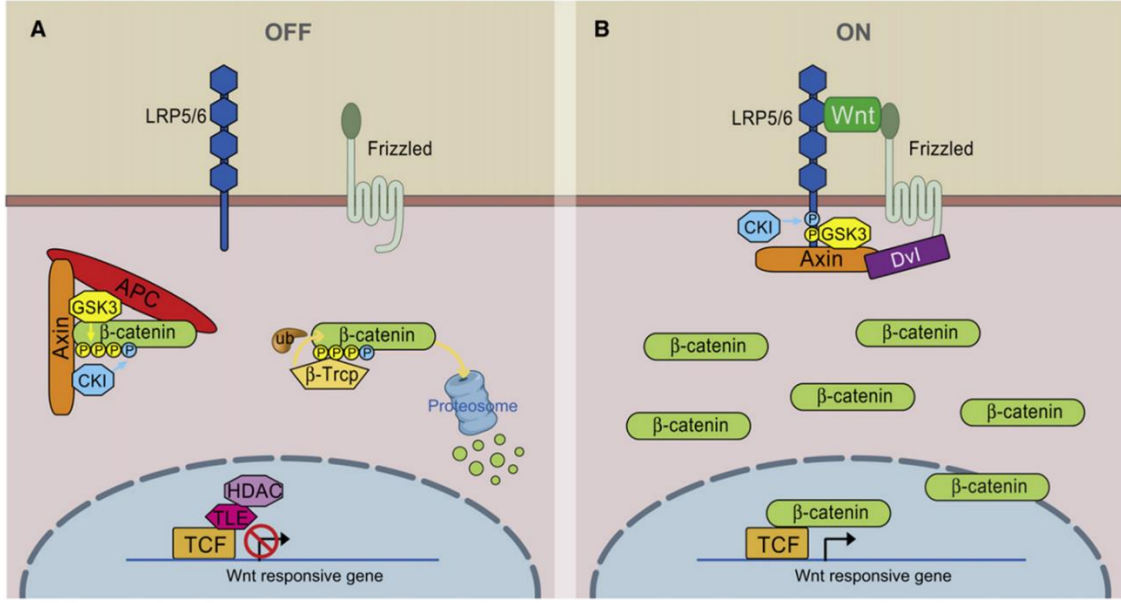
Şekil 6. AKT Regülasyon Yolağı (36)

AKT hücre hayatta kalması ve proliferasyonunda anahtar faktör olarak görev yapmaktadır. Akciğer, meme, over, mide ve pankreas karsinomları dahil çeşitli insan kanserlerinde mutasyonlarla overekspresyon veya aktivasyon göstermektedir. Çok sayıda çalışma AKT'nin hücre proliferasyon mediatörü ve ilaç geliştirmek için etkili bir hedef olarak önemini göstermektedir. İnsan kanserlerinde AKT'ye özgü immunoterapi hedef tedavi yaklaşımları için umut verici görünmektedir (37).

2.5.2. Adenomatöz Polipozis Koli (APC)

APC bir KKR tümör supresör gen olarak kabul edilmekte ve hem somatik hem germline düzeyde disregüle durumda bulunabilmektedir. APC geni kromozom 5q21'de bulunmaktadır. Kodlama sekanslarının yaklaşık %75'i APC'nin hem somatik hem germline mutasyonları için en yaygın bölge olan ekzon 15'te bulunmaktadır. APC genindeki germline mutasyonlar KKR gelişimine yol açan başlıca kalıtsal yatkınlık olan FAP ile sonuçlanmaktadır. Somatik APC mutasyonları sporadik KKR'ların %80'inden fazlasında

bulunmakta ve KRK vakalarının %30-40'ında kromozom 5q'da heterozigosite kaybı (LOH) bildirilmektedir (38). APC geninin hücreler arası iletişim, hücre adezyonu, hücre migrasyonu, transkripsiyon ve proliferasyon ile ilgili çeşitli işlevleri bulunmaktadır. Ana işlevi beta-catenin proteini ile olan etkileşimi aracılığıyla WNT sinyal yolağının düzenlenmesidir (39). APC gastrointestinal sistemde hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden kanonik WNT sinyal yolağının anahtar negatif düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Diğer düzenleyici mekanizmalar arasında beta-cateninin dışa aktarımını artırarak nükleer beta-catenin seviyelerini düşürme, doğrudan beta-catenine bağlanarak TCF ile etkileşimi bloke etme, bir baskılama kompleksi ile doğrudan etkileşim yoluyla WNT hedef genlerinin C terminal bağlanma proteini (CtBP) aracılı baskılanmasını kolaylaştırma bulunmaktadır (38). WNT ligand stimülasyonu degradasyonu bloke ederek beta-catenin seviyelerinin yükselmesine neden olmaktadır. Bunun yanısıra kısa APC proteinin oluşumuna neden olan APC genindeki trunkasyon mutasyonları da beta-catenin degradasyonunu azaltmaktadır. Bu durum beta-cateninin birikmesine ve bir gen transkripsiyon programını düzenleyen transkripsiyon faktörü olarak hareket eden TCF'ye bağlanacağı nükleusa girmesine neden olduğundan hücre üzerinde büyük etkiler yaratmaktadır. Beta-catenin/TCF yoluyla bu transaktivasyondan etkilenen proteinler arasında erken DNA replikasyon proteini C-MYC ve hücre siklus proteini siklin D1 bulunmaktadır (10). Daha yeni çalışmalar APC onarımının, KRK tedavisi için terapötik bir hedef olarak WNT yolağını geçerli hale getiren tümör regresyonunu sağladığını ve KRK'da kript homeostazını yeniden kurduğunu göstermektedir. APC geninin WNT yolağının düzenlenmesinin ötesinde çeşitli işlevlere sahip olduğu bilinmesine karşın WNT yolağı ile ilişkili olmayan APC trunkasyon fonksiyonunu hedefleyen birkaç terapötik madde bulunmaktadır. Trunkasyona uğramış APC Selektif İnhibitörü (TASIN-1) ve analogları bir biyobelirteç olarak mutant APC bulunan KRK hastaları için hedef tedavide potansiyel bir paradigma değişikliğini temsil etmektedir (38).



Şekil 7. WNT/Beta-catenin Sinyal Yolağı (40)

2.5.3. Ataksi Telenjektazi Mutant (ATM)

ATM genomik stabilitenin korunmasında rol oynayan, DNA çift sarmal kırıklarının onarımını başlatabilen yeni keşfedilen bir gendir. ATM'nin ekspresyon düzeyi hasarlı hücrelerin onarımı ve apoptoz döngüsünün regülasyonu ile yakından ilişkilendirilmektedir. Çift sarmal DNA kırıklarına karşı ATM ekspresyon düzeyinde eksiklik genom dengesizliği, radyosensitivite, progresif ataksi ve maligniteye yatkınlık ile ilişkilendirilmektedir. Çalışmalar anormal ATM ekspresyonunun, gen ekspresyonu ve anjiogenezi düzenleyerek akciğer, meme, tiroid kanseri ve diğer kanser türlerinin oluşumunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bir DNA hasar yanıtı olarak ATM'nin gen ekspresyon düzeyi, kimyasal ilaçların veya radyasyonun neden olduğu kanser hücresi hasarından sonra kendi kendini tamir mekanizmasını başlatmak veya tümör hücre aktivitesini sürdürmek amacıyla artmaktadır. Bu durum ATM ekspresyonu düşük olan kanser hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapiye yüksek duyarlılığı olduğuna dair yapılan çalışmalarla tutarlılık göstermektedir (41, 42). ATM anormal transkriptleri dolaylı olarak intron mutasyonlarından kaynaklanan MSI'nin bir mutasyon hedefi olarak kabul edilmektedir. Sriramulu ve ark. (43) yaptıkları çalışmada MLH1 veya MSH2 mutasyon taşıyıcılarında kanser oluşumunun belirli bir ATM polimorfizminin varlığından kaynaklandığını, KRK'larda ve adenomlarda ATM geninde sıklıkla promotor hipermetilasyona rastlandığını bildirmektedirler (43).

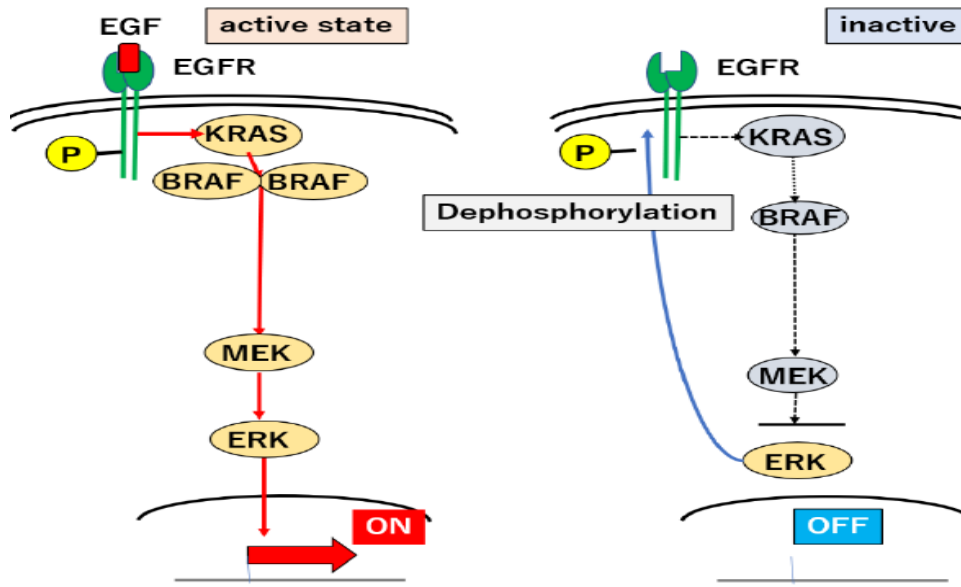
2.5.4. B Hücreli Lenfoma 2 (BCL2) İlişkili X (BAX)

BCL2 ailesi apoptozda kaspaz proteaz ailesinin aktivasyonundan önce önemli bir kontrol noktasını denetlemekte, apoptozun mitokondriyal yolağının düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu ailenin önde gelen yaygın olarak eksprese edilen bir üyesi, BCL2 ailesinin diğer üyeleriyle homodimerleşme veya heterodimerleşme kapasitesine sahip proapoptotik bir protein olan BAX'tır (44, 45). B Hücreli Lenfoma 2 (BCL2) İlişkili X (BAX)-BAX homodimerleri güçlü hücre ölüm indükleyicileri iken BAX-BCL2 heterodimerleri ve BCL2-BCL2 homodimerleri hücre hayatta kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca DNA hasarı veya hipoksiden kaynaklanan ölümcül sinyallere yanıt vermede temel unsur olan tümör supresör protein p53 BCL2'yi downregüle ederken BAX'ı aktive edebilmektedir (44). Apoptoz kaybı daha ileri genetik hasara uğrayan hücrelerin hayatta kalmasını sağlamakta, böylece tümörlerin patogenezinde önemli rol oynamaktadır. İnsan kanserlerinde somatik mutasyonlar ve apoptozla ilgili genlerin anormal ekspresyonu bulunmaktadır (45). Gastrointestinal sistem malignitelerinde BAX fonksiyonunun kaybı kanser gelişimi ve prognozla ilişkilidir. Ayrıca BAX ekspresyonunun KRK metastazlarında primer tümörlere kıyasla önemli ölçüde daha düşük olması metastaz gelişimindeki rolünü doğrulamaktadır (46).

2.5.5. V-Raf Murin Sarkom Viral Onkogen Homolog B 1 (BRAF)

BRAF hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu, hücre göçünü ve hayatta kalmasını, angiogenezi sürdüren MAPK yolağı olarak bilinen sinyalizasyon kaskadında yer alan bir serin/treonin protein kinaz olarak bilinmektedir. Bu yolak Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF) ailesi proteinlerini (ARAF, BRAF, CRAF) aktive eden RAS küçük GTPaz'lerden oluşmaktadır. Aktive edilmiş RAF proteinleri, daha sonra Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazlar (Extracellular Signal-regulated Kinases, ERK)'ları fosforile ve aktive edecek olan Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz (MAPKK, MEK)1/2 proteinlerini fosforile ve aktive etmektedir (47). Birçok insan kanserinde RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) yolağı disregüle durumda bulunmaktadır. Bu sinyal yolağının esas aktivasyonu onkojenik RAS ve RAF kaynaklı kanserlerde meydana gelmektedir. Melanom, akciğer kanserleri ve KRK'lar dahil olmak üzere insan kanserlerinde yüksek oranda BRAF mutasyonu bulunduğu bilinmektedir (48). BRAF mutasyonlarının yaklaşık %90'ı ekzon 15'te T1799 transversiyonu seviyesinde meydana gelmekte ve bu valinin glutamik asit ile yer değiştirmesine (V600E) yol açmaktadır. BRAF mutasyonu olan KRK'lar tüm hastaların %8-

12'sini oluşturmaktadır. BRAF mutasyonları 70 yaşın üzerindeki kadınlarda ve proksimal kolon yerleşimli tümörlerde daha sık, distal kolon (%4) ve rektum kanserlerinde (%2) daha az görülmektedir. BRAF mutasyonu bulunan tümörlerin yaklaşık %60'ı az diferansiye, %36'sı iyi veya orta derece diferansiye durumdadır. Histolojik olarak müsinöz subtip BRAF mutant KRK'larla daha sık ilişkili (%22-67) bulunmaktadır (49). BRAF V600E mutasyonu bulunan KRK'larla MSI-H/dMMR tümörler arasındaki pozitif ilişki ve KRAS mutasyonu ile birbirlerini dışlamaları iyi bilinmektedir. BRAF V600E mutasyon insidansının MSI-H/dMMR tümörlerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir (48). BRAF mutasyonu hastaların %13'ünde PIK3CA, %22'sinde PTEN mutasyonu ile birlikte bulunmaktadır (49). Mevcut verilere göre en yaygın varyant olan BRAF V600E mutasyonu bulunan tümörler, hastalığın evresine bakılmaksızın daha yüksek kemorezistan ve daha kötü prognoz ile ilişkili görünmektedir (47). BRAF hedef tedavisine direnç mekanizması üzerine yapılan çeşitli araştırmalar bu tümörle başa çıkabilmek için RAS/RAF/MEK/ERK yolağının da çok iyi anlaşılması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle özellikle KRK'larda terapötik hedefin yalnızca BRAF mutasyonu değil aynı zamanda RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolağı da olduğunun bilinmesi gerekmektedir (48).



Şekil 8. MAPK Kaskadı (48)

2.5.6. Meme Kanser Yatkinlık Geni Tip 1 (BRCA1) ve Meme Kanser Yatkinlık Geni Tip 2 (BRCA2)

BRCA1 24 ekzona sahiptir ve kromozom 17q21 üzerinde yerleşim göstermektedir. BRCA2 27 ekzon bulundurmakta ve kromozom 13q12 üzerinde yerleşim göstermektedir. Diğer gen bölgeleri ile kıyaslandığında her iki genin de geniş bölgeleri olduğu görülmektedir (50). BRCA1'in DNA hasarına yanıt olarak hiperfosforile olması ve çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ile işaretli replikasyon çatal bölgelerine taşınması BRCA1'in hasarlı DNA onarımında rol oynadığını düşündürmektedir. BRCA1 DNA hasarı sonrası farklı kinaz tarafından çoklu rezidülerde fosforile olabilmekte ancak herbir fosforilasyon türünün BRCA1'in işlevlerini nasıl etkilediği belirsizliğini korumaktadır (51). BRCA1'in DNA onarımı, kromatin yeniden modellemesi, transkripsiyonel düzenleme, G2-M hücre siklusu kontrol noktası, ubiquitin ekleme reaksiyonları dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlerde rol oynasa da BRCA2'nin işlevi hücre siklusunun S fazı sırasında çift sarmal kırıklarının onarımı ile sınırlı kalmış gibi görünmektedir. Buna göre BRCA2'nin yetersiz olduğu hücrelerde translokasyonlar, delesyonlar gibi kromozomal rearenjmanlar birikmekte ve daha yüksek oranda kromozom sayısı değişikliği gözlenmektedir. DNA çift sarmal kırıkları hücre siklusunun S fazında meydana gelmekte; buna yanıt olarak BRCA2 çift sarmal kırıklarının hatasız onarımını katalize eden bir rekombinaz olan RAD51'in aktivitesini düzenlemektedir (52). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına sahip bireyler meme kanseri için %84'e, over kanseri için %40'a varan istatistiksel olarak anlamlı yaşam boyu risk artışı göstermektedir. Bu mutasyonların prostat, pankreas, mide kanserleri ve KRK ile de ilişkili olduğu bildirilmekle birlikte riskin büyüklüğü açık değildir. Sporadik KRK'ların neredeyse %50'sinde BRCA1 lokusunda allelik kayıplar bulunmaktadır (53). Benzer şekilde, kromozom 13 üzerinde yüksek sıklıkla allelik dengesizlik bulunması KRK tümörögenezinde BRCA2'nin de rol oynadığını düşündürmektedir (54). Çalışmalar familial meme kanseri hastalarının akrabalarında KRK gelişme riskinin genel popülasyona göre daha yüksek olduğunu bildirmektedir. Bununla birlikte BRCA mutasyonu taşıyıcılarında KRK insidansı üzerine yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar vardır (53).

2.5.7. Kaspaz 8 (CASP8)

CASP8 apoptozun önemli bir düzenleyicisi, hiperproliferasyon ve tümörögenezise karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynayan ekstrinsik apoptoz yolağının apikal bir proteazıdır. CASP8 ekspresyonunu azalması ile kanser hücreleri tarafından uyarıldıktan

sonra T lenfositlerin apoptoz reaktivitesinde bir azalmaya yol açtığı bildirilmektedir (55). CASP8 geninde somatik mutasyonlar, homozigot veya heterozigot genomik delesyonlar, kromozom 2q üzerinde allelik dengesizlik, metilasyon ve fosforilasyon çeşitli insan kanseri türlerinde gözlenmektedir. Çok sayıda çalışmada CASP8 polimorfizmi ile kanser gelişimi arasındaki ilişki değerlendirilmekle birlikte CASP8 geninin kanser başlangıcı, progresyonu ve patogeneze etkisi tartışmalıdır (56).

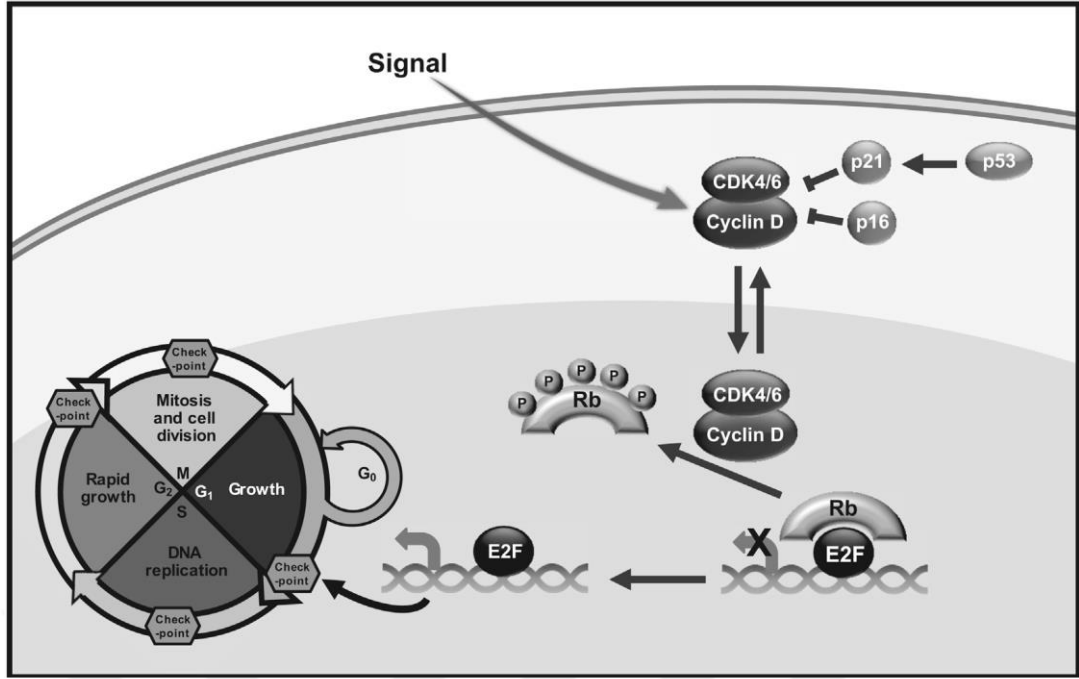
2.5.8. Hücre Bölünme Döngüsü 27 (Cell Division Cycle 27, CDC27)

Anafaz İlerletici Kompleks/Siklozom (APC/C) mitoz sırasında protein degradasyonunun ana düzenleyicisidir ve mitozun ilerlemesi gibi çeşitli hücresel olaylarda yer almaktadır. CDC27 hedef substratları tanımak ve yıkıma uğratmak amacıyla APC/C'yi aktive eden bir nükleer altbirimdir (57). Son yıllarda elde edilen kanıtlar CDC27'nin prostat kanseri, osteosarkom ve KRK gibi çeşitli kanser türlerinde mutasyona uğradığını göstermektedir (58). Özellikle KRK'larda CDC27 mutasyon oranının %5'in üzerinde olduğu, CDC27'nin KRK'larda tümör poliferasyonu ve progresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (57).

2.5.9. Siklin Bağımlı Kinaz 4 (CDK4)

Siklinler (A, B, D, E) ve bunların ilişkili siklin bağımlı kinazları (CDK 1, 2, 4, 6) hücre siklus ilerlemesini sağlamak amacıyla hücre siklusu ile ilgili proteinleri fosforile ederek siklusu düzenlemede kritik rol oynamaktadır (59).

Siklin D-CDK4/6-CDK4 inhibitör (INK4)-Rb yolağının disregülasyonu kanserlerde sıklıkla gözlenmekte ve hücre siklus ilerlemesine dolayısıyla sürekli büyümeye neden olmaktadır. Retinoblastom (Rb) fosforilasyonunu destekleyen artmış siklin D-CDK4/6 aktivitesi siklinlerin overekspresyonu, CDK4/6 mutasyonu veya amplifikasyonu, p16INK4A gibi siklin D-CDK4/6 negatif regülatörlerin kaybı dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla meydana gelerek kanser hücre büyümesine neden olmaktadır (60).



Şekil 9. Siklin D-CDK4/6-INK4-Rb Yolağı (60)

D tipi siklinleri kodlayan genlerin amplifikasyonu insan kanserlerinde yaygın olarak gözlenmekte ve siklin D protein seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Çok sayıda kanserde CDK4 (en belirgin olarak liposarkom ve glioblastom) ve CDK6 (üst gastrointestinal kanserler ve prostatın nöroendokrin karsinomu) amplifikasyonu gözlenmektedir. CDK4 ve CDK6 aktivitesine ortaya çıkan artışın CDK4/6 inhibitörlerine duyarlılık kazandırması beklenmektedir (61).

2.5.10. Deleted in Colorectal Cancer (DCC)

Heterozigosite kaybından (LOH) genellikle kromozom bölgeleri 5q, 17p ve 18q'nun etkilendiği 1980'lerin sonlarından beri bilinmektedir (62). KRK yaklaşık %75'inde kromozom 18q'da LOH bulunmaktadır. DCC bu kayıp bölgesinde bulunmakta ve KRK'larda somatik mutasyonlarla değişime uğramakta, bu durum DCC'nin 18q tümör supresör olabileceği görüşünü desteklemektedir. Sonraki çalışmalar DCC allelik kaybının ve Messenger RNA (mRNA) ekspresyonunda azalmanın KRK'larda yaygın olduğunu göstermektedir (63, 64).

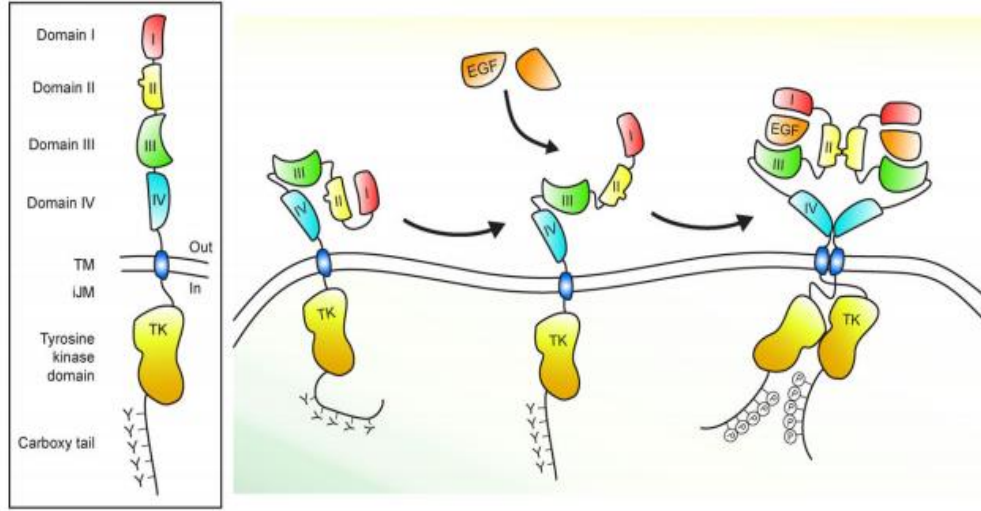
DCC geni apoptoz, adezyon, hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli olan transmembran bir reseptörü kodlamaktadır. DCC seviyelerindeki artış kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu indüklemekte ve tümör hücre metastazını baskılamaktadır. Bu gen KRK'ların

%70'inde kaybolmakta, KRK'ların %6'sında ayrıca insersiyonlar ve nokta mutasyonlar bulunmaktadır.

Fearon ve Vogelstein tarafından KRK gelişiminin ilk genetik modeli olarak 1990 yılında önerilen adenom-karsinom sekansının dördüncü, aynı zamanda geç adenom basamağında DCC kaybı bulunmaktadır (65). Kromozom 18q allelik kaybının KRK'larda prognostik bir öneme sahip olduğunu ve azalmış DCC ekspresyonunun KRK'lı hastalarda daha kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi ne 18q delesyonunun ne de DCC ekspresyonunun KRK progresyonu veya sağkalım ile ilişkili olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (66).

2.5.11. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)

Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK) birçok polipeptid büyüme faktörüne, sitokinlere ve hormonlara yüksek afiniteye sahip hücre yüzey reseptörleridir. RTK hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, hücre hayatta kalması, metabolizma, hücre göçü ve hücre siklus kontrolü dahil olmak üzere başlıca hücresel süreçlerin düzenleyicisi olarak görev almaktadır. EGFR, ErbB2/HER-2, ErbB3/HER-3 ve ErbB4/HER-4 ile birlikte bir RTK ailesine aittir. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) ailesi EGFR1 (EGFR, HER1, c-ErbB1), EGFR2 (HER2, c-ErbB2), EGFR3 (HER3, c-ErbB3) ve EGFR4 (HER4, c-ErbB4) proteinlerinden oluşmaktadır (67). Epidermal büyüme faktörünün hücre yüzeyine bağlanması EGFR'nin dimerizasyonunu indüklemekte, bu da EGFR tirozin kinaz aktivitesinin ve reseptör trans otoposforilasyonunun aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Overekspresyona veya aktive edici mutasyonlara bağlı olarak EGFR sinyal kaskadının disregülasyonu meme kanseri, akciğer, özofagus, baş-boyun kanserleri, KRK'lar, anal kanserler, gliom ve glioblastom olmak üzere birçok kanser türünde görülebilmektedir (68). Kanıtlar EGFR ve ErbB2 aktivasyonunun kolon karsinogenezi sırasında erken gerçekleşen olaylar olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar kolorektal neoplazilerin öncüleri varsayılan aberran kript odaklarında artmış EGFR sinyalizasyonu ile birlikte artmış proliferasyon, EGFR ve ErbB2'nin artmış aktivasyonu olduğunu göstermektedir. KRK'larda EGFR overekspresyonu az diferansiyasyon, düşük sağkalım ve artmış metastaz riski ile ilişkilendirilmektedir (69). EGFR, özellikle EGFR ve ErbB2 kanser tedavileri geliştirilirken birincil hedefler olarak seçilmektedir (68).



Şekil 10. EGFR Yapısı (70)

2.5.12. Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EPCAM)

Bir Tip I transmembran yüzeyel glikoproteini olan EPCAM çok sayıda normal epitel hücrelerinin bazolateral membranında düşük seviyelerde mevcuttur ve en yüksek EPCAM ekspresyon seviyesi kolonda bulunmaktadır. EPCAM selektinler, integrinler, kadherinler, immunglobulin superailesinden oluşan hücre adezyon moleküllerinin dört ana ailesinden hiçbirine yapısal olarak benzememesine karşın bir hücre adezyon molekülü olarak tanınmaktadır. EPCAM hücre adezyonu, hücre siklus regülasyonu, sinyal iletimi, organogenez, remodelling işlemi, hücre migrasyonu, hücre adezyon molekülleri arasında uygun etkileşim ile embriyogenez, proliferasyon, onarım süreçleri, epitelyal hücrelerin normal fonksiyonlarının düzenlenmesi ve sürdürülmesi, hücre diferansiyasyonu gibi işlevlerde görev almaktadır (71). EPCAM epitelyal kanserlerde yüksek oranda eksprese edilirken normal epitelde daha düşük seviyelerde eksprese edilmektedir. Yüksek düzeyde EPCAM ekspresyonu genellikle düşük hasta sağkalımı ile ilişkilendirilmekte ve yüksek proliferasyon hızına sahip tümörlerdeki artmış ekspresyonu EPCAM'ın büyüme kontrolünde rolü olduğuna işaret etmektedir (72). EPCAM tümör gelişimini destekleyici ya da baskılayıcı olarak potansiyel rolü tümör mikroçevresine ve kanser türüne bağlı olarak farklılık göstermekte, bu nedenle özofagus kanserlerinde ve KRK'larda EPCAM overekspresyonu ile sağkalım arasındaki korelasyon tartışmalı bulunmaktadır. Bazı kanser kök hücrelerinde normalden 100 kata kadar artmış ekspresyonu göz önünde bulundurulduğunda EPCAM en önemli kanser biyobelirteçleri arasında bulunmaktadır (71). Bunun yanı sıra

EPCAM çeşitli kanserlerin tedavi çalışmaları için dikkat çekici bir hedef olarak değerlendirilmektedir (73).

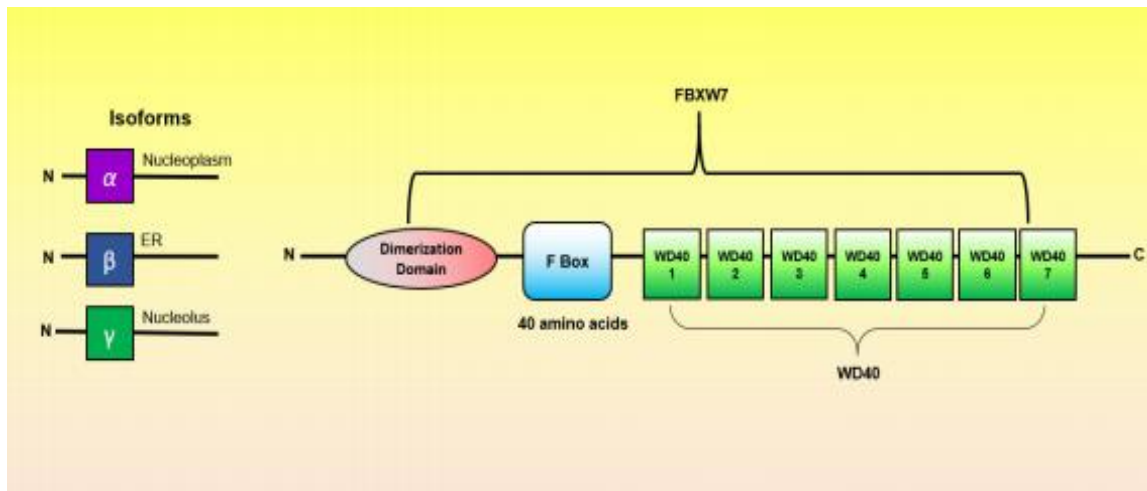
2.5.13. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (ERBB2, EGFR2, HER2)

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER-2) kromozom 17q'da bulunan transmembran bir glikoproteindir (74). HER2 tanımlanmış ligandı olmayan tek reseptör olmasına rağmen diğer HER üyelerinin heterodimer oluşturmak için tercih edilen ortak konumundadır. HER2'nin aracılık ettiği ana sinyal yolları MAPK ve PI3K yollarını içermektedir. Hücre hayatta kalması için anahtar bir gen olan HER-2 gen amplifikasyonu ve protein overekspresyonu malign transformasyona yol açmaktadır (75). HER2 geninin amplifikasyonu veya overekspresyonu meme kanserlerinin yaklaşık %15-30'unda görülmekte, meme kanserinde prognostik ve prediktif değeri bulunmaktadır. HER2 geni ve mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasıyla over, uterin seröz endometriyal karsinom, kolon, mesane, akciğer, serviks, baş-boyun ve özofagus gibi diğer kanser türlerinde de HER2 overekspresyonu bulunduğu artan şekilde saptanmaktadır. HER2 overekspresyonu gastrik kanserli hastalarda %15-30, over kanseri olan hastalarda %20-30, endometriyal seröz karsinomda %14-80, özofageal kanserlerde %0-83 arasında bildirilmekte, daha kötü klinik sonuçlar ve daha agresif hastalık gidişiyle ilişkilendirilmektedir (74). Bununla birlikte KRK'larda HER2 amplifikasyonu çok daha düşük bir sıklıkta ortaya çıkmakta ve çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. Seçilmemiş bir hasta popülasyonunda HER2 amplifikasyon insidansının %1-6 arasında değiştiği bildirilmektedir (76). Yakın zamanlarda onkojenik HER-2 aktivasyonunun somatik gen mutasyonu yoluyla ortaya çıkan etkisine ilgi artmaktadır. Bu HER-2 mutant kanserlerin çoğu eşzamanlı HER2 gen amplifikasyonu ile ilişkilendirilememekte, bu nedenle immunhistokimyaya ya da floresan in situ hibridizasyona dayanan standart analizlerde gözden kaçabilmektedir. HER2 proteininin hücre dışı, transmembran ya da tirozin kinaz alanını etkileyen mutasyonlar normal bir HER-2 gen kopya sayısı varlığında bile HER-2 sinyal yollarını aktive edebilmektedir. Akciğer kanserleri, KRK'lar ve meme kanserleri dahil olmak üzere daha yaygın kanserlerde HER-2'ye yönelik tedavilerle potansiyel olarak hedeflenebilecek büyük bir ek hasta tabanını gösteren önemli bir HER-2 mutasyon prevalansı bulunmaktadır. HER2 gen amplifikasyonunun aksine HER-2 gen mutasyonları rutin klinik testlere tabi tutulmadığından HER2 mutasyonu ile ilişkili prognoz ve tedavi yanıtı ile ilgili veriler sınırlı miktarda bulunmaktadır (77).

HER2 overekspresyonunun meme ve mide kanseri gibi diğer malignitelerde etkili şekilde hedeflenmesi KRK'larda da bir hedef olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirleme çabalarına yol açmaktadır. HER2 yolağının bir bypass sinyal yolağı olarak aktivasyonu anti-EGFR antikor tedavisine yönelik bir direnç mekanizması olarak tanımlanmaktadır.

2.5.14. F-Box and WD-40 Domain Containing Protein (FBXW7)

İnsan FBXW7 geni kanserlerin %30'unda silinmiş bir bölge olan kromozom 4q31q.3'te bulunmaktadır (78).



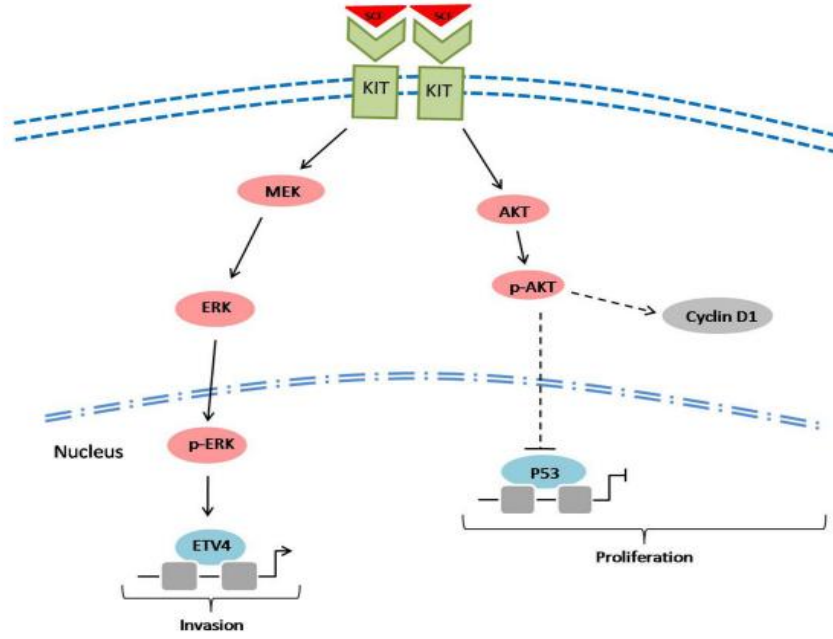
Şekil 11. FBXW7 yapısı (78)

FBXW7 bir tümör supresör gen olarak sınıflandırılmaktadır. FBXW7'nin substratlarının çoğu protoonkogenler olarak bilinmekte, bu da FBXW7'nin tümör supresör rolünü desteklemektedir. Mutasyonlar, delesyonlar ve hipermetilasyon FBXW7 inaktivasyonunun ana nedenleridir ve kansere progresyon ile sonuçlanmaktadır (78). İlk çalışmalar KRK'ların %6-10'unda FBXW7 mutasyonları bulunduğunu bildirmektedir. Sonraki çalışmalar T hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) ve kolanjiokarsinomda yüksek prevalansta olmak üzere çok çeşitli organ bölgelerinde FBXW7 mutasyonları olduğunu göstermektedir. FBXW7, T Hücreli ALL, KRK, uterin karsinosarkom, uterin endometriyal karsinom ve mesane karsinomu olmak üzere en az beş tümör tipinde önemli ölçüde mutasyona uğramış şekilde bulunmaktadır. FBXW7 mutasyonlarının sıklığı ve tipi organ bölgelerine göre farklılık göstermekte, bu da FBXW7 mutasyonlarının muhtemelen spesifik substratlar üzerinden farklı etkiler yoluyla farklı biyolojik sonuçlar ürettiğini göstermektedir (79). FBXW7 mRNA seviyesinin normal dokularla kıyaslandığında KRK

dokularında önemli ölçüde daha düşük olduğu çalışmalarda gösterilmektedir. Ek olarak FBXW7'nin düşük ekspresyonuna sahip KRK hastalarının kötü prognoz gösterdiği ileri sürülmektedir (78).

2.5.15. V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog (Protoonkogen C-Kit, KIT)

KIT bir tip III reseptör tirozin kinaz (RTK) olup kromozom 4q12 üzerinde bulunan KIT geni tarafından kodlanmaktadır. Kök hücre faktörü (SCF) KIT ligandıdır. KIT kemik iliğinin progenitör hücreleri, mast hücreleri, interstisyel Cajal hücreleri, memenin epitel hücreleri, epidermis bazal hücreleri, oositler ve spermatositler dahil olmak üzere bir dizi normal hücre tarafından da eksprese edilmektedir (80). KIT geninin keşfedilmesinden sonraki yıllar boyunca KIT'in insan neoplazilerinin gelişiminde bir rol oynayıp oynamadığı belirsizliğini korumuş olsa da günümüzde çeşitli insan kanserlerinde aktive edici mutasyonlar olduğu bilinmektedir. Aktive edici mutasyonlar tipik olarak yapısal KIT fosforilasyonunu ve ligand bağlanmasından bağımsız olarak aşağı yönde aktivasyonu sağlamaktadır (81). KIT deregülasyonu farklı şekillerde kansere neden olmaktadır. Bu deregülasyon işlev kazanımı, işlev kaybı, overekspresyon ve nokta mutasyonları gibi farklı şekillerde gerçekleşmektedir (82). KIT genindeki fonksiyon kazanımı mutasyonları, gastrointestinal stromal tümörler (GIST), mastositoma, mast hücreli lösemi, akut myeloid lösemi, seminomlar, disgerminomalar ve sinonazal doğal katil (NK) / T hücreli lenfomalarında tanımlanmaktadır. KIT geninin parakrin aktivasyonu, akciğerin primer küçük hücreli karsinomunda, nokta mutasyonları ise akral ve mukozal melanomlarda tanımlanmaktadır (83). KIT'i overeksprese eden KRK dokuları diğer KRK alt tiplerine göre sıklıkla daha güçlü bir proliferasyon kapasitesi, daha yüksek metastaz riski ve daha kötü prognoz göstermektedir. Buna paralel olarak Tan ve ark. (84) yaptığı çalışmada yüksek KIT ekspresyonu olan Müsinöz Adenokarsinomlarda daha atipik glandlar, daha kötü diferansiyasyon olduğunu bildirmektedir (84).



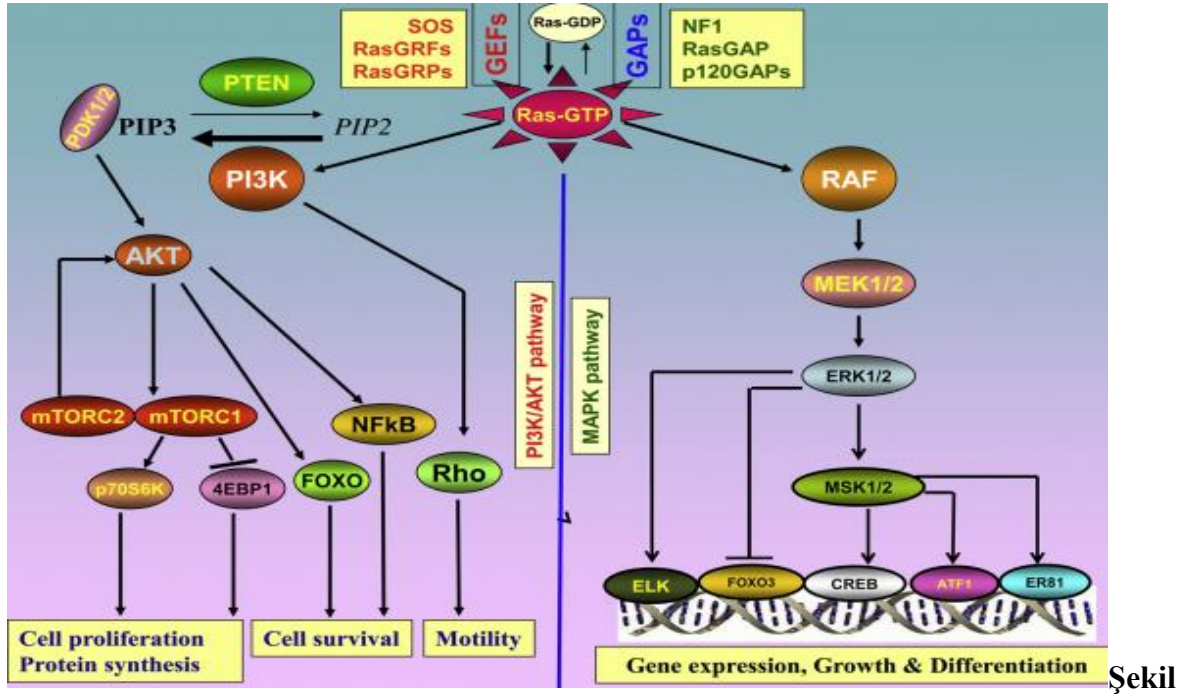
Şekil 12. KIT sinyalizasyonu (84)

2.5.16. Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-oncogene (KRAS)

RAS genleri güçlü bir transformasyon potansiyeline sahip küçük bir protein ailesini üretmektedir. Bu aile geleneksel olarak H-, N- ve K-Ras KRAS olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır. Ras proteinlerinin tümü düşük molekül ağırlıklı GTPazlardır ve plazma membranında döngüsel olarak Guanozin difosfata (GDP) bağlı inaktif ve GTP'ye bağlı aktif formda bulunmaktadırlar. Ras proteinleri bilgiyi ekstrasellüler ortamdan internal yanıt mekanizmasına aktaran birçok sinyal iletim yolağında bir düğüm görevi görmektedir (85). Hücrede RAS mutasyonu varlığında GTP-bağlı durum ile GDP-bağlı durum arasındaki denge bozulmaktadır. Yapısal olarak aktive olan RAS molekülü aşağı akış efektörleri üzerindeki sinyali tetiklemekte; bu durum büyüme, proliferasyon, hayatta kalma, adezyon, hareketlilik ve diferansiyasyon gibi önemli hücresel fonksiyonları kontrol eden hücresel yolların hiperaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu kontrolsüz aktivasyonla hücre, kansere neden olan neoplastik dönüşüme uğramaktadır (86).

KRAS hücre proliferasyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel sinyalizasyon olaylarında önemli rol oynayan sinyal dönüştürücü bir protein olarak bulunmaktadır. KRAS hücre devresinde kritik bir merkez olup aktive edici sinyalleri MAPK yolağı dahil olmak üzere birkaç hücresel sinyal yoluna aktarmaktadır. KRAS kanserlerde gözlenen mutasyona uğramış tüm Ras proteinleri arasında % 85 oran ile en onkogenik olandır. Ras genlerinde

G12, G13 ve Q61 olmak üzere üç hotspot mutasyon noktası bulunmaktadır. Bu bağlamda KRAS kodon 12 mutasyonlarının baskın olduğu tek Ras izoformu olduğu için NRAS ve HRAS'tan farklıdır (87). Serin/treonin kinazların RAF ailesinin üyeleri olan ARAF, BRAF ve CRAF en iyi karakterize edilmiş Ras efektörleri olarak bilinmektedir. Bu kinazlar MAPK yolağının regülasyonunda görev almaktadır. MAPK yolağını kontrol ederek RAF proteinleri, RAS'ın mitojenik etkisinde major rol oynamaktadır. PI3K aktive edilmiş Ras'ın neden olduğu biyolojik etkilerin birçoğuna aracılık ediyor görünmektedir. Son zamanlarda özellikle Ras aracılı PI3K aktivasyonunun antiapoptotik etkileri ilgi çekmektedir (85).



13. RAS'ın major sinyal yolları (86)

KRAS en sık mutasyona uğramış onkogendir ve insan kanserlerinde bulunan mutasyonların %23'ünü oluşturmaktadır. En yüksek mutasyon insidansı pankreas kanserlerinde (% 57) görülmektedir. Göreceli yüksek bir mutasyon insidansı kolon (% 35), safra yolları (% 28), ince bağırsak (% 17), akciğer (% 16), endometriyum (%15) ve over (% 14) kanserlerinde bulunmaktadır (86). KKR'ların yaklaşık % 40'ında KRAS mutasyonları bulunmakta ve bu mutasyonların % 90'ı kodon 12 ve 13'te meydana gelmektedir (88). In vitro çalışmalar ekson 2 kodon 12 ve kodon 13 mutasyonlarının farklı prognostik değerleri olduğunu düşündüren geniş bir KRAS mutasyon heterojenitesi göstermektedir (89). In vitro kanıtlar KRAS kodon 12 mutasyonlarının kodon 13 mutasyonlarına kıyasla daha fazla transformasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. In vitro veriler KRAS kodon 12 (p.G12V) mutasyonu bulunan KKR'ların setuximaba dirençli olmasına karşın p.G13D

mutasyonu bulunan hücrelerin KRAS wild tip hücreler gibi setuximaba duyarlı olduğunu göstermektedir. Çoğu KRAS mutasyonu, metastatik KRK'lı hastalarda anti-EGFR tedavisine direnci tahmin etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (90). KRAS kodon 12 mutasyonlarının lenfanjiogenezi destekleyen Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün (VEGF) salınımının artırılmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (89). Imamura ve ark. (88) çalışmalarında KRAS kodon 12 mutasyonlarının KRAS wild tip ya da BRAF wild tip olgulara kıyasla daha yüksek mortalite ilişkili olduğunu, bu ilişkinin KRAS kodon 13 mutasyonları için geçerli olmadığını bildirmektedir. Yine aynı çalışmada KKR'ya özgü mortalite ile en yüksek oranda ilişkili mutasyonun KRAS p.G12V mutasyonu olduğunu bildirilmektedir. Imamura ve ark. (88) çalışmalarında KRAS kodon 12 mutasyonlarının, özellikle p.G12R ve p.G12V'nin daha agresif tümör davranışı ile ilişkili olabileceğini ileri sürmektedir (88). Li ve ark. (91) çalışmalarında KRAS kodon 12 mutasyonu bulunan tümörlerin wild tip tümörlere göre daha fazla lenf nodu pozitifliği gösterdiğini ve bu tümörlerin daha sıklıkla evre III-IV tümörler olduğunu bildirmektedir. Kodon 13 mutasyonu bulunan tümörlerde bu ilişki bulunmamaktadır (91). KRAS kodon 12 mutasyonlarının peritoneal metastaz, karaciğer peritonu metastazı ve multiorgan metastazları ile dikkat çekici şekilde ilişkili olduğu He ve ark. (92) tarafından yakın zamanda yayınladıkları çalışmada ileri sürülmektedir (92).

2.5.17. Mezenkimal-Epitelial Transizyon Tirozin Kinaz Reseptör (MET, c-MET)

MET RTK ailesinin bir üyesidir ve kromozom 7 üzerinde bulunan MET protoonkogeni tarafından kodlanmaktadır. MET aracılı aktivasyonla MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları, transkripsiyonun sinyal transdüser ve aktivatörleri (STAT), Jun amino terminal kinazlar (JNK) dahil olmak üzere birçok hücre içi sinyal yolağının aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu yolların tümü MET bağımlı hücre proliferasyonunu, hücre hayatta kalmasını ve hücre migrasyonunu denetlemektedir. Bununla birlikte bu sinyallerden bazıları antiapoptotik etkiden ziyade proapoptotik bir etkiye neden olmaktadır (93). Mide ve özofagus karsinomları, medulloblastomlar ve KKR kaynaklı karaciğer metastazları gibi bazı insan kanserlerinde MET geni amplifikasyonunun neden olduğu protein overekspresyonu ve kinaz aktivasyonu bildirilmektedir. Sporadik ve kalıtsal renal papiller karsinomlarda MET geninin kinaz alanında aktive edici mutasyonların bulunması MET'in insan kanserlerinin gelişimine etkisi olduğunun en ikna edici kanıtı olarak değerlendirilmektedir. Gen amplifikasyonu olmadan transkripsiyonel upregülasyon sonucu artmış protein ekspresyonu

insan kanserlerinde MET aktivasyonunun en sık nedenidir ve tiroid, over, pankreas, akciğer, meme kanseri ve KRK'lar dahil giderek artan sayıda karsinomda bildirilmektedir (94). Inno ve ark. (95) metastatik KRK'lı hastalarda yüksek MET seviyesinin daha kısa progresyonsuz sağkalım ve daha kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğunu ve MET yolağının setuximaba karşı primer direnç gelişimi ile ilgili olabileceğini ileri sürmektedir. Benzer olarak Liu ve ark. (96) KRK'larda yüksek MET ekspresyonu ile kötü genel ve progresyonsuz sağkalım arasında önemli bir ilişki olduğunu belirtmektedir (96).

2.5.18. MutL Homolog 1 (MLH1), MutL Homolog 3 (MLH3), MutS Homolog 2 (MSH2), MutS Homolog 3 (MSH3), Postmeiotic Segregation Increased 1 Homolog 2 (PMS1 Homolog 2, PMS2)

DNA tamir sisteminin primer görevi DNA sentezi sırasında DNA polimeraz hatalarının sonucu olarak oluşan yanlış baz eşleşmelerini ortadan kaldırmaktır. Yanlış eşleşme tamir genlerinin DNA sentezindeki hataları düzeltmek, genetik rekombinasyonun doğruluğunu sağlamak veya çeşitli sebeplerle oluşmuş DNA hasarlarına karşı apoptotik yanıtlara katılmak gibi genetik stabilizasyonla ilgili çeşitli işlevleri bulunmaktadır (97). Kusurlu MMR (dMMR) düzeltilmemiş baz yanlış eşleşmeleri nedeniyle mutasyon oranında 100-1000 kat artışa ve düzeltilmemiş insersiyon/delesyon döngülerine bağlı tekrarlayan sekansların uzunluklarında değişiklik nedeniyle MSI'ye neden olmaktadır. Bunun yanısıra dMMR yanlış baz eşleşmelerinin tamir edilememesi dışında MMR mekanizması tarafından tanınan DNA hasarının neden olduğu apoptoza karşı da duyarsızlığa neden olmaktadır. İnsanlarda MLH1, MLH3, PMS1, PMS2, MSH2, MSH3 ve MSH6 olmak üzere yedi MMR geni vardır. Bu genlerden MSH6, MSH2 ve PMS1 kromozom 2'de, MLH1 kromozom 3'te, MSH3 kromozom 5'te, PMS2 kromozom 7'de ve MLH3 kromozom 14'te yer yer almaktadır. Bu genlerden birinin fonksiyonundaki bozukluk mutator fenotip oluşumu, genom boyunca sık nokta mutasyonları, MSI ve multiple lokuslarda heterozigosite kaybına (LOH) neden olmaktadır (98). Lynch Sendromu KRK ve endometriyal adenokarsinom gelişme riskinin arttığı otozomal dominant bir hastalıktır (99). Lynch Sendromlu bireylerin %80'den fazlasında MMR genlerinin en az birinde germline mutasyonları bulunmaktadır. MutL Homolog 1 (MLH1) için günümüzde 250'den fazla germline mutasyonu tanımlanmaktadır ve bu sendromdaki en önemli gen olarak bilinmektedir. MLH1 ve MSH2 genleri Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanseri (HNPCC)'de bulunan germline mutasyonlarının %64'ünden fazlasından sorumlu tutulmaktadır. PMS1 ve PMS2 genleri tüm Lynch

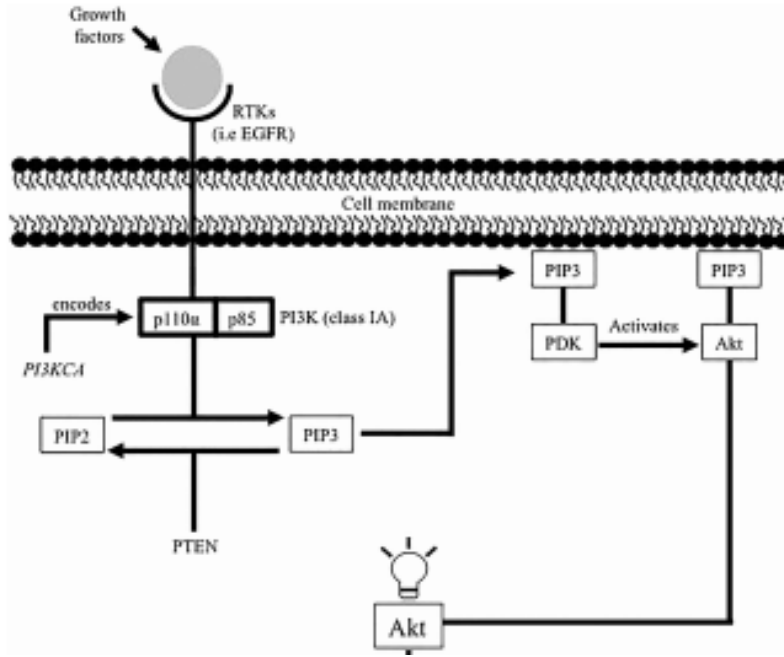
Sendromu vakalarının %5'ini oluşturmaktadır (97). HNPCC hereditör KKK'ların en sık formu olup tüm KKK'ların %5-8'ini oluşturmaktadır. HNPCC'de mutasyonların çoğu MLH1 ve MSH2 genlerinde meydana gelirken son yıllarda HNPCC'de MSH6 mutasyonlarının varlığı da bildirilmektedir. MSI sporadik KKK'ların yaklaşık %15'inde bulunmaktadır. MSH3 ve MSH6 gibi bazı MMR genleri çeşitli dokularda gelişen MSI tümörlerde yaygın olarak bulunurken diğerleri büyük ölçüde doku spesifikliği göstermektedir (100). MSI-H bulunan KKK'lı hastaların MSS KKK olanlara göre daha iyi bir evre ilişkili prognoz gösterdiği bilinmektedir. MSI olan KKK'lar daha sık proksimal kolon yerleşimi, müsinöz histoloji, tümör infiltre eden lenfositler, medüller büyüme paterni ile az diferansiyasyon, Crohn-benzeri lenfositik reaksiyon göstermektedirler (99). MMR/MSI taramasının özellikle immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanılmaya başlanmasından bu yana tedavi yönetimi açısından büyük önemi bulunmaktadır. dMMR/MSI bulunan kemoterapiye dirençli metastatik KKK vakalarında tümör tipi fark etmeksizin %80'e varan bir hastalık kontrol oranı ve üç yıldan daha fazla genel sağkalım ile immunoterapiden büyük fayda sağlanmaktadır (101).

2.5.19. Neuroblastom RAS Viral (V-Ras) Onkogen Homolog (NRAS)

RAS mutasyonları insan kanserlerinin yaklaşık %20-25'inde esas olarak kodon 12, 13, 61, 117 ve 146'da bulunmaktadır (102, 103). Çeşitli insan kanserlerinde %7.51 oranına NRAS mutasyonu olduğu bildirilmektedir. Malign melanomlarda çok yüksek oranda (%17) NRAS mutasyonu bulunmaktadır. Nispeten yüksek bir somatik NRAS mutasyon insidansı %10 oranında hematopoietik ve lenfoid doku malignitelerinde, %7 oranında tiroit kanserlerinde bulunmaktadır (86). Daha sık kodon 61'de (%60) olmak üzere KKK'ların yaklaşık %3-5'inde NRAS mutasyonları bulunmaktadır (103). Anti-EGFR tedavisine yanıtızsızlık dışında NRAS mutasyonlarının klinik etkileri ve bu mutasyonu bulunduran tümörlerin KRAS mutant metastatik KKK'lara benzer davranış gösterip göstermediği bilinmemektedir. Proksimal yerleşimli tümörler KRAS mutasyonları, distal kolon yerleşimli tümörler ve kadın cinsiyet NRAS mutasyonları ile ilişkilendirilmektedir. Metastatik KKK'larda NRAS mutasyonu varlığı daha agresif klinik seyir belirteci olarak değerlendirildiğini bildiren çalışmalar da vardır (102).

2.5.20. Fosfotidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz Katalitik Subunit Alfa (PIK3CA)

Kromozom 3q26'da bulunan PIK3CA, PI3K/AKT yolağı aracılığıyla tümör hücre hayatta kalması, adezyon, motilite ve proliferasyonu için önemli bir lipid kinaz olan sınıf IA PI3K'nın önemli bir komponenti p110alfa'yı kodlamaktadır. Sınıf I PI3K aktivitesi EGFR, insülin reseptör ve G-protein bağlı reseptörler dahil olmak üzere çeşitli yukarı akış büyüme faktörü RTK'ları tarafından kontrol edilmektedir (104).



Şekil 14. PIK3CA tarafından kodlanan PI3K katalitik subuniti ve PI3K/AKT/mTOR yolağı (104)

Çeşitli kanser türlerinde AKT, PIK3CA genlerini içeren genomik bölgelerin amplifikasyonu bildirilmekte, bu da PI3K'nın bir onkogen görevi gördüğünü göstermektedir (105). PI3K/AKT yolağı birçok kanserde anormal şekilde aktive olmaktadır ve bu aktivasyona RTK'lar ve sinyal yolağı elemanlarının somatik mutasyonları neden olmaktadır. Bu yolak tümör büyümesi, angiogenez ve tümör hücre hayatta kalması ile bağlantılı bulunmaktadır. PIK3CA mutasyonları insan kanserlerinde en sık görülen mutasyonlar arasında bulunmaktadır (106). PIK3CA'daki somatik mutasyonlar kinaz aktivitesini artırarak hücresel transformasyona neden olmaktadır (107). PIK3CA'nın gen insersiyon, delesyon ve missense mutasyonlarının meme, kolon, endometriyum, over, mide, akciğer, tiroid, baş-boyun, seviks, pankreas, santral sinir sistemi, cilt kanserleri dahil olmak üzere çok çeşitli insan kanserlerinde %30'a varan oranlarda bulunabileceği bildirilmektedir (105-

107). KRK'ların %12.7-18.5'inde PIK3CA mutasyonu bulunmakta ve genomik olarak stabil kanserlerde en yüksek seviyede görülmektedir (108). KRK'larda müsinöz histolojinin PIK3CA mutasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (109). PIK3CA mutasyon insidansı anatomik bölgeye göre farklılık göstermektedir. En yüksek PIK3CA mutasyon oranı (%30) çekum yerleşimli kanserlerde bulunurken non-rektal kolon kanserlerinde %18, rektal kanserlerde %9 oranında bulunmaktadır (108). PIK3CA ile KRAS mutasyonları arasında önemli ölçüde ilişki bulunduğu da gösterilmiştir (109).

2.5.21. Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN)

PTEN kromozom 10q23'te, mutasyona oldukça duyarlı bir lokusta yerleşim gösteren bir tümör supresör gen olarak kabul edilmektedir. PTEN mutasyonlarının %60-80 oranında görüldüğü PTEN Hamartom Tümör Sendromları olarak bilinen bir grup otozomal dominant sendromda PTEN germline mutasyonlarının bulunması bu genin bir tümör supresör olarak önemini desteklemektedir. PTEN dış membran fosfolipidleri ile hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlayan yolaklar arasında bağlantı kurarak hücre polaritesi ve migrasyonda görev almaktadır (110). Bu nedenle PTEN fonksiyon kaybı PIP3'te artış ve PI3K efektörlerinin kalıcı aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonu, apoptoz direnci, angiogenez, metabolik regülasyon, genomik instabilite, kök hücre kendini yenilemesi, hücre yaşlanma, migrasyon ve metastaz gibi kanser gelişimi ile ilişkili birçok etkiye neden olmaktadır. Birçok insan kanserinde PTEN fonksiyon kaybı nokta mutasyonları, büyük kromozomal delesyonlar, PTEN promoter bölgesinin hipermetilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar olmak üzere çeşitli genetik değişiklikler yoluyla gerçekleşmektedir (111). Somatik PTEN mutasyonları en yüksek oranda endometriyum, santral sinir sistemi, cilt ve prostat kanserlerinde bulunmaktadır. Santral sinir sisteminde PTEN'i de içeren kromozom 10q kaybı glioblastomların %70'inde, biallelik inaktivasyonla sonuçlanan PTEN ikinci allelinde somatik mutasyon glioblastomların %25-40'ında meydana gelmektedir (112). Endometriyal karsinomlarda kromozom 10 üzerinde önemli LOH olduğu ve endometrioid tipteki endometriyal karsinomlarda yaklaşık %50 oranında PTEN mutasyonlarına rastlandığı bildirilmektedir (113). Malign melanomlarda yüksek sıklıkta 10q kaybı bulunmaktadır. PTEN kaybı veya mutasyonu malign melanom hücrelerinde yaklaşık %40 oranında görülmesine karşın mutasyonların çoğu metastatik hastalıkta meydana gelmektedir. Meme kanserinde kromozom 10q'da yüksek oranda LOH bulunmasına karşın PTEN mutasyonu meme kanserlerinin yalnızca %5'lik küçük bir kısmında bulunmaktadır (113). KRK'larda

PTEN vakaların %20-30'unda biallelik inaktivasyona neden olan genetik ya da epigenetik mekanizmalar yoluyla değişikliğe uğramaktadır. Distal kolon kanserlerinde proksimal kolon kanserlerine göre PTEN ekspresyonu ve mutasyon oranının daha düşük olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle MSI ve MSI'ye yol açan mekanizmalarla PTEN geni değişiklikleri arasında ilişki olduğu, MSI KRK gelişiminde PTEN geninin genomik instabilitenin hedefi olduğu düşünülmektedir. Sporadik MSI KRK'larda promoter hipermetilasyonun, PTEN inaktivasyonunda önemli bir epigenetik mekanizma olduğu bildirilmektedir. PTEN ekspresyon kaybı KRAS ve BRAF mutasyonları ile birlikte meydana gelebilir ancak PTEN ve TP53 mutasyonları birbirini dışlayan mutasyonlardır (111).

2.5.22. Rearranged During Transfection (RET)

RET protoonkogeni glial hücre derive nörotropik faktör (GDNF) dahil olmak üzere birçok ligand için afiniteye sahip bir transmembran RTK kodlamaktadır. RET reseptör kompleksinin dimerizasyonu intrasellüler sinyal yollarını aktive etmektedir. RET hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve hücre hayatta kalması için önemli RAS/ERK ve PI3K/AKT yollarını aktive etmektedir (114). Embriyogenez sırasında boşaltım sisteminde, periferik sinir sisteminde enterik nöral krest hücrelerinde, otonom ganglionlarda, dorsal kök gangliyonlarında; santral sinir sisteminde ventral nöral tüpün nöroepitelyal hücrelerinde, birkaç kranial ganglionda RET ekspresyonu bulunmaktadır (115). RET'in insan hastalıklarındaki klinik öneminin fark edilmesi papiller tiroid karsinomu, Multiple Endokrin Neoplazi tip 2, Multiple Endokrin Neoplazi tip 2'de yer alan medüller tiroid karsinomu, feokromositoma gibi tümörler ve Hirschprung Hastalığı ile başlamaktadır. Enterik nöron göçünde ve gelişiminde defekt nedeni ile infantlarda megakolona neden olan Hirschprung Hastalığı inaktive edici RET mutasyonları, Multiple Endokrin Neoplazi 2 Sendromu germline RET mutasyonları, sporadik tiroid karsinomları somatik RET mutasyonları nedeni ile oluşmaktadır (114, 116). Sporadik medüller tiroid karsinomlarının %40-50'sinde, sporadik papiller tiroid karsinomlarının %70'inde somatik RET mutasyonları ve rearanjmanlar bulunmaktadır (114). Farklı tümör tiplerinde RET ekspresyonunda varyasyonlar bulunmaktadır. Daha çok östrojen reseptör pozitif ve HER2 pozitif meme kanserlerinde olmak üzere meme kanserlerinin %30-70'inde RET ekspresyonu bulunmaktadır. Pankreatik duktal adenokarsinomların %50-65'inde lenfatik invazyon ve lenf nodu metastazı ile yakından ilişkili RET ekspresyonu bulunmaktadır. Berrak hücreli renal hücreli karsinomda yüksek RET ekspresyonu sağkalım için güçlü bir negatif prediktör

olarak kabul edilmektedir. RET overekspresyonu orta-az diferansiye prostat kanserleri yanısıra nöroblastomda ve küçük hücreli akciğer kanserinde bulunmaktadır (117). Aberran RET metilasyonu kolon adenomlarında ve adenokarsinomlarında bulunmaktadır, bu da RET ekspresyonunda azalma ve KRK hücrelerinde RET aracılı apoptoz inhibisyonuna neden olmaktadır (117). Kolorektal kanserlerde RET geninde metilasyon bulunması nedeniyle RET'in tiroid bezi için onkogen, kolonda için tümör supresör gen olduğu öne sürülmektedir (118).

2.5.23. Tansforme Edici Büyüme Faktör Beta Reseptör 2 (TGFB2), Sma ve Mad İlişkili Protein 2 (SMAD2), Sma ve Mad İlişkili Protein 4 (SMAD4)

TGFB epitelyal ve nöral dokuların gelişiminde, immun sistemi ve yara onarımını düzenlemede görev almaktadır. Bu önemli düzenleyici işlevi nedeniyle TGFB sinyal yolağı bozuklukları tümörögenezise neden olmaktadır. TGFB doku homeostazı, proliferasyon, diferansiyasyon, hücre hayatta kalması, adezyon yanısıra hücreSEL mikroçevreyi de düzenleyerek yeni gelişen tümörün maligniteye ilerlemesini önlemektedir. TGFB sinyalizasyon patolojileri tümör hücre büyümesine, invazyona, immun sistemden kaçışa, kanser hücrelerinin yayılmasına ve metastaza neden olmaktadır (119). TGFB'nin tümör supresör fonksiyonu TGFB2 ve SMAD'lerin inaktivasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. TGFB2 ve TGFB3 tümör supresör genler olarak bilinmektedir (120). TGFB yolağında genetik değişikliklerin birikimi ile bu yolak tümör supresör olmaktan çıkıp tümör gelişimini destekleyici olmaktadır. TGFB2, TGFB3, SMAD2, SMAD4 gibi bileşenlerinin mutasyonlar ya da allelik LOH yoluyla inaktive edilmesi TGFB yolağının tümör supresör etkilerini ortadan kaldırmaktadır (121). MSI ile ilişkili kanserlerde TGFB3'de inaktivasyon mutasyonu; pankreatik duktal adenokarsinomların yaklaşık %50'sinde, sporadik MSS KRK'ların yarısından fazlasında, özofagus kanserlerinin büyük bir kısmında mutasyon ya da kromozom 18q'da LOH yolu ile SMAD4 mutasyonu bulunmaktadır (119, 121). TGFB sinyal yolağı kolon karsinogenezine ileri evrede ve uzak metastaz aşamasında dahil olmaktadır. Bu durum TGFB sinyal yolağında kritik bir dönüştürücü olan SMAD4 proteininin fonksiyonel inaktivasyonu ile ilişkilendirilmekte, bu da SMAD4 ekspresyonunun azalmasının kolon karsinogenezinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (122). SMAD4 ve SMAD2 KRK'larda yaygın olarak delesyona uğrayan kromozom 18q'da bulunmaktadır. KRK'ların %16-38'inde bir tümör supresör gen olan SMAD4 mutasyona uğramakta, sporadik KRK'ların %6'sında kromozom 18q21'de bulunan

SMAD2 kaybolmaktadır. Tüm kromozomal segmentlerde delesyon, küçük delesyonlar, çerçeve kayması mutasyonları, nonsense ve missense mutasyonlar yoluyla SMAD2 ve SMAD4 genlerinde inaktivasyon oluşabilmektedir. SMAD4'te oluşan germline mutasyonlar juvenil polipozis, hamartomatöz polipozis ve KRK'lara yatkınlığa neden olmaktadır (123, 124). SMAD4 fonksiyon kaybına malignitelerin ileri evrelerinde rastlanması SMAD4 inaktivasyonunun kolorektal karsinogenezde geç gerçekleşen bir olay olduğunu düşündürmektedir (125). KRK'larda SMAD4 kaybı E-kaderinde kayıp ile karaciğer metastazı, SMAD4 kaybı ve kromozom 18q delesyonları lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmektedir (126). Azalmış SMAD4 gen ekspresyonu ile, ilişkili proteinin fonksiyon kaybı kötü prognozla ilişkilendirilmekte ve KRK'lı hastalarda prognostik belirteç olabileceği öne sürülmektedir (122).

2.5.24. Tümör Protein P53 (TP53)

TP53 kromozom 17p13.1 üzerinde bulunmakta ve genomun koruyucusu olarak adlandırılmaktadır (127). Nükleer bir fosfoprotein olan p53 hücre büyüme kontrolünün anahtar düzenleyicisidir (128). DNA hasarına neden olan stres sinyaline yanıt olarak p53 proteini posttranslasyonel modifikasyonlarla aktive olmakta, bu modifikasyonlar intrasellüler p53 seviyesini yükseltmekte ve hücre siklusunun durdurulması, hücre yaşlanması veya apoptoza neden olmaktadır (128, 129). TP53 insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir (128). Mutasyona uğramış TP53 tümörojenik potansiyeli olan ve uygun stres yanıtını oluşturamayan inaktif bir protein oluşumuna neden olmaktadır. TP53 mutasyonlarına ek olarak p53 aktivitesini kontrol eden genlerdeki değişiklikler de p53 aktivitesinin azalmasına neden olabilmektedir (129). Genç yaşta, çeşitli kanserlerin gelişim riskinin arttığı Li-Fraumeni Sendromu'nda germline TP53 mutasyonları bulunmaktadır (128). Tümör supresör genler klasik olarak allelik kayıplar, çerçeve kayma mutasyonları, nonsense mutasyonlar yoluyla inaktif olmaktadırken alışılmadık bir durum olarak TP53 mutasyonlarının çoğu missense mutasyonlar olarak bilinmektedir. TP53 mutasyonları kanser türüne bağlı olarak farklı sıklıkta hemen hemen tüm kanser türlerinde bulunmaktadır (130). Mutasyonlara ileri evre ve agresif klinik seyiri olan kanser türlerinde daha sık rastlanmaktadır (131). Sigara içicileri gibi mutajenlere yüksek düzeyde maruz kalanlarda gelişen oral, özofageal, bronşial invaziv kanserlerin %75'inde TP53 mutasyonu bulunmaktadır ve mutasyon genellikle erken preneoplastik lezyonlarda saptanabilmektedir. KRK gibi sindirim sistemi kanserlerinde TP53 mutasyonlarına polip, adenom gibi erken evre

lezyonlarda daha az rastlanmakta ancak adenom-karsinom sekansında oldukça yaygın bulunmaktadır. TP53 mutasyonuna meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde rastlanmaktadır (130). Somatik TP53 mutasyonları lösemiler, sarkomlar, testiküler, servikal kanserler, malign melanomlarda yaklaşık %5 oranında görülmektedir. Alternatif mekanizmalar yoluyla p53 inaktivasyonu bulunan kanserlerde TP3 mutasyon sıklığı daha düşük bulunmaktadır. Çoğu insan kanseri TP53 yolağını etkileyen genetik ya da epigenetik değişiklikler içermektedir (131, 132). CIN bulunan KRK'larda yaklaşık %60 oranında TP53 inaktivasyon mutasyonları bulunmaktadır (16). Kolorektal karsinogeneizde p53 kaybı geleneksel yolda geç meydana gelmekte ve preinvaziv lezyondan invaziv lezyona geçişi bildirmektedir (133). TP53 gen mutasyonlarının sıklığı ve lezyon evresi arasındaki bu ilişki mutant p53 formlarının karsinogenezin geç aşamasında tümör gelişimine dahil olduğunu göstermektedir (16). Kolorektal adenomların %4-26'sında, invaziv odak bulunan adenomların %50'sinde, KRK'ların %50-75'inde mutasyon ya da LOH gibi p53 anormallikleri bulunmaktadır (133). Minimal rezidüel hastalık takibi, ileri evre lezyona ilerleme riski bulunan erken evre lezyonların tespitinde TP53 mutasyonları yararlı olmaktadır. Düşük dereceli displazi varlığında TP53 mutasyonunun tespit edilmesi malignite gelişimi için yüksek risk bulunduğunun göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Meme kanseri, KRK, baş-boyun kanserleri, lösemiler gibi malignitelerde TP53 mutasyonu varlığı kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (131).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Etik Kurulu onayı 2020/89 sayılı karar ile alınmıştır.

3.1. Olguların Seçilmesi

Çalışmamıza 2018-2020 yılları arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenen Kolorektal Adenokarsinom (KRK) tanılı kolon ve rektuma ait rezeksiyon materyalleri içerisinde, hastanemiz Tıbbi Patoloji Laboratuvarı bünyesinde bulunan Moleküler Patoloji Laboratuvarı'nda NGS sistemiyle kolorektal panel içerisinde yer alan 32 adet gene ait mutasyon analizi yapılan olgular dahil edildi.

Olgulara ait H&E kesitleri ve bloklar arşivden çıkarıldı. Olgulara ait tüm lamalar Olympus BX53 ışık mikroskobu ile tekrar değerlendirildi. Olguların klinik özellikleri dosya kayıtlarından temin edildi. Hasta kayıtlarından hastaların cinsiyeti, yaşı, tümörün yerleşim yeri, tümör diferansiyasyonu, tümör çapı, patolojik evre, lenfovasküler ve perinöral invazyon durumu, lenf nodlarının metastatik durumu NGS sistemine ait kolorektal panel içerisinde yer alan 32 adet genin (Tablo 1) analiz sonuçları kaydedildi.

Tablo 1. NGS ile çalışılan kolorektal panel genleri

AKT1	CDC27	KRAS	PIK3CA
APC	CDK4	MET	PMS2
ATM	DCC	MLH1	PTEN
BAX	EGFR	MLH3	RET
BRAF	EPCAM	MSH2	SMAD2
BRCA1	ERBB2	MSH3	SMAD4
BRCA2	FBXW7	MSH6	TGFBR2
CASP8	KIT	NRAS	TP53

3.2. Yeni Nesil Dizilime Çalışma Yöntemi

Yapılan çalışmada, kanser panelinin rutin klinik laboratuvar uygulaması doku örneklerinden genomik ve serbest tümör DNA'sı izole edilen, uygun kalite ve miktardaki DNA'lardan hedef bölge zenginleştirilmesi, çalışma kütüphanelerinin oluşturulması ve yeni

nesil dizilemeden meydana gelmektedir. Ardından veri analizi ile çalışma kalitesinin tayini ve hastaların klinik öyküleri doğrultusunda varyant analizi ile varyantların biyoinformatik olarak yorumlanması yapılmaktadır.

3.3. Formalin Fikse Parafine Gömülü Dokulardan DNA Ekstraksiyonu

Tümör alanları patolog tarafından işaretlendi ve üreticinin talimatlarına göre Qiagen FFPE DNA doku ekstraksiyon kiti kullanılarak 10 µm kalınlığındaki kesitlerden genomik deoksiribonükleik asit (DNA) ekstraksiyonu yapıldı. Deoksiribonükleik asit, bir Qubit florometre ve Qubit 3.0 dsDNA HS tahlil kiti kullanılarak ölçüldü (Life Technologies, Calif, ABD). Çalışmaya 100-150 ng DNA elde edilen olgularla devam edildi.

3.4. Yeni Nesil Dizileme Kitaplığı Hazırlama ve Sıralama

Bu aşama, QIAseq hedefli Kolon DNA paneli ile (DHS-005Z, Qiagen, Strasse, Hilden, Almanya; Tablo 1) optimize edilmiş bir üretici protokolü ile MiniSEQ NGS platformunda (MiniSEQ, MN00676, Illumina, Singapur) gerçekleştirildi. Formalin ile fikse parafine gömülü (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) dokulardan DNA izolasyonundan sonra, aşağıdaki adımlarla devam edildi: hedef bölge zenginleştirme, kütüphane hazırlama, klonal amplifikasyon ve NGS. Daha sonra 100-150 ng FFPE DNA fragmanı uç onarımına tabi tutuldu. Hedef zenginleştirme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; Labcycler, Sensoquest GmbH, Göttinger, Almanya) ile büyütüldü. Daha sonra barkodlama ve kütüphane hazırlığı yapıldı. Kütüphaneler PCR (Labcycler, Sensoquest) ile amplifiye edildi ve hedef zenginleştirme için saflaştırıldı. Hedefle zenginleştirilmiş kitaplık daha sonra MiniSEQ NGS platformlarında (MiniSEQ) bir MiniSEQ Yüksek Çıkışlı Reaktif Kartuşu (Illumina, Inc., San Diego, Calif, ABD) kullanarak sıralandı.

3.5. DATA Analizi

Dizi sonuçlarının veri analizi ve kalite kontrolü Qiagen Clinical Insight analizi evrensel ticari yazılımı kullanılarak yapıldı. Veri kalitesi incelendikten sonra varyantlar, önceden tanımlanmış varyantlar için veri yorumlamasını sağlayan Qiagen Clinical Insight yorumlama web arayüzüne aktarıldı. Seçilen varyantlar tanı doğrulama ve klinik etkilerine ve tedavi protokolleri üzerindeki etkilerini göstermek üzere bunları değerlendirmek için ((CADD(v1.3), Alel Frekans Topluluğu, EVS(ESP6500SIV2), Refseq gen modeli, JASPAR, Vista geliştirici hg18, hg19, Klinik denemeler (Stepford 181112.001)), PolyPhen-

2, 1000 genom frekansı(faz3v5b)) biyoinformatik araçları kullanılarak analiz edildi. Hastalar içindeki varyasyonlar, Qiagen raportör ve Qiagen Clinical Insight Browser platformları ile belirlendi. Tanımlanan her değişken için örnek başına bulguların bir özetinden oluşan bir rapor oluşturuldu, ardından veri kaynağına doğrudan bağlantı ve önerilen tedaviyi listeleyen Qiagen Bilgi Tabanı geldi. Bu panel için tespit limiti %5 olarak belirlenmiş olup, NGS test süreci yaklaşık 5-7 gün sürmüştür.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler “SPSS 22.0 Package Program” ile gerçekleştirildi. Gruplar arasında sıklıklar bakımından fark bulunup bulunmadığı yerine göre Ki-kare ya da Fisher testleri (hücrelerde gözlenen değerlerin Ki-kare testi varsayımlarını sağlamadığı durumda) kullanılarak karşılaştırıldı. P değerinin 0,05’nin altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 2018-2020 yılları arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenen kolon ve rektuma ait rezeksiyon materyalleri içerisinde KRK tanılı, parafin bloklarda yeterli tümöral dokuya sahip, DNA izolasyonu yapılabilen, NGS sistemi ile çalışma sonucu kalite kontrolünden geçmiş olan toplam 73 olgu alındı. Olgulara ait klinikopatolojik özellikler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Olguların klinikopatolojik özellikleri ve dağılımları

Klinikopatolojik Özellikler	n (%)
Cinsiyet	
Kadın	26 (%35,6)
Erkek	47 (%64,4)
Yaş	
Yaş aralığı	32-86
Yaş ortalaması	62,53
Tümör yerleşim yeri	
Proksimal kolon	27 (%37)
Distal kolon	29 (%39,7)
Rektum	17 (%23,3)
Tümör boyutu	
Boyut aralığı	1,5-11,5
Ortalama boyut	4,521
Tümör diferansiyasyonu	
İyi diferansiye	11 (%15,1)
Orta Derecede diferansiye	46 (%63)
Az diferansiye	7 (%9,6)
Müsinöz	9 (%12,3)
Evre	
pT1	1 (%1,4)
pT2	9 (%12,3)
pT3	51 (%69,9)
pT4	12 (%16,4)
LVİ	
Var	63 (%86,3)
Yok	10 (%13,7)
PNİ	
Var	51 (%69,9)
Yok	22 (%30,1)
Lenf Nodu Metastazı	
Var	39 (%53,4)
Yok	34 (%46,6)

LVİ: Lenfovasküler invazyon, PNİ: Perinöral invazyon

4.1. Klinikopatolojik Parametreler ve Gen Mutasyonları Arasındaki İlişki

4.1.1. Cinsiyet

Çalışmaya dahil edilen toplam 73 olgunun 47'si (%64,4) erkek, 26'sı (%35,6) kadındı.

Gen mutasyonları ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.2. Yaş

Olguların yaşı 32-86 arasında dağılım göstermekte olup ortalama yaş 62,53 olarak saptandı. Hastaların 10'u (%13,7) 50 yaş altında iken 63'ü (%86,3) 50 yaşın üzerindeydi.

Gen mutasyonları ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.3. Tümör yerleşim yeri

Tümörlerin 27'si (%37) proksimal kolon, 29'u (%39,7) distal kolon, 17'si (%23,3) rektum yerleşimliydi.

Proksimal kolon yerleşimli 27 tümörün 8'inde (%29,6) BRAF V600E mutasyonu saptandı. Ayrıca BRAF V600E mutasyonu bulunan 10 olgunun 8'i (%80) proksimal kolon yerleşimliydi. Proksimal kolon yerleşimi ile BRAF V600E mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.01$).

Diğer gen mutasyonları ile tümör yerleşim yeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.4. Tümör çapı

Çalışmaya dahil edilen olgular arasında tümör çapı 1,5-11,5 cm arasında değişmekte olup ortalama tümör çapı 4,52 cm, median tümör çapı 4,5 cm olarak saptandı. ROC analizi ile belirlenen optimal cut-off değeri 4,35 cm olarak belirlendi. Tümör çapı 4,35 cm'den az olan olguların sayısı 36 (%49,3) iken fazla olan olguların sayısı 37 (%50,7) idi.

Tümör çapı 4,35 cm'den büyük olan toplam 37 tümörün 10'unda (%27) MSH3 gen mutasyonu izlendi. MSH3 gen mutasyonu bulunan toplam 13 olgudan 10'unun (%76,9) tümör çapı 4,35 cm'den büyük olarak saptandı. MSH3 gen mutasyonu ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak pozitif anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

Diğer gen mutasyonları ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.5. Tümör diferansiyasyonu

Çalışmaya dahil edilen tümörlerin 11'i (%15,1) iyi diferansiye, 46'sı (%63) orta derecede diferansiye, 7'si (%9,6) az diferansiye, 9'u (%12,3) müsinöz adenokarsinom morfolojisindeydi.

Toplam 7 az diferansiye tümörün 4'ünde (%57,1) BRAF mutasyonu bulunurken 3'ünde (%42,9) BRAF mutasyonu saptanmadı. Ayrıca BRAF mutasyonu bulunan 13 tümörün 4'ü (%30,8) az diferansiyeydi. Az diferansiye tümörler ile BRAF mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.025$).

Müsinöz morfolojideki 9 tümörden 7'sinde (%77,8) KRAS ekzon 2'de mutasyon saptandı. Ayrıca KRAS ekzon 2'de mutasyon bulunan 26 tümörden 7'si (%26,9) müsinöz adenokarsinom morfolojisindeydi. Müsinöz adenokarsinomlar ile KRAS ekzon 2 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.042$).

İyi diferansiyasyon gösteren 11 tümörün 3'ünde (%27,3) KRAS ekzon 3'te mutasyon saptandı. KRAS ekzon 3'te mutasyon bulunan 4 tümörden 3'ü (%75,0) iyi diferansiye tümörlerdi. KRAS ekzon 3 mutasyonu ile iyi diferansiye tümörler arasında istatistiksel olarak pozitif anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.028$).

Diğer gen mutasyonları ile tümör diferansiyasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.6. Tümör evresi

Toplam 73 olgunun 1'i (%1,4) pT1, 9'u (%12,3) pT2, 51'i (%69,9) pT3, 12'si (%16,4) pT4 olarak saptandı.

Evre pT2 olan 9 tümörden 6'sında (%66,7) PTEN mutasyonu saptandı. Ayrıca PTEN mutasyonu bulunan toplam 23 tümörün 6'sı (%25,0) pT2 olarak bulundu. Evre pT2 tümörler ile PTEN mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki gözlemlendi ($p<0.048$).

Diğer gen mutasyonları ile tümör evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.7. Lenfovasküler invazyon (LVİ)

Olguların 63'ünde (%86,3) LVİ izlenmiş olup 10'unda (%13,7) LVİ saptanmadı.

Lenfovasküler invazyon bulunan 63 tümörden hiçbirinde (%0) MSH6 mutasyonuna rastlanmadı. Lenfovasküler invazyon ile MSH6 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.002$).

Diğer gen mutasyonları ile LVİ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.8. Perinöral invazyon (PNİ)

Olguların 51'inde (%69,9) PNİ bulunurken 22'sinde (%30,1) PNİ saptanmadı. Perinöral invazyon bulunmayan 22 tümörden 4'ünde (%18,2) FBXW7 mutasyonu izlendi. FBXW7 mutasyonu bulunan 5 tümörden 4'ünde (%80,0) PNİ'ye rastlanmadı. Perinöral invazyon ile FBXW7 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.027$).

Perinöral invazyon bulunmayan 22 tümörden 3'ünde (%13,6) MSH6 mutasyonu izlendi. Perinöral invazyon ile MSH6 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.025$).

Perinöral invazyon bulunmayan 22 tümörden 9'unda (%40,9) PIK3CA mutasyonu saptandı. PIK3CA mutasyonu bulunan 18 tümörden 9'unda (%50,0) PNİ izlenmedi. Perinöral invazyon ile PIK3CA mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.043$).

Diğer gen mutasyonları ile PNI arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.1.9. Lenf nodu metastazı

Olguların 39'unda (%53,4) lenf nodu metastazı bulunurken 34'ünde (%46,6) lenf nodu metastazı izlenmedi.

Lenf nodu metastazı bulunmayan 34 olgudan 5'inde (%14,7) BRCA1 mutasyonu bulundu. BRCA1 mutasyonu bulunan 5 olgunun hiçbirinde (%0,0) lenf nodu metastazına rastlanmadı. Lenf nodu metastazı ile BRCA1 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.019$).

Lenf nodu metastazı bulunmayan 34 tümörden 10'unda (%29,4) BRCA2 mutasyonu izlendi. BRCA2 mutasyonu bulunan 12 tümörün 10'unda (%83,3) lenf nodu metastazına rastlanmadı. Lenf nodu metastazı ile BRCA2 mutasyonu arasında istatistiksel olarak negatif anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.009$).

Diğer gen mutasyonları ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

NGS ile mutasyon saptanan APC, ATM, BAX, CDC27, DCC, EGFR, ERBB2, MLH3, MSH2, NRAS, PMS2, SMAD2, SMAD4, TGFBR2 ve TP53 genleri ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.2. NGS – Gen Mutasyonları ve Aralarındaki İlişki

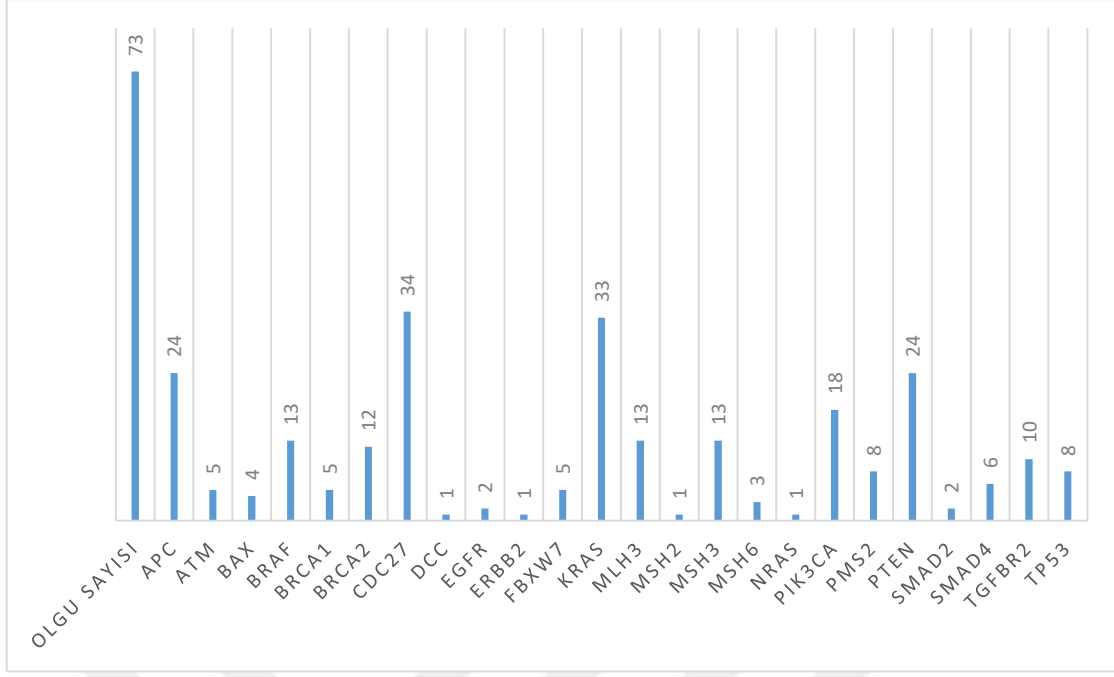
Olguların tamamında birden fazla mutasyon vardı. Çalışmamızda saptanan mutasyon oranları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Birlikte mutasyonu saptanan genler

	n (%)		n (%)
APC – BRCA2	8 (%11)	CDC27 – PIK3CA	3 (%4,1)
APC – CDC27	21 (%28,8)	CDC27 – PMS2	8 (%11)
APC – MLH3	9 (%12,3)	CDC27 – PTEN	22 (%30,13)
APC – PMS2	6 (%8,2)	CDC27 – TGFBR2	10 (%13,7)
APC – PTEN	17 (%23,2)	EGFR – ERBB2	1 (%1,4)
APC – TP53	7 (%9,6)	FBXW7 – MSH6	2 (%2,7)
APC – TGFBR2	7 (%9,6)	FBXW7 – PMS2	3 (%4,1)
BAX – BRCA1	2 (%2,7)	FBXW7 – PTEN	4 (%5,5)
BAX – CDC27	4 (%5,5)	FBXW7 – TGFBR2	3 (%4,1)
BRAF – KRAS	0 (%0)	MLH3 – MLH3	9 (%12,3)
BRCA1 – BRCA2	4 (%5,5)	MLH3 – PTEN	11 (%15)
BRCA1 – CDC27	5 (%6,8)	MLH3 – TGFBR2	7 (%9,6)
BRCA1 – MLH3	4 (%5,5)	MSH3 – PTEN	11 (%15)
BRCA1 – MSH2	1 (%1,4)	MSH3 – SMAD2	2 (%2,7)
BRCA1 – MSH3	4 (%5,5)	MSH3 – TGFBR2	8 (%11)
BRCA1 – MSH6	2 (%2,7)	MSH6 – PTEN	3 (%4,1)
BRCA1 – TGFBR2	5 (%6,8)	MSH6 – TGFBR2	2 (%2,7)
BRCA2 – CDC27	11 (%15)	PIK3CA – PTEN	2 (%2,7)
BRCA2 – MLH3	6 (%8,2)	PIK3CA – PTEN	2 (%2,7)
BRCA2 – PTEN	8 (%11)	PMS2 – PTEN	7 (%9,6)
CDC27 – FBWX7	5 (%6,8)	PTEN – TGFBR2	8 (%11)
CDC27 – MLH3	13 (%17,8)	SMAD2 –TGFBR2	2 (%2,7)
CDC27 – MSH3	13 (%17,8)		

NGS analizi yapılan olgularda APC gen mutasyonu 24 (%32,9) hastada, ATM gen mutasyonu 5 (%6,8), BAX gen mutasyonu 4 (%5,5), BRAF gen mutasyonu 13 (%17,8), BRCA1 gen mutasyonu 5 (%6,8), BRCA2 gen mutasyonu 12 (%16,4), CDC27 gen mutasyonu 34 (%46,6), DCC gen mutasyonu 1 (%1,4), EGFR gen mutasyonu 2 (%2,7), ERBB2 gen mutasyonu 1 (%1,4), FBXW7 gen mutasyonu 5 (%6,8), KRAS mutasyonu 33 (%45,2), MLH3 gen mutasyonu 13 (%17,8), MSH2 gen mutasyonu 1 (%1,4), MSH3 gen mutasyonu 13 (%17,8), MSH6 gen mutasyonu 3 (%4,1), NRAS gen mutasyonu 1 (%1,4) hastada, PIK3CA gen mutasyonu 18 (%24,7), PMS2 gen mutasyonu 8 (%11), PTEN gen mutasyonu 24 (%32,9), SMAD2 gen mutasyonu 2 (%2,7), SMAD4 gen mutasyonu 6 (%8,2), TGFBR2 gen mutasyonu 10 (%13,7), TP53 gen mutasyonu 8 (%11) hastada bulundu.

Olgularımızın hiçbirinde AKT1, CASP8, CDK4, EPCAM, KIT, MET, MLH1, RET genlerinde mutasyona rastlanmadı.



Şekil 15. Mutant genlerin dağılımı

4.2.1. APC Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 24'ünde (%32,9) APC gen mutasyonu mevcuttu. APC mutasyonu bulunan 24 olgunun 8'inde (%33,3) BRCA2, 21'inde (%87,5) CDC27, 4'ünde (%16,7) FBXW7, 9'unda (%37,5) MLH3, 6'sında (%25,0) PMS2, 17'sinde (%70,8) PTEN, 7'sinde (%29,2) TGFBR2, 7'sinde (%29,2) TP53 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile APC mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.2. ATM Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 5'inde (%6,8) ATM gen mutasyonu mevcuttu. ATM mutasyonu ile diğer gen mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.2.3. BAX Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 4'ünde (%5,5) BAX gen mutasyonu mevcuttu. BAX mutasyonu bulunan 4 olgunun 2'sinde (%50) BRCA1, 4'ünde (%100) CDC27 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile BAX mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.4. BRAF Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

BRAF gen mutasyonu 13 (%17,8) hastada saptandı. BRAF mutasyonlarının 10'u (%76,9) BRAF V600E, 3'ü (%23,1) BRAF V600E dışı mutasyon olarak bulundu.

BRAF mutasyonu bulunan 13 olgunun hiçbirinde eşzamanlı KRAS mutasyonu saptanmadı. BRAF mutasyonları ile KRAS mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.001$). Diğer gen mutasyonları ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

4.2.5. BRCA1 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 5'inde (%6,8) BRCA1 gen mutasyonu saptandı. BRCA1 mutasyonu bulunan 5 olgunun 2'sinde (%40) BAX, 4'ünde (%80) BRCA2, 5'inde (%100) CDC27, 4'ünde (%80) MLH3, 1'inde (%20) MSH2, 4'ünde (%80) MSH3, 2'sinde (%40) MSH6, 5'inde (%100) TGFBR2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile BRCA1 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.6. BRCA2 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 12'sinde (%16,4) BRCA2 gen mutasyonu saptandı. BRCA2 mutasyonu bulunan 12 olgunun 8'inde (%66,7) APC, 4'ünde (%33,3) BRCA1, 11'inde (%91,7) CDC27, 6'sında (%50) MLH3, 8'inde (%66,7) PTEN mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile BRCA2 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.7. CDC27 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 34'ünde (%46,6) CDC27 gen mutasyonu saptandı. CDC27 mutasyonu bulunan 34 olgunun 21'inde (%61,8) APC, 4'ünde (%11,8) BAX, 5'inde (%14,7) BRCA1, 11'inde (%32,4) BRCA2, 5'inde (%14,7) FBXW7, 13'ünde (%38,2) MLH3, 13'ünde (%38,2) MSH3, 3'ünde (%8,8) PIK3CA, 8'inde (%23,5) PMS2, 22'sinde (%64,7) PTEN, 10'unda (%29,4) TGFBR2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile CDC27 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.8. DCC Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 1'inde DCC gen mutasyonu (%1,4) saptandı. Diğer gen mutasyonları ile DCC mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.9. EGFR Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 2'sinde (%2,7) EGFR gen mutasyonu saptandı. EGFR mutasyonu bulunan 2 olgunun 1'inde (%50) ERBB2 mutasyonu eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile EGFR mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.10. ERBB2 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 1'inde (%1,4) ERBB2 gen mutasyonu saptandı. ERBB2 mutasyonu bulunan 1 olguda eşzamanlı olarak EGFR mutasyonu bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile ERBB2 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.11. FBXW7 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 5'inde (%6,8) FBXW7 gen mutasyonu saptandı. FBXW7 mutasyonu bulunan 5 olgunun 4'ünde (%80) APC, 5'inde (%100) CDC27, 2'sinde (%40) MSH6, 3'ünde (%60) PMS2, 4'ünde (%40) PTEN, 3'ünde (%60) TGFRB2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile FBXW7 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.12. KRAS Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 33'ünde (%45,2) KRAS gen mutasyonu saptandı. KRAS mutasyonlarından 26'sı (%78,8) ekzon 2, 4'ü (%12,1) ekzon 3, 3'ü (%9,1) ekzon 4 içerisindeydi. Müsinöz morfolojideki 9 tümörden 7'sinde (%77,8) KRAS ekzon 2'de mutasyon saptandı.

BRAF V600E mutasyonu dahil olmak üzere BRAF mutasyonları ile KRAS mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.001$). Diğer gen mutasyonları ile KRAS mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.13. MLH3 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 13'ünde (%17,8) MLH3 gen mutasyonu saptandı. MLH3 mutasyonu bulunan 13 olgunun 9'unda (%69,2) APC, 4'ünde (%30,8) BRCA1, 6'sında (%46,2) BRCA2, 13'ünde (%100) CDC27, 11'inde (%84,6) PTEN, 7'sinde (%53,8) TGFRB2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile MLH3 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.14. MSH2 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 1'inde (%1,4) MSH2 gen mutasyonu saptandı. MSH2 gen mutasyonu bulunan 1 (%100) olguda eşzamanlı olarak BRCA1 mutasyonu bulunmaktaydı. MSH2 gen mutasyonları ile BRCA1 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$). MSH2 mutasyonu ile diğer gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.2.15. MSH3 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 13'ünde (%17,8) MSH3 gen mutasyonu saptandı. MSH3 mutasyonu bulunan 13 olgunun 11'inde (%84,6) APC, 4'ünde (%30,8) BRCA1, 13'ünde (%100) CDC27, 9'unda (%69,2) MLH3, 11'inde (%84,6) PTEN, 2'sinde (%15,4) SMAD2, 8'inde (%61,5) TGFRB2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile MSH3 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.16. MSH6 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 3'ünde (%4,1) MSH6 gen mutasyonu saptandı. MSH6 mutasyonu bulunan 3 olgunun 2'sinde (%66,7) BRCA1, 2'sinde (%66,7) FBXW7, 3'ünde (%100) PTEN, 2'sinde (%66,7) TGFRB2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile MSH6 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.17. NRAS Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 1'inde (%1,4) NRAS gen mutasyonu mevcuttu. NRAS gen mutasyonu ve diğer gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.2.18. PIK3CA Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 18'inde (%24,7) PIK3CA gen mutasyonu saptandı. PIK3CA mutasyonu bulunan 18 olgunun 3'ünde (%16,7) CDC27, 2'sinde (%11,1) PTEN mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu. PIK3CA mutasyonu ile CDC27 ve PTEN mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile PIK3CA mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.19. PMS2 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 8'inde (%11) PMS2 gen mutasyonu saptandı. PMS2 mutasyonu bulunan 8 olgunun 6'sında (%75) APC, 8'inde (%100) CDC27, 3'ünde (%37,5) FBXW7, 7'sinde (%87,5) PTEN mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile PMS2 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.20. PTEN Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 24'ünde (%32,9) PTEN gen mutasyonu saptandı. PTEN mutasyonu bulunan 24 olgunun 17'sinde (%70,8) APC, 8'inde (%33,3) BRCA2, 22'sinde (%91,7) CDC27, 4'ünde (%16,7) FBXW7, 11'inde (%45,8) MLH3, 11'inde (%45,8) MSH3, 3'ünde (%12,5) MSH6, 7'sinde (%29,2) PMS2, 8'inde (%33,3) TGFBR2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı. PTEN mutasyonu ile PIK3CA mutasyonu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile PIK3CA mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.21. SMAD2 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 2'sinde (%2,7) SMAD2 gen mutasyonu saptandı. SMAD2 mutasyonu bulunan 2 olgunun 2'sinde (%100) MSH3 ve TGFBR2 mutasyonları

eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile SMAD2 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.22. SMAD4 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların mutasyonu 6'sında (%8,2) SMAD4 gen mutasyonu saptandı.

SMAD4 gen mutasyonu ile diğer gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

4.2.23. TGFBR2 Gen Mutasyonu ve Diğer Gen Mutasyonları ile İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 10'unda (%13,7) TGFBR2 gen mutasyonu saptandı.

TGFBR2 mutasyonu bulunan 10 olgunun 7'sinde (%70) APC, 5'inde (%50) BRCA1, 10'unda (%100) CDC27, 3'ünde (%30) FBXW7, 7'sinde (%70) MLH3, 8'inde (%80) MSH3, 2'sinde (%20) MSH6, 8'inde (%80) PTEN, 2'sinde (%20) SMAD2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile TGFBR2 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

4.2.24. TP53 Gen Mutasyonu ve Diğer Genlerle İlişkisi

Çalışmamıza dahil edilen olguların 8'inde (%11) TP53 gen mutasyonu saptandı. TP53 mutasyonu bulunan 8 olgunun 7'sinde (%87,5) APC mutasyonu eşzamanlı olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$). Diğer gen mutasyonları ile TP53 mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

KRK çeşitli klinik ve genetik özelliklere sahip oldukça heterojen bir hastalıktır. Klinikopatolojik evreleme uzun zamandır KRK prognozunu belirlemede temel parametre olarak kullanılmaktadır. NGS teknolojisi ile kolorektal karsinogeneze dahil olan genler ve KRK'ların genomik profilleri ile ilgili bilgimiz her geçen gün artmakta, KRK'ların genomik profilinin ortaya çıkarılması da tümör heterojenitesinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Buna karşın varolan tedavi seçeneklerine yanıtların öngülebilmesi, kapsamlı ve bireyselleştirilmiş yeni tedavilerin geliştirilmesi tümörlerin genomik profilleri üzerindeki belirsizliğin ortadan kaldırılmasıyla mümkündür, bu da daha fazla çalışma yapılmasını gerektirmektedir. Çalışmamızda prognostik önemi bilinen çeşitli klinikopatolojik parametreler ve NGS ile çalışılan 32 gene ait sonuçların incelenmesi ile bölgemizdeki KRK olgularına ait veriler ortaya konulmaktadır.

APC geni KRK'larda tümör supresör gen olarak kabul edilmektedir ve karsinogenezin erken aşamalarında görev almaktadır. APC, KRK'larda en sık mutasyona uğrayan sürücü genlerden olmakla birlikte bu gen prognostik sınıflandırmalara dahil edilmemektedir (134). Çalışmamızda %32,9 oranında mutasyon saptadığımız APC geninin literatürde bildirilen yaklaşık %50-81 (23) oranından düşük olduğu dikkat çekmektedir. Olgularımızın çoğunluğunun ileri evrede olmasına karşın bu düşük oranın bölgesel faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yine APC mutasyonu ile değerlendirdiğimiz klinikopatolojik parametreler arasında da herhangi anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmamızda APC geni mutasyonları ile BRCA2, FBXW7, MLH3, PMS2, PTEN, TGFBR2, TP53, CDC27 arasında pozitif anlamlı ilişki bulunmuştur. Literatürde karsinogenez ve hedefe yönelik tedaviler için potansiyel bir hedef görülen ve diğer çalışmalarda prognostik önemi belirlenemeyen APC mutasyonlarının prognostik faktörler ile ilişkisi bizim çalışmamızda da gösterilememiştir. Ancak çalışmamızda diğer bazı gen mutasyonları ile en çok anlamlı birliktelik gösteren genlerden biri olan APC'nin dolaylı olarak prognostik değerinin olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Genom bütünlüğünü kontrol eden tümör supresör bir gen olan BRCA2'nin meme ve over kanserleri ile güçlü bir ilişkisi olmasına karşın KRK ile ilişkisi konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (51, 53). Zhunussova ve ark. (135) çalışmasında APC geni ile birlikte en sık mutasyona uğrayan tümör supresör genler arasında BRCA2 geni de bulunmaktadır (135). Pearlman ve ark. (136) erken başlangıçlı KRK'lar için yatkınlığa

neden olan genleri analiz ettikleri çalışma sonucu BRCA2 geninde yüksek bir mutasyon prevalansı olduğunu göstermektedir (136). Yurgelun ve ark. KRK olgularında çalışmasında 2 hastada BRCA1/APC birlikteliği bulunduğunu, bunun yanında BRCA1/BRCA2 oranının genel populasyon prevalansından önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmektedir. Bazı hastalarda eşzamanlı APC ve BRAC1/BRCA2 mutasyonları bulunması germline mutasyonlarının varlığı ile KRK riskini artırdığı olasılığını ortaya çıkarmaktadır (137). Bunun yanısıra yaygın olarak bulunmayan moleküler değişikliklerin tespit edilmesi yeni bireysel tedavi seçenekleri sağlayabilmektedir. BRCA1/BRCA2 mutasyonu veya kaybı bulunan tümörlere sahip hastaların Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP) inhibitörlerinden yarar gördüğü bilindiğinden çalışmamızda da ortaya konulduğu gibi bu iki tümör supresör genin mutasyonu olan olgularda tedavi için araştırılması gereken bir hedef olabilecektir (138).

FBXW7 geni bir tümör supresör gen olarak bilinmektedir. (23, 78, 139). Literatürdeki bazı çalışmalar düşük FBXW7 ekspresyonunun KRK'larda kötü prognoz ile ilişkili olduğunu, FBXW7 inaktivasyonu ya da downregülasyonunun KRK gibi çeşitli kanserlerde kemoterapötiklere direnç gelişimine neden olabileceğini öne sürmektedir (78). APC ve FBXW7 gibi diğer WNT yolağı genleri ile p53 arasında bağlantı bulunmakta, FBXW7 geni DNA hasarına karşı gelişen p53 yanıtının aracısı olarak hareket etmektedir. Aynı yolda bulunan çoklu mutasyonların kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki olumsuz etki bu şekilde açıklanmaktadır (140). Yeh ve ark. (139) FBXW7 mutasyonları ile olası gen mutasyonu birlikteliklerini belirlemek için yaptıkları çalışmada FBXW7 mutant hücrelerin %47 kadarında aynı zamanda APC mutasyonları da bulunduğunu bildirilmektedir (139). Çok sayıda çalışmaya karşın FBXW7 mutasyonu bulunan hastaları temsil eden hiçbir klinikopatolojik, demografik özellik henüz bulunmamaktadır. FBXW7 mutasyonlarının kemoterapötiklere direnç gelişimindeki rolünün ve çalışmamızda da saptadığımız APC gen mutasyonları ile birlikteliğinin tümör progresyonuna etkisinin ayrıntılı araştırılması gereken yeni hedeflerden biri olabileceği düşünülmektedir (78, 139).

MSI, KRK'larda major karsinogenetik yollardan biri olarak kabul edilmektedir. Mekanizma ne olursa olsun MMR bozukluğunun hem MSI'ye hem de diğer yaygın sinyal yollarında patojenik varyantlara neden olabileceği açıktır ve bu durum verilecek tedavi kararlarını etkilemektedir. Kalıtsal ya da somatik bir bileşen olarak MSI KRK'ların gelişiminde MLH3 geninin rolü bulunmadığı yönünde görüşler olmasına karşın MLH3'ün

primer rolünün gastrointestinal tümörlerin gelişimini engellemek olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (141, 142). Lipkin ve ark. (143) tarafından yakın zamanda karakterize edilmiş olan MLH3'ün MSI-H KRK'ların %25'inde somatik mutasyonu bulunduğu aynı çalışmada belirtilmektedir (143). Ma ve ark. (144) PMS2'deki somatik mutasyonların sporadik MSI KRK'lara neden olabileceğini bildirdikleri çalışması sporadik KRK'larda PMS2'de somatik mutasyonların varlığı ile karsinogenezin MSI yolağında PMS2'deki defektlerin de rolü olabileceğini göstermektedir (144). Yakın zamanda Marcolino ve ark. (145) yapmış olduğu çalışma PMS2 ekspresyon kaybı olan hastalarda APC geninde mutasyon veya delesyon olasılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Chen ve ark. çalışmasında MLH3, PMS2 ve APC gen mutasyonları arasındaki etkileşimlerin tümör gelişimini artırdığı ve tümör progresyonunu hızlandığını bildirmektedir (141). Bizim çalışmamızda da, MSI KRK gelişimine neden olan dMMR mekanizmasında ait MLH3 ve PMS2 mutasyonları ile APC mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur. Karsinogenez mekanizmaları ile sinyal yolları arasındaki etkileşimlerin aydınlatılmasını sağlayan çalışmalardan sonra bu mekanizmalara ve yollara ait genler arasındaki etkileşimlerin aydınlatılması tedavi belirleme, tedavi yanıtı ve prognozu öngörme açısından önem taşımaktadır.

APC kaybı KRK için önemli bir başlatıcı ve gerekli bir olay olmakla birlikte ilerlemiş hastalık gelişimi için PI3K sinyal yolağı gibi diğer yollardaki ek mutasyonlar gerekmektedir (146). PTEN bir tümör supresör gendir ve PI3K sinyal yolağını antagonize etmektedir. PTEN fonksiyon kaybının birçok açıdan karsinogenez üzerinde etkisi bulunmaktadır ve PTEN somatik mutasyonları insan kanserlerinde büyük bir oranda meydana gelmektedir (111, 112). PI3K aktivasyonu ya da PTEN kaybı, APC inaktivasyonu durumunda intestinal epitelde tümör gelişimini dramatik şekilde artırmaktadır (147). Tabrizian ve ark. (146) oluşturdukları fare modelinde PTEN inaktivasyonunun intestinal kök hücrelerde proliferasyon oranını artırmasına karşın tek başına tümör gelişimine neden olmadığı ancak APC eksikliği durumunda PTEN inaktivasyonunun kök hücrelerden tümör gelişimi üzerine potansiyelize edici bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (146). Langlois ve ark. (148) fare modeli sonucunda PTEN'in, APC inaktivasyonu ile başlayan tümör progresyonunu kısıtlamak için bir negatif düzenleyici olduğunu öne sürmektedir. Bu çalışma sonucunda intestinal epitelde PTEN ekspresyon kaybının tek başına tümör gelişimi için yeterli olmadığı ancak APC mutasyonu ile birlikte intestinal tümör yükünü artırdığı öne sürülmektedir (148). Benzer şekilde PTEN kaybı ve artmış AKT

sinyalizasyonunun APC kaybı durumunda tümör gelişiminin ve progresyonunun hızlı bir şekilde gerçekleştiği Marsh ve ark. (149) tarafından bildirilmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda saptadığımız %70,8 oranındaki APC ve PTEN mutasyonu birlikteliğinin KRK karsinogenezinde etkisini destekler niteliktedir. Langlois ve ark. (148) çalışmalarında PTEN ekspresyon kaybının APC mutasyonu bulunan KRK'larda kötü prognostik olduğunu belirtmektedir (148). Prognostik önemine ek olarak PTEN'in hedefe yönelik tedaviler açısından prediktif önemini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. PTEN kaybının KRAS wild tip KRK'larda da anti-EGFR tedavilere yanıtızlığa neden olduğu düşünülmekte, ayrıca PTEN kaybı kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. KRK'larda terapötik hedefler olarak PI3K/mTOR ve MEK inhibitörlerinin kullanımı üzerine tasarladıkları fare modelleri sonucunda Raja ve ark. (150) KRK'larda PI3K/mTOR inhibisyonunun ancak kombine APC ve PTEN mutasyonlarının varlığında oldukça etkili olduğunu bildirmektedir (150). Çalışmamızda yüksek bir oranda saptadığımız APC ve PTEN mutasyonu birlikteliğinden yola çıkarak PTEN'in hem bir progresyon hem de tedavi planlanmasında ve terapötlere yanıtları öngörmede yararlanılabilecek önemli bir belirteç olarak daha ileri çalışmaların iyi bir hedefi olabileceğini düşünmekteyiz.

KRK'ların yüksek bir yüzdesinde TGFB yolağında değişiklikler bulunmaktadır ve bu mutasyonlar hem MSI hem CIN KRK'larda görülmektedir (123). KRK'larda TGFB sinyalizasyon kaybının en sık nedeni TGFB2'deki mutasyonlardır. TGFB normal intestinal epitelde bir tümör supresör olarak görev almakta ve kolorektal karsinogenezin geç döneminde yüksek oranda eksprese edilerek tümör progresyonunu artırmaktadır (124). Munoz ve ark. (151) TGFB2'deki delesyonun intestinal epitelde hücre proliferasyonu üzerine etkisi olmadığını ve tek başına TGFB sinyalizasyon kaybının intestinal tümör gelişimi için yeterli olmadığını bildirmektedir. Aynı çalışmada TGFB2 inaktivasyonunun adenomların adenokarsinomlara progresyonuna yalnızca bir APC mutasyonu varlığında neden olduğu gösterilmektedir (151). Oshima ve ark. (152) tarafından yapılan çalışmada tek başına APC mutasyonuna sahip farelerde noninvaziv adenomlar görülürken APC ve TGFB2 mutasyonlarının birlikte bulunduğu farelerde submukoza invazyon gösteren adenokarsinomlar geliştiği bildirilmektedir (152). Çalışmamızda %29,2 oranında saptadığımız APC ve TGFB2 mutasyonlarının birlikteliği, hem TGFB hem WNT sinyal yollarının KRK'larda etkilenmiş olduğunu; tümör başlangıcı ve progresyonunda birlikte hareket ettiği görüşünü desteklemektedir. Bu durumun KRK'larda TGFB sinyal yolağını hedefleyen tedavi stratejileri bakımından önemli olacağı da göz önüne alınmalıdır.

CIN yolağı anahtar genlerdeki mutasyonların birikimi ile karakterize edilmektedir ve CIN yolağına ait bilinmesi gereken önemli genler ve mutasyonlar arasında APC ve TP53 bulunmaktadır (39). APC mutasyonu, kolorektal karsinogenezdeki en erken genetik olay olarak bilinmektedir (16). APC mutasyonu olmadan adenom-karsinom sekansının gerçekleşmesi mümkün olmadığından APC mutasyonu malign transformasyonun kapısı olarak kabul edilmektedir. TP53 mutasyonu, karsinogenezde non-invaziv hastalıktan invaziv hastalığa geçiş aşamasında büyük önem taşımaktadır. Bununla paralel olarak TP53 mutasyonları, adenomlarda %5, malign poliplerde %50 ve invaziv KRK'larda %75 oranında artan sıklıkta bulunmaktadır (39). TP53 mutasyonlarının sıklığı ve lezyon aşaması arasındaki bu ilişki ile TP53 mutasyonlarının tümörögenезin geç bir aşamasında tümör gelişimini desteklediğini göstermektedir (16). CIN yolağı aracılığı ile gelişen mutasyon oranı düşük MSS KRK'larda APC ve TP53 geni en sık mutasyona uğrayan genler arasında yer almaktadır (4). Kanser Genom Atlas (TCGA) projesine göre CIN MSS KRK'larda APC geninde %81, TP53 geninde %60 oranında; mutasyon oranı yüksek MSI tümörlerde APC geninde %51, TP53 geninde %20 oranında mutasyon bulunmaktadır (23). Bizim çalışmamız sonucunda APC geninde %32,9, TP53 geninde %11 oranında mutasyon saptanmıştır. CIN yolağındaki moleküler basamaklar KRK'ların tamamında birlikte bulunmamakta, bazen diğer genetik olaylar tarafından bypass edilmektedir. Bu açıdan çalışmamızda, karsinogenezin erken döneminde görevli bir gen olan APC'deki mutasyonların, karsinogenezin geç döneminde yer alan bir gen olan TP53 mutasyonlarına göre daha sık bulunmuş olması şaşırtıcı değildir. MSS ya da MSI ayrımı olmaksızın tüm KRK'ların çalışmaya dahil edilmiş olmasının çalışmamızdaki mutasyon oranlarının literatüre göre daha düşük saptanmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamız sonucunda tüm olguların %9,6'sında APC ve TP53 genlerinin birlikte mutasyona uğradığı ve APC ile TP53 gen mutasyonu birlikteliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Hem MSI KRK'larda mutasyona uğradıkları bilinen hem CIN yolağı aracılığıyla gelişen MSS KRK'larda en sık mutasyona uğrayan genlerden arasında olan APC ve TP53 genlerinin çalışmamız sonucunda anlamlı birlikteliğinin saptanması literatür verileriyle de desteklenmektedir.

CDC27'nin mitozu düzenlemede görev aldığı düşünülmektedir (153). CDC27'nin KRK'larda metastaz gelişimini desteklediği (58), potansiyel bir prognostik belirteç (57, 154) ve terapötik bir hedef (57, 58, 154) olabileceği yönünde çalışmalar olsa da kolorektal karsinogeneze dahil olan diğer gen mutasyonları ile birlikteliği veya ilişkisi ile ilgili literatür

verisi bulunmamaktadır. Öte yandan CDC27 psödogenleri üzerindeki varyantların NGS ile yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir (154). Çalışmamızda APC mutasyonu ile anlamlı ilişkisini saptadığımız ve yeterince literatür verisi bulunmayan CDC27 mutasyonlarının KRK karsinogenezinde önemli rol üstlendiği anlaşılmaktadır.

BAX transkripsiyonu TP53 tarafından aktive edilmektedir. Kemoterapinin tümör hücrelerinin ölümüne neden olabilmesi için apoptotik yolağın intakt olması gerekmektedir. Antiapoptotik faktörlerin upregülasyonu veya BAX gibi proapoptotik mediatörlerin downregülasyonu TP53'ten bağımsız mekanizmalar yoluyla da kemoterapötiklere direnç neden olabilmektedir. Bunun yanında primer tümöre kıyasla KRK metastazlarında önemli ölçüde daha düşük BAX ekspresyonu bulunması BAX'ın metastaz gelişiminde rolü oynayabileceğini düşündürmektedir (46).

Çalışmamızda %5,5 oranında saptadığımız BAX gen mutasyonu literatürde belirtilenden daha düşük oranda bulunmuştur. Çalışmamızda BRCA1 ve CDC27 gen mutasyonları ile BAX gen mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur. BAX, p53 sinyal yolağında ekspresyonu en çok azalan ve oksaliptatin direncinde rol oynayan genlerden biri olarak bilinmektedir. KRK terapisinde kombinasyon rejimlerinin önemli bir komponenti olan oksaliptatine karşı gelişen direnç kemoterapide önemli bir klinik engel oluşturmaktadır. Oksaliptatin ve diğer platinlere karşı direnç gelişimini önleyebilmek, ilaç kombinasyonları geliştirebilmek açısından BAX gibi proapoptotik genlerin araştırılması gerekmektedir (155). Kişiselleştirilmiş kanser terapilerinin her geçen gün daha önemli hale geldiği günümüzde KRK'lara BAX geni mutasyonlarının analiz edilmesinin klinik yönetim ve tedavi planı üzerinde önemi olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda saptadığımız BAX ve BRCA1, CDC27 gen mutasyonlarının birlikteliği KRK gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların detaylı şekilde anlaşılabilmesi açısından önemli olabileceği de düşünülmektedir. Sonuç olarak klinik uygulamadaki yeri sınırlı ve tartışmaya açık olan, çalışmamızda saptadığımız BRCA1 ve CDC27 gibi birliktelik gösterdiği diğer genlerle ilişkisi henüz net olmayan BAX geninin kolorektal karsinogenez, klinik yönetim ve tedavi yönetimi üzerine olan etkisinin daha geniş örneklem grupları ve daha ileri çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

BRAF mutasyonları tüm KRK'ların %8-12'sinde bulunmaktadır (49). Tüm BRAF mutasyonlarının %90-96 kadarını ise BRAF V600E mutasyonları oluşturmaktadır (47-49).

BRAF mutasyon durumu temel alınarak KRK'larda, BRAF V600E mutasyonu ve V600E-dışı bir BRAF mutasyonu bulunan farklı klinikopatolojik özelliklere sahip iki moleküler alt tip tanımlanmaktadır (47). Hem genel olarak BRAF hem de BRAF V600E mutasyonları ileri yaş ve kadın hastalarda; sağ kolon yerleşimli, az diferansiye ve müsinöz morfolojiye sahip KRK'larda daha sık bulunmaktadır (48, 49, 156, 157). Çalışmamızda saptadığımız %17,8 oranındaki BRAF, %13,7 oranındaki BRAF V600E mutasyonları son yıllardaki metaanaliz çalışmalarına göre yüksek orandadır. Bazı çalışmalar BRAF mutasyonu bulunan KRK'ların beyaz ırkta Asyalı veya Afrika-Amerikalı bireylerden daha sık görüldüğünü bildirmektedir (48). Hasta popülasyonunun çoğunu beyaz ırktan bireylerin oluşturduğu Shaikat ve ark. (158) çalışmasında da bizim çalışmamızda benzer şekilde %21,8 gibi yüksek bir oranda BRAF mutasyonu saptandığı bildirilmektedir (158). Çalışmamızda daha yüksek oranda saptanmış olan BRAF ve BRAF V600E mutasyon oranının etnisite faktörü ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, Avrupa ve Asya arasında yer alan toplumumuza ait veri havuzunun oluşturulabilmesi adına çok önemlidir. Çalışmamızda BRAF mutasyonu ile az diferansiye tümörler arasında saptadığımız ilişki metaanaliz verileri ile güçlü şekilde desteklenmektedir (156, 157, 159, 160). Prognostik bir belirteç olan tümör diferansiyasyonu ile BRAF mutasyonu arasındaki bu ilişki daha yerinde prognoz tayini yapabilmek, bireye uygun adjuvan tedavilerin seçimini kolaylaştırmak amacıyla tümörlerde BRAF mutasyon analizi yapmanın önemli olduğunu göstermektedir (159). BRAF V600E mutasyonu ile sağ kolon yerleşimli tümörler arasındaki anlamlı ilişki çalışmamızda saptadığımız ve literatür verileriyle güçlü şekilde desteklenen bir diğer bulgudur. Bu bulgu sağ ve sol kolon tümörlerinde meydana gelen moleküler değişikliklerin farklı klinik yansımaları olduğunu göstermektedir (159). KRK'larda BRAF mutasyonu ile KRAS mutasyonları birbirini dışlayan mutasyonlar olarak bilinmektedir. KRAS mutasyonu anti-EGFR tedavisi için negatif bir prediktif belirteçtir ve KRAS mutasyonu bulunan hastaların yaklaşık %95'i anti-EGFR tedavisinden yarar görmemektedir. Araştırmalar BRAF mutasyonunun anti-EGFR tedavisi için potansiyel bir negatif prediktif değeri olduğunu düşündürmektedir (48). Öte yandan MSS olmayan tümörlerde KRAS mutasyonu ve dahası BRAF mutasyonu ile prognoz giderek kötüleştiği bildirilmektedir (48). Çalışmamızda BRAF gen mutasyonları ile KRAS gen mutasyonları arasında anlamlı negatif bir ilişki bulunmuş olup bu sonuç literatür bilgisi ile de kuvvetle desteklenmektedir (157, 159, 160). Non-BRAF V600E mutasyonu bulunan hastalarda BRAF V600E mutasyonu bulunanlara göre daha iyi bir klinik seyir ve daha uzun sağkalım görülmektedir. Bu hastalar agresif kemoterapötiklere daha az ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle NGS yönteminin, yalnızca BRAF V600E mutasyonuna

yönelik PCR testleri ile saptanması mümkün olmayan BRAF mutasyonlarının tanımlanabilmesi için önemli olduğu açıkça görülmektedir (161).

Sporadik KRK'ların yaklaşık %50'sinde BRCA1 lokusunda allelik kayıplar bulunmakta ve benzer şekilde BRCA2'nin de allelik değişiklikler yoluyla KRK gelişiminde yeri olduğu düşünülmektedir (54, 138). Oh ve ark. (53) metaanaliz sonuçları BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında artmış KRK gelişim riski olduğunu gösterirken Cullinane ve ark. (54) metaanaliz sonuçları ise BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında artmış KRK gelişim riski olmadığını göstermektedir (53, 54). Phelan ve ark. (162) prospektif nitelikteki çalışması BRCA1 veya BRCA2 mutasyonuna sahip genç kadınlarda artmış KRK gelişim riskine dair kanıtlar sunmaktadır (162). Literatürdeki yöntemsel farklılıklar ve sınırlamalar çelişkili sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır (53, 54). Çalışmamızda %6,8 oranında BRCA1, %16,4 oranında BRCA2 mutasyonu bulunmuştur. BRCA1 mutasyonu bulunan 5 olgunun 4'ünde BRCA2 mutasyonu da saptanmıştır. Grabsch ve ark. (163) çalışmasında da bizim çalışmamızı destekler nitelikte KRK'larda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin anlamlı birlikteliği saptanmış bulunmaktadır (163). BRCA1, BRCA2 mutasyonu veya kaybı gösteren tümörlere sahip hastaların PARP inhibitörlerinden fayda görebileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla tümörlerde yaygın rastlanmayan genetik değişikliklerin tespiti ile yeni bireysel tedavi seçenekleri geliştirilebilecektir (138).

Çalışmamızda BRCA1 gen mutasyonları ile MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, TGFBR2, CDC27 gen mutasyonları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bilindiği kadarıyla, KRK'larda BRCA1 gen mutasyonları ile bu genler arasındaki ilişkiyi açıklayan ve destekleyen literatür verisi bulunmamaktadır. BRCA1 gibi karsinogenezde rol oynayan bir genin MMR genleri ile ilişkili bulunması yanısıra TGFBR2 gibi çoklu fonksiyona sahip ve tümör gelişiminde iyi bilinen bir gen ile birlikteliği karsinogenezin çoklu ve karmaşık basamaklarını göstermesi açısından önemlidir. CDC27'nin tümör progresyonunda yer aldığı bilindiğinden hücre proliferasyonunda önemli yeri olan BRCA1 ile ilişkili olması doğaldır. BRCA1 ile bu genler arasındaki ilişkinin KRK karsinogenezinde birlikte rol alan birçok farklı mutasyonun ortaya konması açısından önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca iyi prognostik gösterge olabileceği ileri sürülen MMR gen mutasyonları ve çalışmamızda lenf nodu metastazı ile negatif ilişkisini saptadığımız BRCA1 mutasyon varlığı ile de bu ilişki anlam kazanmaktadır.

Çalışmamızda kötü prognostik bir gösterge olan lenf nodu metastazları ile BRCA1 mutasyonları arasında saptadığımız negatif ilişkiye karşın Xie ve ark. lenf nodu metastazı bulunan KRK'larda BRCA1 geninde daha yüksek oranda mutasyon olduğunu bildirmiştir (164). Grabsch ve ark. çalışmasından elde edilen sonuca göre ise BRCA1 ile lenf nodu metastazı arasında bir ilişki bulmamışlardır (163). Lenf nodu metastazı ile ilişkisi üzerine fikir birliğine varılamamış ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi henüz yeterince incelenmemiş olan BRCA1 ile ilgili çalışmamız sonuçlarının literatüre önemli bir katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Tıpkı BRCA1'de olduğu gibi çalışmamız ile bulunan BRCA2 CDC27 arasındaki anlamlı ilişkiyi destekleyecek literatür verisi bulunmamaktadır. Ortak moleküller aracılığı ile in vitro çalışmalarla ilişkilendirilen BRCA2 ve CDC27'nin karsinogeneze hangi aşamada ve nasıl dahil olduklarını, bu gen mutasyonlarının birlikteliğinin klinik ve patolojik özellikler üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

Yine BRCA1'de olduğu gibi BRCA2 mutasyonları ile anlamlı bulduğumuz MMR genlerinden MLH3 arasındaki ilişkiyi ortaya koyan literatür verileri yeterli değildir. Bilindiği gibi BRCA2 DNA hasarına yanıtın homolog rekombinasyon yolağında, MLH3 ise DNA hasarına yanıtın MMR yolağında görev almaktadır (53, 99). MLH3 gibi MMR genleri yanısıra BRCA2 gibi DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alan diğer genlerin de MSI-H ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (165). Çok sayıda çalışma MSI-H KRK'ların MSS KRK'lardan daha iyi prognozlu olduğunu, MSI-H KRK'ların daha yüksek oranda immun hücrelerle infiltre olduğunu, dolayısıyla bu tümörlerin kemoterapi ve immunoterapiye daha iyi yanıt verdiğini göstermektedir (99). Çalışmamızda potansiyel biyomarker ve terapötik hedef olabilecek BRCA2 ve MLH3 gen mutasyonları arasında anlamlı pozitif bir ilişkinin saptanmış olması bu nedenle oldukça önemlidir. Bu iki gendeki mutasyonların birlikteliğini, bu birlikteliğin klinikopatolojik önemini destekleyen literatür verisi bulunmamakla birlikte Narayanan ve ark. (165) çalışmalarında KRK'larda MMR genlerinin yanısıra BRCA2 gibi MMR geni olmayan DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görevli genlerin de ekspresyonunun düşük olduğunu belirtmektedir (165). KRK'ları gelişim ve progresyonuna dahil olan DNA tamir genlerini ve birbirleriyle ilişkilerini geniş ölçekli değerlendirmek gerekmektedir. Özellikle MSI ile ilişkili gen mutasyonları bulunan KRK'larda immunoterapi gibi tedavi seçeneklerinin sözkonusu olduğu günümüzde kanserlerin

mutasyon durumu giderek daha önemli hale gelmektedir (166).

İnsan kanserlerinin büyük bir yüzdesinde PTEN somatik mutasyonları bulunmaktadır (111, 112). Nükleer PTEN, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde önemli bir protein olan Rad51'in upregülasyonuna neden olarak DNA tamirine yardımcı olmaktadır (167). BRCA2, BRCA2/Rad51 kompleksi oluşturarak homolog rekombinasyon yoluyla DNA çift zincir kırıklarının hatasız bir şekilde tamirini sağlamaktadır (168). Çalışmamızda homolog rekombinasyon yoluyla DNA çift zincir kırıklarının onarımında görevli BRCA2 ve PTEN gen mutasyonları arasında saptadığımız anlamlı ilişki bu mekanizmalar göz önünde bulundurulduğunda oldukça önemlidir. Çünkü PTEN kaybı homolog rekombinasyon kusurlarına neden olmakta ve bu da tümör hücrelerini PARP inhibitörlerine karşı duyarlı hale getirmektedir (167). Benzer şekilde BRCA1/2 mutasyonu veya kaybı bulunan KRK'ların PARP inhibitörleri ile tedaviye daha sensitif olduğu bilinmektedir (138). Çalışmamızın sonucu ve mevcut literatür bilgisi göz önünde bulundurulduğunda bu mutasyonların karsinogeneze hangi aşamada ve nasıl dahil olduklarını anlamak, aralarında anlamlı ilişki saptadığımız BRCA2-PTEN mutasyonlarını klinik bir çerçeveye yerleştirmek esas zorluğu oluşturmaktadır.

Çalışmamız sonuçları BRCA2 mutasyonları ile lenf nodu metastazları arasında BRCA1'de olduğu gibi negatif ilişki olduğunu göstermiştir. Bu konuda literatürde yer alan çok az sayıda yayında ise bulgularımızı destekleyecek veriler yoktur. Ancak BRCA1 ile birlikte BRCA2 ile de bu ilişkinin gösterilmiş olması en azından bölgesel bazda bu ilişkinin varolabileceğini göstermektedir.

FBXW7, önemli bir tümör supresör gen olarak bilinmektedir. Çalışmalar FBXW7 mutasyon veya delesyonlarının KRK'lar dahil birçok kanserde rol oynadığını, bu nedenle anormal FBXW7'nin tümör gelişiminde temel faktörlerden biri olduğunu göstermektedir (78). Çalışmamızda her ikisi de hücre siklus regülasyonunda rol alan CDC27 ve FBXW7 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. CDC27 ve FBXW7 genleri, bu genlerin ürünleri, gen ürünlerinin fonksiyonları gelişen yeni teknolojiler ile henüz çok yeni araştırma konularını oluşturmaktadır. Shang ve ark. (169) 2021 yılında yayınlanmış olan metaanalizinde FBXW7 mutasyonunun ileri T evresi ve lenf nodu metastazı ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu; Kazemi-Sefat ve ark. (154) yine 2021 yılına ait çalışmasında CDC27'nin tümör boyutu, ileri TNM evresi ve uzak metastaz ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Tümör gelişimi, tedavi yanıtı, prognoz ve sağkalım üzerinde

etkileri olduğu düşünülmesine karşın CDC27 ve FBXW7'nin kanser patogenezindeki rolü ve klinik önemi üzerine yeni ve nispeten az sayıda çalışma bulunmaktadır (154, 169). Bu nedenle bu iki genin ve birbirleriyle ilişkilerinin KRK'da rol oynadığı çalışmamızla da gösterilmiş olmakla birlikte bu kanserlerdeki rolü konusunda ayrıntılı değerlendirme için veriler yeterli değildir.

CDC27'ye benzer şekilde, ubiquitin ligaz SCF kompleksinin ana bileşenlerinden biri olan FBXW7 ile PIK3CA mutasyonları arasında anlamlı ilişki olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Korphaisarn ve ark. (170) yakın zamanda metastatik KRK'larda FBXW7 mutasyonlarını araştırdıkları çalışması FBXW7 ile PIK3CA mutasyonlarının anlamlı şekilde birlikte bulunduklarını göstermektedir (170). Çalışmamızda saptadığımız CDC27-PIK3CA ve CDC27-MSH3, MLH3, PMS2 mutasyonlarının anlamlı birlikteliğini destekleyen literatür verisi henüz bulunmamakla beraber daha geniş örneklem grupları ile yapılacak çalışmaların bu ilişkilerin aydınlatılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Son çalışmalar PTEN'in PI3K/AKT yolağından bağımsız olarak farklı işlevlere sahip olduğunu göstermektedir. Moleküler olarak ne şekilde regüle olduğu henüz net olarak anlaşılmamış olsa da çalışmalar, fosfataz aktivitesinden bağımsız olarak nükleer PTEN'in de önemli bir tümör supresör olduğunu göstermektedir (171). CDC27'nin mitoz sırasında yüksek oranda fosforilasyona uğradığı göz önünde bulundurulduğunda PTEN'in CDC27 için potansiyel bir fosfataz olabileceği tahmin edilmektedir (172). Çalışmamızda KRK'larda CDC27 ile PTEN mutasyonları arasında saptadığımız anlamlı birliktelik literatür ile desteklenmemekle birlikte mutant PTEN bulunan tümörlerin APC/C-CDH1 kompleksini hedefleyen terapilere daha az duyarlı olduğu ileri sürüldüğünden klinik olarak önemli olabileceğini göstermektedir (172).

TGF-Beta sinyal yolağı insan kanserlerinde en yaygın değişime uğrayan sinyal yollarından biri olarak bilinmektedir. Bu yolakta sinyalizasyon TGF-Beta'nın tip 2 reseptörlere bağlanmasıyla başlamaktadır (119, 124). CDC27 ve CDH1, TGF-Beta sinyalizasyonuna yanıt olarak APC/C aktivitesinin artırılması için gerekli komponentlerdir. CDC27 fosforilasyonu APC/C aktivasyonunda önemli bir mekanizmayı oluşturmaktadır. TGF-Beta tarafından indüklenen CDC27 fosforilasyonu, TGF-Beta sinyalizasyonunun APC/C'nin aktivasyonuna hangi mekanizma ile neden olduğuna açıklık kazandırmaktadır. Sonuç olarak APC/C aktivitesini arttıran mekanizmanın TGF-Beta'nın neden olduğu CDC27'nin fosforilasyonu aracılığıyla CDC27 ve CDH1 arasındaki etkileşim olduğu ileri

sürülmektedir (173). Çalışmamızda TGFBR2 ile CDC27 mutasyonları arasında bulunan anlamlı bir ilişkinin hücre siklus regülasyonunun en önemli ubiquitin ligazlarından biri olan APC/C'nin aktivasyonunda birlikte hareket eden bu iki molekülün karsinogenezdeki yeri, klinik önemi henüz belirsiz olmakla birlikte artan çalışmalar ile ortaya konulabilmektedir.

Özellikle EGFR (ERBB1, HER1) ve ERBB2 olmak üzere EGFR'lerde gelişen anormal tirozin kinaz aktivitesi KRK dahil olmak üzere birçok tümörün gelişimine ve progresyonuna neden olmaktadır. EGFR'ler kanserlerde kötü prognoz, ilaç direnci, metastaz gelişimi ve kötü sağkalım oranları ile ilişkilendirilmektedir (69). Anti-EGFR tedavisinin metastatik KRK'larda klinik sonuçları iyileştirdiği gösterilmiş olsa da KRAS, NRAS, PIK3CA mutasyonları veya PTEN kaybı gibi mekanizmalar nedeniyle anti-EGFR tedavilerine direnç gelişmektedir (76). HER2 mutant kanserler immunohistokimya ya da floresan in situ hibridizasyon teknikleri ile yapılan HER2 pozitifliği araştırmaları ile gözden kaçabilecek önemli bir gruba oluşturmaktadır (77). EGFR hedefli tedaviler için hasta seçiminde amplifikasyon durumu kadar EGFR mutasyon durumunun da bilinmesi giderek daha fazla önem taşımaktadır (69). Tirozin kinaz inhibitörlerinden bazıları spesifik olarak EGFR (ERBB1, HER1) tirozin kinaz bölgesini hedefliyor olsa da dual EGFR/ERBB2 inhibitörleri de gelişim aşamasında bulunmaktadır. HER dimerizasyon inhibitörleri, EGFR sinyal yolağı boyunca işlev görmek üzere geliştirilen yeni bir terapötik ajan grubunu oluşturmaktadır. EGFR (ERBB1, HER1) – HER2 heterodimerinin, EGFR homodimerlerine kıyasla daha büyük ve daha uzun süreli proliferasyon sinyalleri ürettiği ileri sürülmektedir (69, 74). Çalışmamızda EGFR (ERBB1, HER1) ve ERBB2 somatik mutasyonları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. HER2 gen mutasyonları klinik pratikte HER2 gen amplifikasyonları kadar sık çalışılmadığından prevalans, prognoz ve tedavi yanıtına ilişkin sınırlı veri bulunmaktadır (77). Farklı kanser türleri arasında belirgin heterojenite gösteren somatik EGFR (ERBB1, HER1) ve ERBB2 mutasyonlarının KRK'larda görülme oranı ve ilişkisi açısından çalışmamız sonuçlarının prognostik ve tedavi kararı üzerine önemli olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda FBXW7 ile MSH6 ve PMS2 mutasyonlarının birlikteliği arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur. Miyaki ve ark. (174) MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 gibi MMR genlerinde heterozigot germline mutasyonların neden olduğu bir hastalık olan HNPCC gibi herediter KRK'larda %9 oranında somatik FBXW7 mutasyonlarına rastlandığını bildirmektedir (174). Dolayısıyla MSH6 ve PMS2 gibi MSI

gen mutasyonları ile FBXW7 gen mutasyonlarının birlikte görülmesinin şaşırtıcı olmadığı düşünülmektedir. Bunun yanında KRK'larda FBXW7 mutasyonlarının rolünü değerlendiren en geniş çalışmalardan biri olan Chang ve ark. çalışmalarında FBXW7 mutasyonu bulunan KRK'ların daha yüksek oranda MSI bulundurduğunu bildirmektedir (175). Chang ve ark. ortaya koyduğu MSI ve FBXW7 mutasyonları arasındaki ilişkiden yola çıkarak tek tek MSI genlerindeki mutasyonlar ile FBXW7 mutasyonlarının birlikteliğinin anlamlı olabileceğini ortaya koyuyor olması bakımından çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Mitotik kontrol noktasının düzenlenmesi, sentrozom duplikasyonu, kromozom segregasyonu ve sitokinezisin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan Aurora-A kinaz (AURKA) KRK'lar dahil olmak üzere birçok insan kanserinde amplifiye durumda bulunmaktadır. FBXW7, AURKA'ya bağlanarak glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3B) bağımlı olarak AURKA'nın ubiquitinasyonu ve degradasyonuna neden olmakta, bu nedenle FBXW7 düzeyi azalırken AURKA seviyesinin arttığı bilinmektedir (139, 176). PTEN kaybı, AURKA'nın FBXW7 aracılığıyla olan degradasyonunu azaltarak AURKA yarı ömrünü artırmakta, bu durum da genetik instabiliteye neden olmaktadır (139). Kwon ve ark. oluşturdukları fare modeline göre radyasyona bağlı tümör gelişiminde AURKA degradasyonunu sağlamak ve tümör gelişimini baskılamak için FBXW7 ile PTEN'in birlikte hareket ettiğini göstermektedir (176). Çalışmamızda saptadığımız FBXW7 ve PTEN mutasyonlarının anlamlı birlikteliği, AURKA seviyelerini kontrol eden FBXW7 ve PTEN tümör supresör yolları arasında yeni bir etkileşim belirleyen Kwon ve ark. çalışmasında olduğu gibi FBXW7 ile PTEN arasında etkileşimin KRK'larda da bulunduğu gösterilmiştir.

FBXW7, TGIF1'i inaktive ederek TGF-Beta bağımlı transkripsiyonu artırmaktadır. FBXW7 mutasyonu bulunan kanser hücrelerinde TGIF1 düzeyi artmakta ve bu hücrelerde TGF-Beta sinyalizasyonu bozulmaktadır. FBXW7'nin TGF-Beta sinyalizasyonunun önemli bir düzenleyicisi olabileceği düşünülmektedir (177). Çalışmamızda FBXW7 ve TGFBR2 mutasyonlarının anlamlı birlikteliği saptanmıştır. Bengoechea-Alonso ve ark. (177) lösemi ve meme kanser hücrelerinde, Ling ve ark. (178) ise KRK'larda FBXW7 mutasyonları ile TGF-Beta sinyal yolağını ilişkilendirmektedir (177, 178). Çalışmamız sonuçları da KRK'larda bu iki gen mutasyonunun anlamlı birlikteliğinin de göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) evreleme kılavuzunda da KRK'lar için PNI, prognostik bir parametre ve rekürrens için bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (179). FBXW7 durumunun KRK'larda prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (169). PNI ile FBXW7 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptanmıştır. Literatürde FBXW7 mutasyonları ile ileri T evresi ve lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu, FBXW7 mutasyonu bulunan KRK'larda venöz invazyona daha sık rastlandığı bildirilmektedir (169). Su ve ark. (180) bizim çalışmamıza benzer şekilde FBXW7 ekspresyon düzeyi ile PNI'nin negatif ilişkili olduğunu belirtmektedir (180). Çalışmamızın sonuçları kötü prognostik bir gösterge olarak kabul edilen PNI durumunda FBXW7 mutasyonlarının daha az görüldüğünü ve bu mutasyonun iyi prognostik bir gösterge olabileceğini desteklemektedir.

KRAS mutasyonu KRK'larda da %35-40 gibi yüksek bir oranda bulunmaktadır. KRAS mutasyonu varlığı, kötü prognostik bir faktör ve EGFR hedefli tedavilere yanıtızlığın bir göstergesi olması nedeniyle KRK'larda KRAS mutasyon durumunun belirlenmesi prognozu öngörmede ve tedavi yönetiminde oldukça önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (86, 90). Çalışmamızda KRAS mutasyon insidansı %45,2 olup literatür ortalamasından yüksek saptandı. KRAS mutasyonlarının yaklaşık %90'ı ekzon 2 kodon 12 ve ekzon 2 kodon 13'te meydana gelmekte ve kabaca bu mutasyonların üçte ikisini kodon 12'deki, üçte birini kodon 13'teki mutasyonlar oluşturmaktadır (90, 91). Bizim çalışmamızda da literatürde belirtildiği gibi KRAS mutasyonları içerisinde en sık ekzon 2 (%78,8) mutasyonlarına rastlandı ve bu ekzon 2 mutasyonlarının %76,9'unu kodon 12, %23,1'ini kodon 13 mutasyonları oluşturmaktaydı. Tümörlerde farklı agresiflik düzeyi, farklı metastaz bölgeleri, kemoterapi ve radyoterapiye yanıt farklılıkları gibi farklı klinik davranışların nedeni olarak, KRAS'ta amino asit değişimine göre farklı aşağı akış sinyal yollarının aktive olması gösterilmektedir (89). Bu doğrultuda yapılan analizler KRAS ekzon 2 ve kodon 12 mutasyonlarının bazı klinikopatolojik ve moleküler özellikler ile ilişkili olduğunu göstermektedir (181). Li ve ark. (91) KRAS kodon 12 ve kodon 13 mutasyonu bulunan KRK'larda müsinöz morfolojiye daha sık rastlandığını belirtmektedir (91). Li ve ark. (182) müsinöz diferansiyasyon gösteren tümörlerde en sık KRAS kodon 12 ve kodon 13 mutasyonları bulunduğunu bildirmişlerdir (182). Bizim çalışmamızda 7 adet müsinöz adenokarsinomun tamamında ekzon 2 mutasyonu saptanmış ve bu mutasyonların 6'sı ekzon 2-kodon 12, 1'i ekzon 2-kodon 13 mutasyonu şeklinde bulunmuştur. Çalışmamızda müsinöz adenokarsinomlarla KRAS ekzon 2 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

ilişki saptanmıştır. Artan klinik önemine karşın KRAS ekzon-kodon 61 mutasyonu bulunan KRK'ların klinikopatolojik ve moleküler özellikleri, bu mutasyonların prognostik ve prediktif değeri henüz yeterince bilinmemektedir. Bu mutasyon oranı çeşitli çalışmalarda %1,3-1,7 olarak bildirilmiştir (183-186). Çalışmamızda yaklaşık %5,5 oranla KRAS ekzon 3 mutasyonu bulunduğu, mutasyonların %4,1'ini ekzon 3-kodon 61 mutasyonlarının oluşturduğu saptanmıştır. Çalışmamızda bulduğumuz ekzon 3 ve kodon 61 mutasyon oranları yukarıda belirtilen çalışmalardan daha yüksekti. Çalışmamızda KRAS ekzon 3 mutasyonları ile iyi diferansiye tümörler arasında bulunan pozitif ilişkinin klinikopatolojik parametrelerle söz konusu mutasyonların ilişkisini detaylandırması bakımından değerli olduğu, henüz çelişkili sonuçlar bulunan bu konuda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tümör supresör genlerin inaktivasyonu ile ortaya çıkan KRK paterninden farklı olarak MMR genlerindeki değişiklikler, intratümöral heterojenite ile karakterize benzersiz bir KRK modeline neden olmaktadır (187). MSI-H KRK'larda, Lipkin ve ark. (143) çalışmasında %25 oranında, Loukola ve ark. (142) çalışmasında %8,6 oranında somatik MLH3 mutasyonları bulunduğunu görülmektedir (142, 143). Çalışmamızda %17,8 oranında MLH3 mutasyonu saptanmıştır. Çalışmalar sonucunda PTEN geninde rastlanan değişikliklerin MSI ve MSI'ye neden olan mekanizmalarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (111). Bu görüş ile paralel olarak Day ve ark. (188) yaptıkları çalışma sonucunda KRK'larda PTEN mutasyonlarının MSI ile ilişkisi olduğu görülmektedir (188). Shin ve ark. (189) çalışması ise PTEN mutasyonları ile MSI arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ve PTEN geninin KRK'larda genomik instabilitenin bir hedefi olduğunu göstermektedir (189). Çalışmamızda PTEN mutasyonları ile MLH3 arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. KRK'larda PTEN mutasyonları ile MSI ve MSI'ye neden olan mekanizmalar arasındaki ilişki gösterilmiş olsa da bilindiği kadarıyla PTEN mutasyonları ve MSI genleri arasındaki ilişkiyi inceleyen ve bizim çalışmamızı destekleyen literatür verisi bulunmamaktadır. TGFBR2 gibi tümör supresör genlerin mikrosatellitlerinde mutasyonlara MSI KRK'larda sıklıkla rastlanmakta ve MSI KRK'ların %80'den fazlasında TGFBR2 mutasyonları bulunmaktadır (124). MMR genleri genomda meydana gelen hataları düzeltirken tümör supresör genler tümör gelişimine neden olan hücrelerin büyümesini engellemektedir. Bu genlerin mikrosatellit lokuslarındaki instabilite, yolağa dahil olan diğer genlerin ekspresyonunu değiştirerek genomun düzeltme ve baskılama mekanizmalarının normal fonksiyonunu etkilemekte ve kanser gelişimine neden olmaktadır (190). Çalışmamızda

MLH3 ile TGFBR2 mutasyonlarının birlikteliğinin anlamlı olduğunu saptanmıştır. KRK'larda bu iki genin birlikteliğinin klinikopatolojik ve moleküler önemini destekleyen bir veri bilindiği kadarıyla bulunmamaktadır. Ancak yakın zamanda Verma ve ark. (190) gastrik kanserlerde MMR genlerini ve tümör supresör genlerini dahil ederek yaptıkları çalışmalarının sonucunda gastik tümörögenizde MSI biyomarkeri olarak kullanılabilecek en iyi kombinasyonun MLH3 ve TGFBR2 genlerinden oluştuğunu belirtmektedir (190). MSH3'e bağlı onarımın bir bölümünün MLH1-MLH3 kompleksini gerektirdiği düşünülmektedir. Bunun yanında MLH3 ve MSH3'ün aynı yolakta işlev görüyor olabileceği ve MLH3'ün bazı yanlış eşleşmelerin tamirine MSH3 yolu ile katılıyor olabileceği öne sürülmektedir (191). Çalışmamızda MLH3 ve MSH3 birlikteliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Akiyama ve ark. (192) HNPCC'li hastalarda MLH3'ü inceledikleri çalışmasında, çalışmamıza benzer şekilde somatik MLH3 mutasyonu bulunan üç hastada aynı zamanda somatik MSH3 mutasyonu da bulunduğu belirtilmektedir. Aynı çalışmada "bir mutator genin başka bir mutator geni mutasyona uğrattığı" fikrinden yola çıkarak MLH3 mutasyonunun diğer MMR gen mutasyonlarına sekonder olarak gelişebileceği öne sürülmektedir (192). Bu görüş çalışmamız sonuçları ile de desteklenmiştir. MSH3 geni, dMMR bulunan KRK'larda %43-52 oranında somatik mutasyona uğramaktadır (193). Shin ve ark. (189) yaptıkları mutasyon analizi sonucunda MSI KRK'larda %46,9 oranında MSH3, %18,8 oranında PTEN mutasyonları bulmuştur (189). Çalışmamızda da MSH3 ile PTEN mutasyonları arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. MSH3 defektlerinin neoplazi gelişimine katkı sağlayan PTEN'in somatik mutasyonlar aracılığı ile inaktivasyonu için potansiyel bir mekanizma olduğu ileri sürülmektedir (194). Bu görüş bizim çalışmamız sonuçları ile desteklenmiştir. KRK'larda sıklıkla delesyona uğrayan bir bölge olan kromozom 18q'da bulunan SMAD2, sporadik KRK'ların %6'sında değişikliğe uğramaktadır (123). KRK'larda tanımlanan SMAD2 mutasyonları, SMAD proteinlerinin kolorektal epitelde tümör supresör olarak görev aldığı görüşünü desteklemekte ve SMAD2 geninde görülen mutasyonlar TGF-Beta sinyal yolağındaki mutasyon yüküne önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (126, 195). Çalışmamızda TGF-Beta sinyal yolağı komponenti SMAD2 geninde %2,7 oranında mutasyon saptanmıştır. Literatürde bildirilenden düşük olmakla birlikte SMAD genlerinin tümör supresör olarak görev yaptığı görüşü sonuçlarımızla desteklenmiştir. MSI KRK'ların %70-90'ında TGFBR2'de frameshift mutasyonu bulunmaktadır ve bu mutasyon tümörün TGF-Beta-SMAD sinyalizasyonunun büyümeyi baskılayıcı etkilerinden kaçmasını sağlamaktadır (123). Chung ve ark. (196) TGFBR2 mikrosatellitlerinde MSH3 fonksiyon kaybı zemininde

frameshift mutasyonu oluşmadığını bildirmişlerdir (196). Bu sonuç, çalışmamızın sonucunda bulduğumuz MSH3 ve TGFBR2 gen mutasyonlarının anlamlı birlikteliğini desteklememektedir. Ancak Verma ve ark. (190) gastrik kanserlerde yaptıkları çalışma sonucunda TGFBR2, MSH3 ve MLH3 üçlü gen kombinasyonunun da içerisinde bulunduğu gen kombinasyonlarının gastrik kanserlerdeki MSI'nin yaklaşık %80'inden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (190). Çalışmamızda saptadığımız MSH3 ve TGFBR2 gen mutasyonlarının birlikteliği çalışmamız sonuçları ile desteklenen ve KRK'ların klinik davranışlarındaki farklılığın anlaşılmasında yardımcı olabilecek bir sonuç olarak düşünülmektedir. KRK'lardaki prognostik değeri konusunda fikir birliğine varılamayan parametrelerden biri de tümör çapı olarak bilinmektedir (197, 198). Ancak Saha ve ark. (198) çalışmasında olduğu gibi Dai ve ark. (197) çalışmasında da KRK'larda tümör çapının genel hasta sağkalımı üzerinde etkisi olduğu bildirilmektedir (197, 198). Sukamal Saha ve ark. (199) retrospektif çalışmasında artan tümör çapı ile daha yüksek oranda lenf nodu metastazı, daha ileri T evresi gibi klinik parametreler ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (199). Guo ve ark. (200) gerçekleştirdikleri retrospektif analiz sonucunda daha yüksek oranda kusurlu MMR mekanizması bulunan KRK'larda daha büyük tümör çapına rastlandığı belirtilmektedir (200). KRK'larda klinikopatolojik parametreleri inceledikleri çalışmalarında Liang ve ark. (201) dMMR tümörlerde en büyük tümör çapının pMMR tümörlerden daha yüksek olduğunu ve dMMR tümörler arasında daha fazla sayıda beş santimetreden büyük tümör bulunduğunu bildirmektedir (201). MSH3 genindeki mutasyonların KRK'larda tümör progresyonunda rol oynadığı düşünüldüğünden klinik parametreler ile MSH3 arasındaki ilişkiyi inceleyen Plaschke ve ark. (202) MSH3 ekspresyon kaybının KRK'larda lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (202). Laghi ve ark. (203) çalışmasından ise MSH3 ekspresyon kaybı bulunan KRK'larda lenf nodu tutulumunun daha az olduğu sonucu bildirilmiştir (203). Çalışmamızda KRK'lardaki prognostik değeri konusunda henüz fikir birliğine varılamamış MSH3 mutasyonu ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Literatürde MSH3 geninin klinikopatolojik özelliklerini inceleyen az sayıda çalışma bulunduğundan bu bulguyu destekleyecek veri bulunmamaktadır. Buna karşın çalışmamızda elde ettiğimiz sonucun kötü prognozla ilişkilendirilen MSH3 mutasyonları konusunda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. PTEN geninde rastlanan değişikliklerin MSI ve MSI'ye neden olan mekanizmalarla doğrudan ilişkili olduğu, aynı zamanda PTEN geninin KRK'larda genomik instabilitenin bir hedefi olduğu çalışmalar ile desteklenmiştir (111, 189). Shin ve ark. (189) MSI KRK'larda yaptıkları çalışmada %18,8 oranında PTEN, %37,5 oranında

MSH6 frameshift mutasyonları bulunduğu belirtilmektedir (189). Mutasyon oranları bizim çalışmamızda saptadığımız %4,1 MSH6 ve %32,9 PTEN mutasyon oranlarından yüksek bulunmaktadır. Bohn ve ark. (204) çalışmasında ise PTEN delesyonu bulunan olguların %18'inde aynı zamanda MSH6 ekspresyon kaybı bulunduğunu belirtmektedir (204). Bizim çalışmamızda ise MSH6 mutasyonu bulunan tüm olgularda aynı zamanda PTEN mutasyonu bulunmaktadır. KRK'larda MMR genleri ve MMR mekanizmaları ile ilişkisi konusunda çelişkili görüşler bulunan PTEN geni ile bir MMR geni olan PMS2 mutasyonlarının birlikteliği çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Çalışmamızdaki PTEN mutasyonu bulunan olguların %29,2'sinde PMS2 mutasyonu da bulunmuştur. Bohn ve ark. (204) çalışmasında PTEN delesyonu bulunan olguların %4,5'inde PMS2 ekspresyon kaybı da olduğu bildirilmektedir. Bizim saptadığımız oran Bohn ve ark. (204) çalışmasından oldukça yüksektir. Bunun, çalışmamızda PMS2 ve PTEN mutasyonlarının anlamlı birlikteliğine getirilecek alternatif açıklamalardan biri olduğu düşünülmektedir. MLH3, MSH3, MSH6, PMS2 gibi MMR genleri ile PI3K yolağında işlev gören PTEN mutasyonlarının birlikteliğine çelişkili de olsa moleküler açıdan açıklamalar getirilebilirken bu birlikteliklerin klinikopatolojik karşılığı ve anlamı halen ortaya konulamamıştır. Trabucco ve ark. (205) MSI tümörlerde MMR kusurunun başlatıcı bir olay olmasına karşın transformasyona neden olan sonraki olayların belirli yolaklarda gerçekleşebileceğini ve mekanizmalardan bağımsız olarak MMR kusurlarının hem MSI'ye hem de diğer yaygın kanser yolaklarında patojenik varyantlara yol açabileceğini bildirmektedir. PTEN'in de dahil olduğu PI3K gibi yolaklar tüm MSI-H tümörlerde güçlü şekilde zenginleştirilmiş olarak bulunmakta, bu da tümörün orijin aldığı bölgeden bağımsız olarak MSI-H tümörler arasında moleküler ortaklıklar olduğunu göstermektedir (205). Buradan yola çıkarak çalışmamızda saptadığımız MMR genlerinden MLH3, MSH3, MSH6 ve PMS2 genleri ile PTEN gen mutasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı birlikteliğinin Trabucco ve ark. (205) öne sürdüğü artmış tümör mutasyon yükü nedeniyle değişime uğramış yolaklardan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Calin ve ark. (206) genetik tümör progresyon modeline göre MSI-H KRK'larda hedef genleri etkileyen değişiklikler ilk olarak TGFBR2 geninde meydana gelirken ardından bir tümör alt grubunda TGFBR2'deki değişikliği MSH3 ve MSH6 mutasyonları izlemektedir (206). Calin ve ark. (206) KRK'larda öne sürdükleri çok aşamalı tümör progresyon modeli, gastrik kanserlerde yaptıkları çalışma sonucunda Chung ve ark. (207) tarafından da desteklenmektedir (207). Chung ve ark. (196) TGFBR2'de frameshift mutasyonlarına en sık MLH1 geninde, MLH1'in ardından en sık MSH6 genindeki işlev kusurlarının neden olduğunu belirtmektedir (196). Çalışmamızda MSH6 ve

TGFBR2 mutasyonları arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Literatür verileri ışığında MSH6 ve TGFBR2 gen mutasyonlarının birlikte bulunması şaşırtıcı olmamakla birlikte TGFBR2'nin MMR genleri ve mekanizmaları ile ilişkisini desteklemesi açısından değer taşımaktadır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz MMR genlerinden MLH3, MSH3, MSH6 ile TGFBR2 mutasyonlarının anlamlı birlikteliği, MMR mekanizmaları ile TGF-Beta sinyal yolağındaki genetik değişikliklerin tümör başlangıcında ve malign transformasyon sürecinde işbirliği içerisinde olduğu görüşünü desteklemektedir. MSH6 ve PMS2'ye göre daha patojenik olduklarından MLH1 ve MSH2'deki işlev bozuklukları daha agresif tümörlerin gelişimine neden olmaktadır (208). Çalışmamızda MSH6 mutasyonları ile LVİ ve PNI durumu arasında istatistiksel olarak negatif bir ilişki bulunduğu saptanmıştır. Lee ve ark. (208) çalışmasında MSH6 ekspresyon kaybı bulunan KRK'larda perinöral invazyona ve ileri evre tümörlere daha az rastlandığı belirtilmektedir (208). Soliman ve ark. (209) yaptıkları çalışma sonucunda MSH6 ekspresyon kaybı bulunan tümörlerin hiçbirinde LVİ ve PNI'ye rastlanmadığı belirtilirken MSH6 ekspresyon kaybı gösteren tümörlerin tamamının evre pT3 olduğu belirtilmektedir (209). Laghi ve ark. (203) çalışmasında da anlamlı olmamakla birlikte MSH6 ekspresyon kaybı bulunan tümörlerin çoğunda çalışmamıza benzer şekilde LVİ'ye rastlanmazken tümörlerin tamamının evre pT3 ve pT4 olduğu belirtilmektedir (203). Sözü edilen çalışmalar, bizim çalışmamızda saptadığımız MSH6 mutasyonu bulunan tümörlerde PNI ve LVİ'ye daha az rastlandığı sonucunu desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarına göre MSH6 mutasyonunun iyi prognostik göstergeler olan LVİ ve PNI bulunmayan tümörlere eşlik ettiği, daha az agresif davranışlı tümörlerle birliktelik gösterdiği desteklenmiştir. PIK3CA ve PTEN'i hedef alan somatik mutasyonlar PI3K sinyal yolağı aktivitesini artırmakta ve PI3K sinyal yolağının kanserlerdeki önemli rolüne ilişkin kanıt oluşturmaktadır (112). PI3K sinyal yolağı, PTEN düzeyine ek olarak özellikle PIK3CA gibi genlerdeki mutasyonlarla değişime uğradığından PTEN değişikliklerinin ve PIK3CA mutasyonlarının birbirlerini dışlayan olaylar olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (112). Parsons ve ark. (210) PIK3CA ve PTEN mutasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı birbirini dışlayan mutasyonlar şeklinde saptandığını bildirmişlerdir (210). Çalışmamızda da benzer şekilde PIK3CA ve PTEN mutasyonları yalnızca iki olguda birlikte saptanmıştır. Çalışmamızda PTEN ve PIK3CA mutasyonları arasında negatif ilişki bulunmuştur. Saal ve ark. (211) meme kanserlerinde yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamızı destekleyen şekilde PIK3CA mutasyonları ile PTEN değişiklikleri arasında negatif bir ilişki olduğu sonucunu bulmuşlardır (211). Az sayıdaki çalışma nedeniyle bu noktada çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (111). PTEN ve PIK3CA mutasyonlarının birbirlerini dışlayan mutasyonlar

olabileceği görüşünün aksine endometriyal kanserlerde PTEN ve PIK3CA mutasyonlarının aynı tümörde sıkça ve eş zamanlı olarak bulunabileceği bilinmektedir. Bu durum, PIK3CA'daki aktive edici ve PTEN'deki inaktive edici mutasyonların her ikisi de PI3K sinyalizasyonunu artırmakla birlikte farklı fonksiyonları bulunduğuna kanıt oluşturmaktadır. Endometriyal kanserlerde görülen PTEN ve PIK3CA mutasyonlarının birlikteliğinden yola çıkarak, PI3K sinyal yolağının çoklu genlerdeki değişikliklerle aktive olabileceği ve bu iki gendeki mutasyonların tümör gelişimi sırasında farklı sonuçlara neden olabileceği sonucuna varılmaktadır (112). KKR patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamanın yanında terapötik hedef olarak değerlendirildikleri ve mutasyon durumlarının prediktif önemi olduğu için tümörlerde PTEN ve PIK3CA mutasyon durumlarının araştırılması önem taşımaktadır. KKR hücre dizilerinde PIK3CA mutasyonlarının ve PTEN kaybının setuksimaba yanıtı öngörebileceğini gösteren çalışmalar bu iki genin prediktif önemini doğrulamaktadır (106). Çalışmamız sonuçları KKR'lardaki bu durumu ortaya koyması açısından önem taşımaktadır. TGF-Beta'nın PTEN ekspresyonunu azaltarak tümör invazyonuna ve metastazına katkı sağladığı öne sürülmektedir (212). Çalışmamızda TGF-Beta yolağına ait TGFBR2 ile PI3K/AKT sinyal yolağına ait PTEN gen mutasyonlarının anlamlı ilişkisi saptanmıştır. Yu ve ark. (213) oluşturdukları fare modelinde tek başına PTEN kaybının tümör gelişimi üzerine etkisinin zayıf olduğunu ve etkili bir tümör gelişim mekanizması için PI3K sinyal yolağının deregüle olan başka sinyal yolları ile etkileşim içinde bulunması gerektiğini öne sürmektedir. Geliştirilen model sonucunda hem PTEN hem TGFBR2 kaybı bulunan farelerde invaziv karsinom gelişiminde belirgin bir artış olduğu belirtilmektedir. Elde ettikleri bu sonuç TGFBR2 ve PTEN'in KKR gelişiminde etkileşim halinde olduğunu doğrulamakta ve çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir (213). Dicuonzo ve ark. (212) elde ettiği %60 oranındaki PTEN ve TGFBR2 mutasyon birlikteliğine karşın çalışmamızda yaklaşık %11 oranında PTEN ve TGFBR2 mutasyonlarını birlikte saptanmıştır. Dicuonzo ve ark. (212) analizinin MSI KKR'larda yapılmış olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu fark anlaşılmaktadır. Çalışma sonuçları KKR patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamanın yanında terapötik açıdan önem taşımaktadır. Yu ve ark. (213) çalışması, TGFBR2 ve PTEN kaybının tümör hücrelerinde siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin belirgin şekilde azaldığını ve bu tümörlerde proliferasyonun arttığını göstermektedir. Bu bulgular siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerini hedefleyen ajanların, TGFBR2 ve PTEN mutasyonu bulunan KKR'larda kullanım alanı olabileceğini düşündürmektedir (213).

Çalışmamız ile KRK olgularında NGS ile somatik mutasyonları gösterilen genler ile literatür verileri karşılaştırılmıştır. Bölgesel düzeyde KRK olgularında ulusal ve uluslararası önceki verilere göre bazı gen mutasyonlarının oranlarında farklılık olduğu görülmektedir. Bu noktada kanserlerde bulunan somatik mutasyonları saptamak amacıyla kullandığımız NGS tekniğinin çalışmamızdakine benzer sonuçlara neden olabilecek sınırlayıcı özelliklerine değinmek gerekmektedir. NGS'in kanser gibi hastalıkların moleküler süreçlerini anlamada ve klinik yönetimi bireyselleştirmede günümüz için benzersiz bir yeri olmasına karşın tüm tekniklerde olduğu NGS verilerinin yorumlanmasını zorlaştırabilecek etkenler bulunmaktadır (214, 215). Sekanslanan genom alanı arttıkça yorumlanması gereken nadir ve yeni varyantların bulunma olasılığı da artmaktadır. İyi tanımlanmış hotspotların aksine çok sayıda gen analiz edildiğinde varyantların yorumlanması daha karmaşık ve zor olmaktadır (216). Bir varyant saptandığında bunun gerçek bir patojenik olayı temsil edip etmediğini bilmek önemlidir. Bu açıdan bir tümörde saptanan varyantın aynı hastadan edinilmiş normal doku ile karşılaştırılması gerektiği öne sürülmektedir (214). Yeni tanımlanmış varyantların patojenitesinin anlaşılmasına ilişkin kılavuzlar yayınlanmaktadır (216). Çünkü mutasyonları daha yakından incelemek yerine olduğu gibi kabul etmek aşırı miktarda patojenik mutasyona ve buna bağlı uygun olmayan klinik yönetime neden olmaktadır. Patojenik değişiklikler NGS yöntemiyle insidental olarak yakalanabildiğinden hangi bulguların tıbbi açıdan klinisyene bildirilmesi gerektiği önemlidir. Bu nedenle sekanslama ve gerçek varyantlar tanımlandıktan sonra elde bulunan verileri klinik bağlam göz önünde bulundurularak yorumlamak gerekmektedir (214). Çalışmamıza dahil ettiğimiz genlerden yola çıkarak değinmeye değer bulduğumuz bir diğer konu da DNA çift zincir kırıklarının onarım yolları ile MSI arasındaki ilişkidir. Çalışmamıza MLH3, MSH2, MSH3, MSH6 gibi MSI genleri dahil edilmiş olmakla birlikte MSI çalışılmamıştır. Ancak KRK'larda MSI durumu ve BRCA1 gibi DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alan genlerdeki mutasyonların saptanması, bu yolların birbiriyle ilişkilerinin ortaya çıkarılması tedavi açısından anlam taşımaktadır. Çünkü DNA çift zincir kırıklarını onarım yolları sağlam olan MSI KRK'ların DNA'da çift zincir kırıkları oluşturarak etki eden kemoterapötiklere daha duyarlı oldukları öne sürülmektedir. Dolayısıyla MMR mekanizmaları ile DNA çift zincir kırıklarını onarım yolları arasında fonksiyonel bir bağlantı olduğunu, bu yolların birbiri ile ilişkili yolları olduğunu göstermek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (163). KRK'ların gelişiminde ve progresyonunda bu genlerdeki moleküler değişikliklerin birikimi önemli bir rol oynamasına karşın söz konusu gen mutasyonlarının KRK'larda metastaz gelişimindeki rolü net olarak bilinmemektedir

(24). KKK gelişimine, progresyonuna ve metastazına yol açan moleküler mekanizmalar daha iyi anlaşıldıkça hastalık prognozu, metastazı ya da tedavi direnci ile ilişkilendirilebilecek biyomarkerlerin önemi daha da artmaktadır (164). Görece az sayıda olgu olmasına karşın çalışmamız sonuçları yeni çalışmalara farklı bakış açıları da kazandırabilecek niteliktedir. Bölgesel, ırksal somatik mutasyon farklılıklarının ortaya konulması ile KKK olgularında yeni tedavi ve prognoz kriterlerinin belirlenmesi kolaylık gösterebilecektir.



6. SONUÇLAR

2018-2020 yılları arasında Kolorektal Adenokarsinom (KRK) tanılı kolon ve rektuma ait rezeksiyon materyalleri içerisinde NGS sistemiyle analiz edilen 73 olgunun incelenmesi ile elde edilen verilere göre;

- Olguların 47'si (%64,4) erkek, 26'sı (%35,6) kadın olup olguların yaşı 32-86 arasında değişmekteydi ve ortalama yaş $62,53 \pm 11,126$ idi.

- Olguların 27'sinde (%37) proksimal kolon, 29'unda (%39,7) distal kolon, 17'sinde (%23,3) rektum yerleşimli olan tümörlerde tümör çapı 1,5-11,5 cm arasında değişmekte olup ortalama tümör çapı $4,5 \pm 1,9230$ idi.

- Olguların 11'inde (%15,1) iyi diferansiye, 46'sında (%63) orta derecede diferansiye, 7'sinde (%9,6) az diferansiye, 9'unda (%12,3) müsinöz adenokarsinom morfolojisinde tümör bulunmaktaydı.

- Olguların 1'inde (%1,4) evre pT1, 9'unda (%12,3) evre pT2, 51'inde (%69,9) evre pT3, 12'sinde (%16,4) evre pT4 tümör bulunmaktaydı.

- Olguların 63'ünde (%86,3) LVI, 51'inde (%69,9) PNI saptandı.

- Olguların 39'unda (%53,4) lenf nodu metastazı bulunurken 34'ünde (%46,6) lenf nodu metastazı izlenmedi.

- Olguların hiçbirinde AKT1, CASP8, CDK4, EPCAM, KIT, MET, MLH1, RET genlerinde mutasyona rastlanmazken olguların tamamında en az bir mutasyon saptandı.

- Cinsiyet ve yaş ile izlenen mutasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

- Sağ kolon yerleşimi ile BRAF V600E gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,05$).

- Az diferansiye tümörlerle BRAF mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,05$).

- İyi diferansiye tümörlerin 3'ünde (%27,3) KRAS ekzon 3 mutasyonları bulunmaktaydı ve iyi diferansiye tümörler ile KRAS ekzon 3 mutasyonları arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Müsinöz morfolojideki tümörlerle KRAS ekzon 2 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- LVİ bulunan tümörlerin hiçbirinde MSH6 mutasyonuna rastlanmadı ve LVİ ile MSH6 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- PNİ bulunmayan tümörlerin 3'ünde (%13,6) MSH6 mutasyonu, 4'ünde (%18,2) FBXW7 mutasyonu, 9'unda (%40,9) PIK3CA mutasyonu bulunmaktaydı. PNİ ile MSH6, FBXW7 ve PIK3CA mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Lenf nodu metastazı bulunmayan tümörlerin 5'inde (%14,7) BRCA1 mutasyonu, 10'unda (%29,4) BRCA2 mutasyonu bulunmaktaydı. Lenf nodu metastazı ile BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- APC gen mutasyonu bulunan 24 (%32,9) olgunun 8'inde (%33,3) BRCA2, 21'inde (%87,5) CDC27, 4'ünde (%16,7) FBXW7, 9'unda (%37,5) MLH3, 6'sında (%25,0) PMS2, 17'sinde (%70,8) PTEN, 7'sinde (%29,2) TGFBR2, 7'sinde (%29,2) TP53 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. APC gen mutasyonları ile BRCA2, CDC27, FBXW7, MLH3, PMS2, PTEN, TGFBR2, TP53 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- BAX gen mutasyonu bulunan 4 (%5,5) olgunun 2'sinde (%50) BRCA1, 4'ünde (%100) CDC27 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. BAX gen mutasyonları ile BRCA1, CDC27 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 13 tanesinde (%17,8) BRAF gen mutasyonu saptandı. BRAF mutasyonlarının 10'u (%76,9) BRAF V600E, 3'ü (%23,1) BRAF V600E dışı mutasyon olarak bulundu.

- BRAF mutasyonu bulunan olguların 4'ünde (%30,8) az diferansiye tümör bulunmaktaydı ve BRAF mutasyonları ile az diferansiye tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- BRAF V600E mutasyonu bulunan olguların 8'inde (%80) sağ kolon yerleşimli tümör bulunmaktaydı ve BRAF V600E mutasyonları ile sağ kolon yerleşimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- BRAF mutasyonu bulunan olguların hiçbirinde (%0) eş zamanlı KRAS mutasyonu saptanmadı ve BRAF gen mutasyonları ile KRAS gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.001$).

- BRCA1 mutasyonu bulunan 5 (%6,8) olgunun hiçbirinde lenf nodu metastazı saptanmadı ve lenf nodu metastazı ile BRCA1 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki bulundu ($p<0.05$).

- BRCA1 gen mutasyonu bulunan olguların 2'sinde (%40) BAX, 4'ünde (%80) BRCA2, 5'inde (%100) CDC27, 4'ünde (%80) MLH3, 1'inde (%20) MSH2, 4'ünde (%80) MSH3, 2'sinde (%40) MSH6, 5'inde (%100) TGFBR2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. BRCA1 gen mutasyonları ile BAX, BRCA2, CDC27, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, TGFBR2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- BRCA2 mutasyonu bulunan 12 (%16,4) olgunun 10'unda (%83,3) lenf nodu metastazı saptanmadı ve lenf nodu metastazı ile BRCA2 mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki bulundu ($p<0.05$).

- BRCA2 gen mutasyonu bulunan olguların 8'inde (%66,7) APC, 4'ünde (%33,3) BRCA1, 11'inde (%91,7) CDC27, 6'sında (%50) MLH3, 8'inde (%66,7) PTEN mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. BRCA2 gen mutasyonları ile APC, BRCA1, CDC27, MLH3, PTEN gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- CDC27 gen mutasyonu bulunan 34 (%46,6) olgunun 21'inde (%61,8) APC, 4'ünde (%11,8) BAX, 5'inde (%14,7) BRCA1, 11'inde (%32,4) BRCA2, 5'inde (%14,7) FBXW7, 13'ünde (%38,2) MLH3, 13'ünde (%38,2) MSH3, 3'ünde (%8,8) PIK3CA, 8'inde (%23,5) PMS2, 22'sinde (%64,7) PTEN, 10'unda (%29,4) TGFBR2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. CDC27 gen mutasyonları ile APC, BAX, BRCA1, BRCA2, FBXW7, MLH3, MSH3, PIK3CA, PMS, PTEN, TGFBR2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- EGFR gen mutasyonu bulunan 2 (%2,7) olgunun 1'inde (%50) ERBB2 mutasyonu eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. EGFR gen mutasyonları ile ERBB2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- FBXW7 mutasyonu bulunan 5 (%6,8) olgunun 4'ünde (%80,0) PNI saptanmadı ve FBXW7 gen mutasyonları ile PNI arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki bulundu ($p<0.05$).

- FBXW7 gen mutasyonu bulunan olguların 4'ünde (%80) APC, 5'inde (%100) CDC27, 2'sinde (%40) MSH6, 3'ünde (%60) PMS2, 4'ünde (%40) PTEN, 3'ünde (%60) TGFBR2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. FBXW7 gen mutasyonları ile APC, CDC27, MSH6, PMS2, PTEN, TGFBR2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 33'ünde (%45,2) KRAS gen mutasyonu saptandı. Mutasyonlar olguların 26'sında (%78,8) ekzon 2, 4'ünde (%12,1) ekzon 3, 3'ünde (%9,1) ekzon 4 yerleşimliydi.

- KRAS ekzon 2 mutasyonlarının 20'si (%76,9) kodon 12, 6'sı (%23,1) kodon 13 mutasyonlarıydı.

- KRAS ekzon 3 mutasyonlarının 3'ü (%75) kodon 61, 1'i (%25) kodon 59 mutasyonlarıydı.

- KRAS ekzon 4 mutasyonlarının 2'si (%66,6) kodon 146, 1'i (%33,3) kodon 117 mutasyonlarıydı.

- KRAS ekzon 2 mutasyonu bulunan olguların 7'sinde (%26,9) müsinöz adenokarsinom morfolojisinde tümör bulunmaktaydı ve KRAS ekzon 2 mutasyonları ile müsinöz morfolojideki tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- KRAS ekzon 3 mutasyonu bulunan olguların 3'ünün (%75) iyi diferansiye tümörü bulunmaktaydı ve KRAS ekzon 3 mutasyonları ile iyi diferansiye tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- KRAS mutasyonu bulunan olguların hiçbirinde (%0) BRAF mutasyonuna rastlanmadı ve KRAS gen mutasyonları ile BRAF gen mutasyonları arasında istatistiksel

olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 13'ünde (%17,8) MLH3 gen mutasyonu saptandı.

- MLH3 gen mutasyonu bulunan olguların 9'unda (%69,2) APC, 4'ünde (%30,8) BRCA1, 6'sında (%46,2) BRCA2, 13'ünde (%100) CDC27, 9'unda (%69,2) MSH3, 11'inde (%84,6) PTEN, 7'sinde (%53,8) TGFRB2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. MLH3 gen mutasyonları ile APC, BRCA1, BRCA2, CDC27, MSH3, PTEN, TGFRB2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 1'inde (%1,4) MSH2 gen mutasyonu saptandı. MSH2 gen mutasyonu bulunan bu olguda eş zamanlı olarak BRCA1 mutasyonu bulunmaktaydı. MSH2 gen mutasyonları ile BRCA1 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 13'ünde (%17,8) MSH3 gen mutasyonu saptandı.

- MSH3 gen mutasyonu bulunan olguların 11'inde (%84,6) APC, 4'ünde (%30,8) BRCA1, 13'ünde (%100) CDC27, 9'unda (%69,2) MLH3, 11'inde (%84,6) PTEN, 2'sinde (%15,4) SMAD2, 8'inde (%61,5) TGFRB2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. MSH3 gen mutasyonları ile APC, BRCA1, CDC27, MLH3, PTEN, TGFRB2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 3'ünde (%4,1) MSH6 gen mutasyonu saptandı.

- MSH6 gen mutasyonu bulunan olguların hiçbirinde LVİ ve PNI saptanmadı ve MSH6 gen mutasyonları ile LVİ ve PNI arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- MSH6 gen mutasyonu bulunan olguların 2'sinde (%66,7) BRCA1, 2'sinde (%66,7) FBXW7, 3'ünde (%100) PTEN, 2'sinde (%66,7) TGFRB2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. MSH6 gen mutasyonları ile BRCA1, FBXW7, PTEN, TGFRB2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 1'inde (%1,4) NRAS gen mutasyonu saptandı.

- Olguların 18'inde (%24,7) PIK3CA gen mutasyonu saptandı.

- PIK3CA gen mutasyonu bulunan 18 (%24,7) olgunun 9'unda (%50,0) PNI saptanmadı ve PIK3CA gen mutasyonları ile PNI arasında istatistiksel olarak negatif anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.05$).

- PIK3CA gen mutasyonu bulunan olguların 3'ünde (%16,7) CDC27 mutasyonları, 2'sinde (%11,1) PTEN mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. PIK3CA gen mutasyonları ile CDC27 ve PTEN gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- PMS2 gen mutasyonu bulunan 8 (%11) olgunun 6'sında (%75) APC, 8'inde (%100) CDC27, 3'ünde (%37,5) FBXW7, 7'sinde (%87,5) PTEN mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. PMS2 gen mutasyonları ile APC, CDC27, FBXW7, PTEN gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- PTEN gen mutasyonu bulunan 24 (%32,9) olgunun 17'sinde (%70,8) APC, 8'inde (%33,3) BRCA2, 22'sinde (%91,7) CDC27, 4'ünde (%16,7) FBXW7, 11'inde (%45,8) MLH3, 11'inde (%45,8) MSH3, 3'ünde (%12,5) MSH6, 7'sinde (%29,2) PMS2, 8'inde (%33,3) TGFBR2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. PTEN gen mutasyonları ile APC, BRCA2, CDC27, FBXW7, MLH3, MSH3, MSH6, PMS2, TGFBR2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 2'sinde (%2,7) SMAD2 gen mutasyonu saptandı.

- SMAD2 gen mutasyonu bulunan 2'sinde (%100) MSH3 ve TGFBR2 mutasyonları eşzamanlı olarak bulundu. SMAD2 gen mutasyonları ile MSH3, TGFBR2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- Olguların 6'sında (%8,2) SMAD4 gen mutasyonu saptandı.

- TGFBR2 mutasyonu bulunan 10 (%13,7) olgunun 7'sinde (%70) APC, 5'inde (%50) BRCA1, 10'unda (%100) CDC27, 3'ünde (%30) FBXW7, 7'sinde (%70) MLH3, 8'inde (%80) MSH3, 2'sinde (%20) MSH6, 8'inde (%80) PTEN, 2'sinde (%20) SMAD2 mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. TGFBR2 gen mutasyonları ile APC, BRCA1, CDC27, FBXW7, MLH3, MSH3, MSH6, PTEN, SMAD2 gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

- TP53 gen mutasyonu bulunan 8 (%11) olgunun 7'sinde (%87,5) APC mutasyonları eş zamanlı olarak bulunmaktaydı. TP53 gen mutasyonları ile APC gen mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

Tablo 4 Uluslararası Literatür, Ulusal Literatür ve Mevcut Çalışmada Saptanan Mutasyon Oranları

Mutasyonlar	Uluslararası Literatür (%)	Ulusal Literatür (%)	
		Önceki çalışmalar	Mevcut çalışma
AKT1	0.5-1.7	-	-
APC	51-81	-	32.9
ATM	7	-	6.8
BAX	2.1	-	5.5
BRAF	8-12	2-33.6	17.8
BRCA1	0.3-2.6	-	6.8
BRCA2	0.34-2	-	16.4
CASP8	5.1	-	-
CDC27	5	-	46.6
CDK4	0.86	-	-
DCC	6	-	-
EGFR	0.9-22.4	-	2.7
EPCAM	-	-	-
ERBB2	2.8-8.3	-	1.4
FBXW7	7.3-20	-	6.8
KIT	0.3-2.8	-	-
KRAS	30-40	30-49	45.2
MET	0-9.5	-	-
MLH1	0.9-77	-	-
MLH3	8.6-25	-	17.8
MSH2	0.9-40	-	1.4
MSH3	3.8-59.3	-	17.8
MSH6	0.4-40	-	4.1
NRAS	2.9-8	3.2-17.9	1.4
PIK3CA	12.7-20.8	-	24.7
PMS2	0.6-3.1	-	11
PTEN	0.6-20	-	32.9
RET	0.17-2.7	-	-
SMAD2	0-10	-	2.7
SMAD4	2-15	-	8.2
TGFBR2	3.1-72	-	13.7
TP53	6-60	-	11

ÖZET

KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM TANILI OLGULARDA YENİ NESİL DİZİLEME İLE SAPTANAN MUTASYON PROFİLİ VE KLİNİKOPATOLOJİK KORELASYONU

Kolorektal kanser (KRK) dünya çapında en sık görülen üçüncü malignite ve kanser ilişkili ölümlerin en sık ikinci nedenidir. KRK homojen bir hastalık değildir ve moleküler profilini ortaya koyan son çalışmalar KRK'nın heterojenitesini göstermektedir. KRK'ya özgü genomik değişikliklerin karakterizasyonu, hastaya ve tümör tipine özgü daha başarılı ve hedefe yönelik tedavi protokolleri oluşturmak açısından önem taşımaktadır. KRK'ların moleküler profilinin tedavi sürecine ek olarak kanser patogenezinin, tedaviye direnç mekanizmalarının anlaşılmasında ve prognoz tespitinde de önemli bir yeri bulunmaktadır. Kapsamlı bir mutasyon profili sağlayan NGS yöntemi ile aynı anda birçok genin ve genler içindeki birçok bölgenin analizi yapılabilmektedir. Zaman, maliyet ve tümör dokusu bakımından ekonomik bir şekilde hastanın klinik yönetimi ile ilgili önemli veriler elde edilebilmektedir.

Çalışmaya Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2018-2020 yılları arasında incelenen KRK tanılı ve NGS yöntemiyle moleküler analizi yapılan 73 olgu dahil edilmiştir. Çalışmada KRK'ların prognozunda rol oynayan klinikopatolojik parametreler ve NGS yöntemi ile 32 adet gende saptanan patojenik mutasyonlar arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda sağ kolon yerleşimi ile BRAF V600E mutasyonları, az diferansiye tümörler ile BRAF mutasyonları, iyi diferansiye tümörler ile KRAS ekzon 3 mutasyonları, müsinöz morfolojideki tümörlerle KRAS ekzon 2 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki saptanırken, LVİ ile MSH6 mutasyonları; PNI ile MSH6, FBWX7, PIK3CA mutasyonları; lenf nodu metastazı ile BRCA1, BRCA2 mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki bulunmuştur. Çalışma sonucunda Türk popülasyonunda literatüre göre daha yüksek oranda BRAF, BRCA1, BRCA2, CDC27, KRAS, PIK3CA, PMS2 ve PTEN gen mutasyonları bulunurken, NRAS gen mutasyonu ise literatüre göre daha düşük oranda saptanmıştır. KRAS ve BRAF mutasyonları literatürdekiyle benzer şekilde birbirini dışlayıcı mutasyonlar şeklinde bulunmuştur. Birlikteliği anlamlı bulunan önemli gen mutasyonları arasında APC-BRCA2, APC-MLH3, APC-PTEN, APC-TP53, APC-TGFBR2, BRCA2-PTEN, MLH3-MSH3, MLH3-PTEN, MLH-TGFBR2, MSH3-PTEN, MSH3-TGFBR2,

PMS2-PTEN ve PTEN-TGFBR2 bulunduğu saptanmıştır.

Mutasyonların klinik olarak daha doğru yorumlanması için KRK olgularının genomik değişikliklerini içeren kapsamlı bir veri tabanının gerekliliği açıktır. KRK’larda bulunan mutasyonların sıklığına ilişkin Türk popölasyonu için yeterli sayıda çalışma bulunmamakta, takip ve tedavi protokolleri Avrupa ve Amerika veri tabanlarına ve kılavuzlarına göre düzenlenmektedir. Türk hasta kohortunda KRK’lı hastalarda mutasyon profilinin NGS yöntemi ile kapsamlı biçimde ortaya konması terapötik, prognostik ve prediktif açıdan önemli verilen elde edilmesi Türk popölasyonu için daha başarılı tedavi ve takip stratejilerinin oluşturulabilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, Moleküler, Mutasyon, NGS.

ABSTRACT

MUTATION PROFILE DETERMINED BY NGS AND CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATION IN COLORECTAL ADENOCARCINOMA CASES

Colorectal cancer is the third most common malignancy and the second most common cause of cancer-related death worldwide. CRC is not a homogeneous disease, and recent studies which is revealing its molecular profile demonstrate the heterogeneity of CRC. Characterization of genomic alterations specific to CRC is important in terms of creating more successful and targeted treatment protocols specific to the patient and tumor type. In addition to its effect on treatment, the molecular profile of CRCs also has an important role in understanding the pathogenesis of cancer, mechanisms of resistance to treatment, and determining prognosis. The NGS method provides a comprehensive mutation profile by analyzing many genes and many regions within the genes at the same time. Essential and important data about the clinical management of the patient can be obtained economically in terms of time, cost and tumor tissue.

This study includes 73 cases diagnosed with CRC and analyzed by NGS method between 2018-2020 at Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Pathology. In the study, clinicopathological parameters affecting the prognosis of CRCs and the relationship between pathogenic mutations detected in 32 genes by NGS method were evaluated. As a result of statistical analysis, a statistically significant relationship was found between some of the clinicopathological parameters and some gene mutations. A statistically significant positive correlation was found between right colon location and BRAF V600E mutations, poorly differentiated tumors and BRAF mutations, well-differentiated tumors and KRAS exon 3 mutations, mucinous morphology and KRAS exon 2 mutations. A statistically significant negative correlation was found between LVI and MSH6 mutations, PNI and MSH6, FBWX7, PIK3CA mutations, lymph node metastasis and BRCA1, BRCA2 mutations. As a result of the study BRAF, BRCA1, BRCA2, CDC27, KRAS, PIK3CA, PMS2 and PTEN gene mutations were identified at higher percentages in Turkish population compared to the literature, while NRAS gene mutations were found at a lower rate. In addition, the coexistence of some gene mutations and the absence of some gene mutations were found to be statistically significant as a result of the analysis. KRAS and BRAF mutations were found as mutually exclusive mutations similar to those in the literature. APC-

BRCA2, APC-MLH3, APC-PTEN, APC-TP53, APC-TGFBR2, BRCA2-PTEN, MLH3-MSH3, MLH3-PTEN, MLH-TGFBR2, MSH3-PTEN, MSH3-TGFBR2, PMS2-PTEN and PTEN- TGFBR2 mutations were found to be the most common gene mutations with statistically significant association.

It is clear that a comprehensive database of genomic alterations of CRCs is required for more accurate clinical interpretation of mutations. There are not enough studies on the frequency of mutations in CRCs within the Turkish population, and follow-up and treatment protocols are organized according to European and American databases and guidelines. Revealing the mutation profile in patients with CRC with NGS method and obtaining important data in terms of therapeutic, prognostic and predictive aspects may help to create more successful treatment and follow-up strategies for the Turkish population.

Key words: Colorectal cancer, Molecular, Mutation, NGS.

KAYNAKLAR

1. Mattiuzzi C, Sanchis-Gomar F, Lippi G. Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Ann Transl Med.* 2019;7(21):609.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
3. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(9):1423-31.
4. Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125-34.
5. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet.* 2019;394(10207):1467-80.
6. Chung RY, Tsoi KKF, Kyaw MH, Lui AR, Lai FTT, Sung JJ. A population-based age-period-cohort study of colorectal cancer incidence comparing Asia against the West. *Cancer Epidemiol.* 2019;59:29-36.
7. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(3):145-64.
8. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683-91.
9. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, et al. Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(8).
10. Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013;21(2):97-102.
11. WHO Classification of Tumors of the Digestive System Tumours. 5 ed. Lokuhetty D, White VA, Watanabe R, Cree IA, editors: Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC); 2019 2019. 177-87 p.

12. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003;63(7):1608-14.
13. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2014;27(1):9-14.
14. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992;359(6392):235-7.
15. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol.* 2014;65(4):257-66.
16. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2020;158(2):291-302.
17. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene.* 2006;25(57):7531-7.
18. Lee DW, Han SW, Cha Y, Bae JM, Kim HP, Lyu J, et al. Association between mutations of critical pathway genes and survival outcomes according to the tumor location in colorectal cancer. *Cancer.* 2017;123(18):3513-23.
19. Raskov H, Soby JH, Troelsen J, Bojesen RD, Gogenur I. Driver Gene Mutations and Epigenetics in Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 2020;271(1):75-85.
20. Inamura K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers (Basel).* 2018;10(1).
21. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-72.
22. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7518-28.

23. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
24. Huang D, Sun W, Zhou Y, Li P, Chen F, Chen H, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):173-87.
25. Hardiman KM. Update on Sporadic Colorectal Cancer Genetics. *Clin Colon Rectal Surg*. 2018;31(3):147-52.
26. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(7):489-99.
27. <Diagnostic Microsatellite Instability Definition and Correlation with Mismatch.pdf>.
28. Iacopetta B, Grieco F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2010;6(4):260-9.
29. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 2007;56(1):140-8.
30. <Mutations of the BRAF gene.pdf>.
31. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(3):153-62.
32. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
33. Briggs S, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase epsilon and delta mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J Pathol*. 2013;230(2):148-53.
34. Preston BD, Albertson TM, Herr AJ. DNA replication fidelity and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(5):281-93.

35. Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK, Myers JL. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 11 ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018.
36. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.
37. Revathidevi S, Munirajan AK. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol*. 2019;59:80-91.
38. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(8).
39. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18151-64.
40. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26.
41. Hu JL, Hu SS, Hou XX, Zhu X, Cao J, Jiang LH, et al. Abnormal Expression of DNA Double-Strand Breaks Related Genes, ATM and GammaH2AX, in Thyroid Carcinoma. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:136810.
42. Xiong H, Zhang J. Expression and clinical significance of ATM and PUMA gene in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(6):7825-8.
43. Sriramulu S, Ramachandran M, Subramanian S, Kannan R, Gopinath M, Sollano J, et al. A review on role of ATM gene in hereditary transfer of colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2019;89(4):463-9.
44. Abdel-Rahman WM, Georgiades IB, Curtis LJ, Arends MJ, Wyllie AH. Role of BAX mutations in mismatch repair-deficient colorectal carcinogenesis. *Oncogene*. 1999;18(12):2139-42.
45. Cobanoglu B, Ceyran AB, Simsek M, Senol S. Immunohistochemical analysis of Bax and AIF in colorectal tumors. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):16071-6.

46. Pietrantonio F, Biondani P, Ciurlia E, Fanetti G, Tessari A, Bertarelli G, et al. Role of BAX for outcome prediction in gastrointestinal malignancies. *Med Oncol.* 2013;30(3):610.
47. Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
48. Nakayama I, Hirota T, Shinozaki E. BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. *Cancers (Basel).* 2020;12(11).
49. Afrasanie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Paduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiol Oncol.* 2019;53(3):265-74.
50. Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S, et al. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON.* 2018;23(4):862-6.
51. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004;95(11):866-71.
52. Rudkin TM, Foulkes WD. BRCA2: breaks, mistakes and failed separations. *Trends Mol Med.* 2005;11(4):145-8.
53. Oh M, McBride A, Yun S, Bhattacharjee S, Slack M, Martin JR, et al. BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations and Colorectal Cancer Risk: Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(11):1178-89.
54. Cullinane CM, Creavin B, O'Connell EP, Kelly L, O'Sullivan MJ, Corrigan MA, et al. Risk of colorectal cancer associated with BRCA1 and/or BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. *Br J Surg.* 2020;107(8):951-9.
55. Peng Q, Lao X, Tang W, Chen Z, Li R, Wang J, et al. CASP8 -652 6N del polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(2):e87925.

56. Hashemi M, Aftabi S, Moazeni-Roodi A, Sarani H, Wiechec E, Ghavami S. Association of CASP8 polymorphisms and cancer susceptibility: A meta-analysis. *Eur J Pharmacol.* 2020;881:173201.
57. Qiu L, Wu J, Pan C, Tan X, Lin J, Liu R, et al. Downregulation of CDC27 inhibits the proliferation of colorectal cancer cells via the accumulation of p21Cip1/Waf1. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2074.
58. Qiu L, Tan X, Lin J, Liu RY, Chen S, Geng R, et al. CDC27 Induces Metastasis and Invasion in Colorectal Cancer via the Promotion of Epithelial-To-Mesenchymal Transition. *J Cancer.* 2017;8(13):2626-35.
59. Gao X, Leone GW, Wang H. Cyclin D-CDK4/6 functions in cancer. *Adv Cancer Res.* 2020;148:147-69.
60. Hamilton E, Infante JR. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treat Rev.* 2016;45:129-38.
61. Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends Cell Biol.* 2018;28(11):911-25.
62. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 2004;22(16):3420-8.
63. Duman-Scheel M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) pathfinding: axon guidance gene finally turned tumor suppressor. *Curr Drug Targets.* 2012;13(11):1445-53.
64. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev.* 1994;8(10):1174-83.
65. Puerta-Garcia E, Canadas-Garre M, Calleja-Hernandez MA. Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics.* 2015;16(10):1189-222.
66. Wu JT, Kakar S, Nelson RL, Mihalov ML, Hayward B, Gilbert PB, et al. Prognostic significance of DCC and p27Kip1 in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13(1):45-54.

67. Talukdar S, Emdad L, Das SK, Fisher PB. EGFR: An essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells. *Adv Cancer Res.* 2020;147:161-88.
68. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35.
69. Saif MW. Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010;19(3):357-69.
70. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(1):3-20.
71. Yahyazadeh Mashhadi SM, Kazemimanesh M, Arashkia A, Azadmanesh K, Meshkat Z, Golichenari B, et al. Shedding light on the EpCAM: An overview. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):12569-80.
72. Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(8):1989-2001.
73. Yang J, Isaji T, Zhang G, Qi F, Duan C, Fukuda T, et al. EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;522(4):903-9.
74. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014;2014:852748.
75. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release.* 2010;146(3):264-75.
76. Greally M, Kelly CM, Cercek A. HER2: An emerging target in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 2018;42(6):560-71.
77. Connell CM, Doherty GJ. Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open.* 2017;2(5):e000279.
78. Sailo BL, Banik K, Girisa S, Bordoloi D, Fan L, Halim CE, et al. FBXW7 in Cancer: What Has Been Unraveled Thus Far? *Cancers (Basel).* 2019;11(2).
79. Davis RJ, Welcker M, Clurman BE. Tumor suppression by the Fbw7 ubiquitin ligase: mechanisms and opportunities. *Cancer Cell.* 2014;26(4):455-64.

80. Sihto H, Tynnen O, Butzow R, Saarialho-Kere U, Joensuu H. Endothelial cell KIT expression in human tumours. *J Pathol.* 2007;211(4):481-8.
81. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13(3):205-20.
82. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2443-59.
83. Roberts R, Govender D. Gene of the month: KIT. *J Clin Pathol.* 2015;68(9):671-4.
84. Tan J, Yang S, Shen P, Sun H, Xiao J, Wang Y, et al. C-kit signaling promotes proliferation and invasion of colorectal mucinous adenocarcinoma in a murine model. *Oncotarget.* 2015;6(29):27037-48.
85. Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. *Cell Signal.* 2000;12(7):425-34.
86. Murugan AK, Grieco M, Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:23-35.
87. Pantsar T. The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:189-98.
88. Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(17):4753-63.
89. Renaud S, Guerrera F, Seitlinger J, Costardi L, Schaeffer M, Romain B, et al. KRAS exon 2 codon 13 mutation is associated with a better prognosis than codon 12 mutation following lung metastasectomy in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(2):2514-24.
90. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res.* 2014;20(11):3033-43.

91. Li W, Qiu T, Zhi W, Shi S, Zou S, Ling Y, et al. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer*. 2015;15:340.
92. He K, Wang Y, Zhong Y, Pan X, Si L, Lu J. KRAS Codon 12 Mutation is Associated with More Aggressive Invasiveness in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): Retrospective Research. *Onco Targets Ther*. 2020;13:12601-13.
93. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(12):834-48.
94. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3(1 Suppl):S7-S19.
95. Inno A, Di Salvatore M, Cenci T, Martini M, Orlandi A, Strippoli A, et al. Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer? *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10(4):325-32.
96. Liu Y, Yu XF, Zou J, Luo ZH. Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(12):3706-10.
97. Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med J*. 2009;127(1):46-51.
98. Cerretelli G, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. Molecular pathology of Lynch syndrome. *J Pathol*. 2020;250(5):518-31.
99. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):97-101.
100. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):735-40.
101. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773-9.

102. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny N, Saltz L, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res.* 2017;23(16):4753-60.
103. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2015;136(1):83-90.
104. Lai K, Killingsworth MC, Lee CS. Gene of the month: PIK3CA. *J Clin Pathol.* 2015;68(4):253-7.
105. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;347:21-41.
106. Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, Sadreddini S, Baradaran B. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene.* 2019;698:120-8.
107. Alqahtani A, Ayes HSK, Halawani H. PIK3CA Gene Mutations in Solid Malignancies: Association with Clinicopathological Parameters and Prognosis. *Cancers (Basel).* 2019;12(1).
108. Willis O, Choucair K, Alloghbi A, Stanbery L, Mowat R, Charles Brunicardi F, et al. PIK3CA gene aberrancy and role in targeted therapy of solid malignancies. *Cancer Gene Ther.* 2020;27(9):634-44.
109. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:35.
110. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell.* 2008;133(3):403-14.
111. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2013;3:326.
112. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127-50.
113. Parsons R, Simpson L. PTEN and cancer. *Methods Mol Biol.* 2003;222:147-66.
114. Traugott AL, Moley JF. The RET Protooncogene. *Cancer Treat Res.* 2010;153:303-19.

115. Takahashi M, Kawai K, Asai N. Roles of the RET Proto-oncogene in Cancer and Development. *JMA J.* 2020;3(3):175-81.
116. Jhiang SM. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene.* 2000;19(49):5590-7.
117. Li AY, McCusker MG, Russo A, Scilla KA, Gittens A, Arensmeyer K, et al. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2019;81:101911.
118. Luo Y, Tsuchiya KD, Il Park D, Fausel R, Kanngurn S, Welcsh P, et al. RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene.* 2013;32(16):2037-47.
119. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008;134(2):215-30.
120. Syed V. TGF-beta Signaling in Cancer. *J Cell Biochem.* 2016;117(6):1279-87.
121. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2015;147:22-31.
122. Wosiak A, Wodzinski D, Kolasa M, Salagacka-Kubiak A, Balcerczak E. SMAD-4 gene expression in human colorectal cancer: Comparison with some clinical and pathological parameters. *Pathol Res Pract.* 2017;213(1):45-9.
123. Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res.* 2010;155:85-103.
124. Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R14-20.
125. Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(4):799-804.
126. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2017;152(1):36-52.
127. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-6.

128. Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Hemminki K, Kumar R, et al. Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*. 2012;27(2):211-8.
129. Hrstka R, Coates PJ, Vojtesek B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. *J Cell Mol Med*. 2009;13(3):440-53.
130. Seemann S, Maurici D, Olivier M, Caron de Fromentel C, Hainaut P. The tumor suppressor gene TP53: implications for cancer management and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41(5-6):551-83.
131. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001008.
132. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(5).
133. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*. 2007;13(28):3784-91.
134. Schell MJ, Yang M, Teer JK, Lo FY, Madan A, Coppola D, et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nat Commun*. 2016;7:11743.
135. Zhunussova G, Afonin G, Abdikerim S, Jumanov A, Perfilyeva A, Kaidarova D, et al. Mutation Spectrum of Cancer-Associated Genes in Patients With Early Onset of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:673.
136. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):464-71.
137. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(10):1086-95.

138. Han SW, Kim HP, Shin JY, Jeong EG, Lee WC, Lee KH, et al. Targeted sequencing of cancer-related genes in colorectal cancer using next-generation sequencing. *PLoS One*. 2013;8(5):e64271.
139. Yeh CH, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*. 2018;17(1):115.
140. De Nicola F, Goeman F, Pallocca M, Sperati F, Pizzuti L, Melucci E, et al. Deep sequencing and pathway-focused analysis revealed multigene oncodriver signatures predicting survival outcomes in advanced colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2018;7(7):55.
141. Chen PC, Kuraguchi M, Velasquez J, Wang Y, Yang K, Edwards R, et al. Novel roles for MLH3 deficiency and TLE6-like amplification in DNA mismatch repair-deficient gastrointestinal tumorigenesis and progression. *PLoS Genet*. 2008;4(6):e1000092.
142. Loukola A, Vilkkii S, Singh J, Launonen V, Aaltonen LA. Germline and somatic mutation analysis of MLH3 in MSI-positive colorectal cancer. *Am J Pathol*. 2000;157(2):347-52.
143. Lipkin SM, Wang V, Stoler DL, Anderson GR, Kirsch I, Hadley D, et al. Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene MLH3: Evidence for somatic mutation in colorectal cancers. *Hum Mutat*. 2001;17(5):389-96.
144. Ma AH, Xia L, Littman SJ, Swinler S, Lader G, Polinkovsky A, et al. Somatic mutation of hPMS2 as a possible cause of sporadic human colon cancer with microsatellite instability. *Oncogene*. 2000;19(18):2249-56.
145. Marcolino TF, Pimenta CAM, Artigiani Neto R, Castelo P, Silva MS, Forones NM, et al. p53, Cyclin-D1, beta-catenin, APC and c-myc in Tumor Tissue from Colorectal and Gastric Cancer Patients with Suspected Lynch Syndrome by the Bethesda Criteria. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(2):343-8.
146. Tabrizian T, Wang D, Guan F, Hu Z, Beck AP, Delahaye F, et al. Apc inactivation, but not obesity, synergizes with Pten deficiency to drive intestinal stem cell-derived tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(6):253-65.

147. Deming DA, Leystra AA, Nettekoven L, Sievers C, Miller D, Middlebrooks M, et al. PIK3CA and APC mutations are synergistic in the development of intestinal cancers. *Oncogene*. 2014;33(17):2245-54.
148. Langlois MJ, Roy SA, Auclair BA, Jones C, Boudreau F, Carrier JC, et al. Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *FASEB J*. 2009;23(6):1835-44.
149. Marsh V, Winton DJ, Williams GT, Dubois N, Trumpp A, Sansom OJ, et al. Epithelial Pten is dispensable for intestinal homeostasis but suppresses adenoma development and progression after Apc mutation. *Nat Genet*. 2008;40(12):1436-44.
150. Raja M, Zverev M, Seipel K, Williams GT, Clarke AR, Shaw PH. Assessment of the In Vivo Activity of PI3K and MEK Inhibitors in Genetically Defined Models of Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(10):2175-86.
151. Munoz NM, Upton M, Rojas A, Washington MK, Lin L, Chytil A, et al. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. *Cancer Res*. 2006;66(20):9837-44.
152. Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, et al. Suppressing TGFbeta signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. *Cancer Res*. 2015;75(4):766-76.
153. Fujikura K, Akita M, Ajiki T, Fukumoto T, Itoh T, Zen Y. Recurrent Mutations in APC and CTNNB1 and Activated Wnt/beta-catenin Signaling in Intraductal Papillary Neoplasms of the Bile Duct: A Whole Exome Sequencing Study. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(12):1674-85.
154. Kazemi-Sefat GE, Keramatipour M, Talebi S, Kavousi K, Sajed R, Kazemi-Sefat NA, et al. The importance of CDC27 in cancer: molecular pathology and clinical aspects. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):160.

155. Noordhuis P, Laan AC, van de Born K, Honeywell RJ, Peters GJ. Coexisting Molecular Determinants of Acquired Oxaliplatin Resistance in Human Colorectal and Ovarian Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15).
156. Chen D, Huang JF, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Chuai ZR, et al. BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(3):e90607.
157. Wang J, Shen J, Huang C, Cao M, Shen L. Clinicopathological Significance of BRAF(V600E) Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Cancer.* 2019;10(10):2332-41.
158. Shaukat A, Arain M, Thaygarajan B, Bond JH, Sawhney M. Is BRAF mutation associated with interval colorectal cancers? *Dig Dis Sci.* 2010;55(8):2352-6.
159. Clancy C, Burke JP, Kalady MF, Coffey JC. BRAF mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis.* 2013;15(12):e711-8.
160. Wu M, Kim YS, Ryu HS, Choi SC, Kim KY, Park WC, et al. MSI status is associated with distinct clinicopathological features in BRAF mutation colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Pathol Res Pract.* 2020;216(1):152791.
161. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, et al. (Non-V600) BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(23):2624-30.
162. Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, Lubinski J, Gronwald J, Moller P, et al. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer.* 2014;110(2):530-4.
163. Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, et al. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1494-500.

164. Xie N, Yao Y, Wan L, Zhu T, Liu L, Yuan J. Next-generation sequencing reveals lymph node metastasis associated genetic markers in colorectal cancer. *Exp Ther Med*. 2017;14(1):338-43.
165. Narayanan S, Kawaguchi T, Peng X, Qi Q, Liu S, Yan L, et al. Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):13455.
166. Chae YK, Anker JF, Carneiro BA, Chandra S, Kaplan J, Kalyan A, et al. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget*. 2016;7(17):23312-21.
167. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(5):283-96.
168. Wu X, Mondal G, Wang X, Wu J, Yang L, Pankratz VS, et al. Microcephalin regulates BRCA2 and Rad51-associated DNA double-strand break repair. *Cancer Res*. 2009;69(13):5531-6.
169. Shang W, Yan C, Liu R, Chen L, Cheng D, Hao L, et al. Clinical significance of FBXW7 tumor suppressor gene mutations and expression in human colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021;21(1):770.
170. Korphaisarn K, Morris VK, Overman MJ, Fogelman DR, Kee BK, Raghav KPS, et al. FBXW7 missense mutation: a novel negative prognostic factor in metastatic colorectal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(24):39268-79.
171. Choi BH, Pagano M, Huang C, Dai W. Cdh1, a substrate-recruiting component of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) ubiquitin E3 ligase, specifically interacts with phosphatase and tensin homolog (PTEN) and promotes its removal from chromatin. *J Biol Chem*. 2014;289(25):17951-9.
172. Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, et al. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell*. 2011;144(2):187-99.

173. Zhang L, Fujita T, Wu G, Xiao X, Wan Y. Phosphorylation of the anaphase-promoting complex/Cdc27 is involved in TGF-beta signaling. *J Biol Chem.* 2011;286(12):10041-50.
174. Miyaki M, Yamaguchi T, Iijima T, Takahashi K, Matsumoto H, Mori T. Somatic mutations of the CDC4 (FBXW7) gene in hereditary colorectal tumors. *Oncology.* 2009;76(6):430-4.
175. Chang CC, Lin HH, Lin JK, Lin CC, Lan YT, Wang HS, et al. FBXW7 mutation analysis and its correlation with clinicopathological features and prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2015;30(1):e88-95.
176. Kwon YW, Kim IJ, Wu D, Lu J, Stock WA, Jr., Liu Y, et al. Pten regulates Aurora-A and cooperates with Fbxw7 in modulating radiation-induced tumor development. *Mol Cancer Res.* 2012;10(6):834-44.
177. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Tumor suppressor Fbxw7 regulates TGFbeta signaling by targeting TGIF1 for degradation. *Oncogene.* 2010;29(38):5322-8.
178. Ling C, Wang L, Wang Z, Xu L, Sun L, Yang H, et al. A pathway-centric survey of somatic mutations in Chinese patients with colorectal carcinomas. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116753.
179. Cao Y, Deng S, Yan L, Gu J, Li J, Wu K, et al. Perineural invasion is associated with poor prognosis of colorectal cancer: a retrospective cohort study. *Int J Colorectal Dis.* 2020;35(6):1067-75.
180. Su H, Chang C, Hao J, Xu X, Bao M, Luo S, et al. Identification of Genomic Alterations of Perineural Invasion in Patients with Stage II Colorectal Cancer. *Onco Targets Ther.* 2020;13:11571-82.
181. Rimbert J, Tachon G, Junca A, Villalva C, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Association between clinicopathological characteristics and RAS mutation in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2018;31(3):517-26.

182. Li X, Sun K, Liao X, Gao H, Zhu H, Xu R. Colorectal carcinomas with mucinous differentiation are associated with high frequent mutation of KRAS or BRAF mutations, irrespective of quantity of mucinous component. *BMC Cancer*. 2020;20(1):400.
183. El Agy F, El Bardai S, El Otmani I, Benbrahim Z, Karim MH, Mazaz K, et al. Mutation status and prognostic value of KRAS and NRAS mutations in Moroccan colon cancer patients: A first report. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248522.
184. Fu X, Huang Y, Fan X, Deng Y, Liu H, Zou H, et al. Demographic trends and KRAS/BRAF(V600E) mutations in colorectal cancer patients of South China: A single-site report. *Int J Cancer*. 2019;144(9):2109-17.
185. Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, Kuchiba A, Qian ZR, Liao X, et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Mol Cancer*. 2014;13:135.
186. Zhang J, Zheng J, Yang Y, Lu J, Gao J, Lu T, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Sci Rep*. 2015;5:18678.
187. Ioana M, Angelescu C, Burada F, Mixich F, Riza A, Dumitrescu T, et al. MMR gene expression pattern in sporadic colorectal cancer. *J Gastrointest Liver Dis*. 2010;19(2):155-9.
188. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(12):3285-96.
189. Shin KH, Park YJ, Park JG. PTEN gene mutations in colorectal cancers displaying microsatellite instability. *Cancer Lett*. 2001;174(2):189-94.
190. Verma R, Agarwal AK, Sakhuja P, Sharma PC. Microsatellite instability in mismatch repair and tumor suppressor genes and their expression profiling provide important targets for the development of biomarkers in gastric cancer. *Gene*. 2019;710:48-58.

191. Flores-Rozas H, Kolodner RD. The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12404-9.
192. Akiyama Y, Nagasaki H, Nakajima T, Sakai H, Nomizu T, Yuasa Y. Infrequent frameshift mutations in the simple repeat sequences of hMLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Jpn J Clin Oncol*. 2001;31(2):61-4.
193. Park JM, Huang S, Tougeron D, Sinicrope FA. MSH3 mismatch repair protein regulates sensitivity to cytotoxic drugs and a histone deacetylase inhibitor in human colon carcinoma cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e65369.
194. Huang SC, Lee JK, Smith EJ, Doctolero RT, Tajima A, Beck SE, et al. Evidence for an hMSH3 defect in familial hamartomatous polyps. *Cancer*. 2011;117(3):492-500.
195. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2013;73(2):725-35.
196. Chung H, Young DJ, Lopez CG, Le TA, Lee JK, Ream-Robinson D, et al. Mutation rates of TGFBR2 and ACVR2 coding microsatellites in human cells with defective DNA mismatch repair. *PLoS One*. 2008;3(10):e3463.
197. Dai W, Li Y, Meng X, Cai S, Li Q, Cai G. Does tumor size have its prognostic role in colorectal cancer? Re-evaluating its value in colorectal adenocarcinoma with different macroscopic growth pattern. *Int J Surg*. 2017;45:105-12.
198. Saha S, Shaik M, Johnston G, Saha SK, Berbiglia L, Hicks M, et al. Tumor size predicts long-term survival in colon cancer: an analysis of the National Cancer Data Base. *Am J Surg*. 2015;209(3):570-4.
199. Saha S, Kanaan MN, Shaik M, Abadeer B, Korant A, Krishnamoorthy M, et al. Tumor size as a prognostic factor for patients with colon cancer undergoing sentinel lymph node mapping and conventional surgery. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(4_suppl):546-.

200. Guo TA, Wu YC, Tan C, Jin YT, Sheng WQ, Cai SJ, et al. Clinicopathologic features and prognostic value of KRAS, NRAS and BRAF mutations and DNA mismatch repair status: A single-center retrospective study of 1,834 Chinese patients with Stage I-IV colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2019;145(6):1625-34.
201. Liang Y, Cai X, Zheng X, Yin H. Analysis of the Clinicopathological Characteristics of Stage I-III Colorectal Cancer Patients Deficient in Mismatch Repair Proteins. *Onco Targets Ther*. 2021;14:2203-12.
202. Plaschke J, Kruger S, Jeske B, Theissig F, Kreuz FR, Pistorius S, et al. Loss of MSH3 protein expression is frequent in MLH1-deficient colorectal cancer and is associated with disease progression. *Cancer Res*. 2004;64(3):864-70.
203. Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Celesti G, Di Caro G, Pedroni M, et al. MSH3 protein expression and nodal status in MLH1-deficient colorectal cancers. *Clin Cancer Res*. 2012;18(11):3142-53.
204. Bohn BA, Mina S, Krohn A, Simon R, Kluth M, Harasimowicz S, et al. Altered PTEN function caused by deletion or gene disruption is associated with poor prognosis in rectal but not in colon cancer. *Hum Pathol*. 2013;44(8):1524-33.
205. Trabucco SE, Gowen K, Maund SL, Sanford E, Fabrizio DA, Hall MJ, et al. A Novel Next-Generation Sequencing Approach to Detecting Microsatellite Instability and Pan-Tumor Characterization of 1000 Microsatellite Instability-High Cases in 67,000 Patient Samples. *J Mol Diagn*. 2019;21(6):1053-66.
206. Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG, Herlea V, Becheanu G, Cavazzini L, et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaRII, BAX, hMSH3, hMSH6, IGF1IR and BLM genes. *Int J Cancer*. 2000;89(3):230-5.
207. Chung YJ, Park SW, Song JM, Lee KY, Seo EJ, Choi SW, et al. Evidence of genetic progression in human gastric carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene*. 1997;15(14):1719-26.

208. Lee CT, Chow NH, Chen YL, Ho CL, Yeh YM, Lin SC, et al. Clinicopathological features of mismatch repair protein expression patterns in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2021;217:153288.
209. Soliman NA, Morsia DF, Helmy NAH. Immunohistochemical Expression of MMR Proteins with Clinicopathological Correlation in Colorectal Cancer in Egypt. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(10):1608-17.
210. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, et al. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature*. 2005;436(7052):792.
211. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(7):2554-9.
212. Dicuonzo G, Angeletti S, Garcia-Foncillas J, Brugarolas A, Okrouzhnov Y, Santini D, et al. Colorectal carcinomas and PTEN/MMAC1 gene mutations. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4049-53.
213. Yu M, Trobridge P, Wang Y, Kannurn S, Morris SM, Knoblaugh S, et al. Inactivation of TGF-beta signaling and loss of PTEN cooperate to induce colon cancer in vivo. *Oncogene*. 2014;33(12):1538-47.
214. Ilyas M. Next-Generation Sequencing in Diagnostic Pathology. *Pathobiology*. 2017;84(6):292-305.
215. Kamps R, Brandao RD, Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
216. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(11):1544-57.

EKLER

Ek 1. Olgu Rapor Formu

BIYOPSI NO	CİNSİYET	YAŞ	TÜMÖR YERLEŞİM YERİ	TÜMÖR BOYUTU	TÜMÖR DİFERANSİYASYONU	TÜMÖR EVRESİ (PT)	LVİ	PNİ	LENF NODU METASTAZI	PATOJENİK MUTASYON
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Ek 2. Etik Kurul Onayı

ADÜ Evrak Tarih ve Sayısı: 24.08.2020-43321





T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 53043469-050.04.04
Konu : Kararlar

Sayın Prof.Dr. İbrahim METEOĞLU
Öğretim Üyesi

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 20.08.2020 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmamızla ilgili alınan 13 nolu karar aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinize sunarım.

e-imzalıdır
Prof.Dr. Hatice ERTABAĞLAR
Kurul Başkanı

KARAR: 13
Protokol No: 2020/168
Sorumlu Yürütücü: Prof. Dr. İbrahim METEOĞLU
Tıbbi Patoloji AD

Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İbrahim METEOĞLU'nun "Kolonorektal adenokarsinom olgularda yeni nesil dizileme ile saptanan mutasyon profili ve klinikopatolojik korelasyonu" konulu yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir. Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde tabiiyet edilen çalışma bitildikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektığının hatırlanmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektığının bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Evrakı Doğrulamak İçin: <https://ohys.adu.edu.tr/en/Vision/Dogrula/WV5VRV1>
ADÜ Merkez Kampüsü Aytepe Mahallesi 09100 Elazığ/AYDIN
Telefon No: 0256 225 31 66 / 4224 / 4225 Faks No: 0256 212 31 69
E-Posta: goetik@adu.edu.tr İnternet Adresi: akademik.adu.edu.tr/fakulteler/med/

Bilgi İçin: Naciye Yıldız
Unvan: Memur

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

106